

T. Prov. 23/29

T  
16  
93

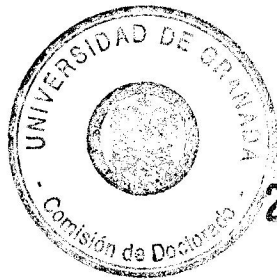
UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha <u>3/2/00</u>
ENTRADA NUM. <u>370</u>

ESTUDIO DEL METABOLISMO CARBONADO EN LA SIMBIOSIS  
*PHASEOLUS VULGARIS-RHIZOBIUM TROPICI* : EFECTO DEL ESTRES  
SALINO

TESIS DOCTORAL



25 ENE. 2000

LINA PLIEGO MARIN

GRANADA, 2000

<b>BIBLIOTECA UNIVERSITARIA</b>
<b>GRANADA</b>
Nº Documento <u>619687631</u>
Nº Copia <u>121239526</u>



**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
COMISIÓN DE DOCTORADO

Fecha: 25 de Enero de 2000  
Su Refª.  
Nuestra Refª.  
Fecha de Salida:  
Unidad de Origen: COMISIÓN DE DOCTORADO

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**Registro General**  
  
27 ENE. 2000  
  
SALIDA N.º 835

Destinatario:

Ilmo. Sr. DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
Facultad de Ciencias  
Fecha 3/02/00  
ENTRADA NUM. 370

En cumplimiento del artículo 36 de las Normas Reguladoras de los estudios de Tercer Ciclo de esta Universidad, adjunto se remite un ejemplar de la Tesis Doctoral presentada por el Doctorando D<sup>a</sup>. LINA PLIEGO DE VORLES titulada ESTUDIO DEL METABOLISMO CARBONADO EN LA SIMBIOSIS PHASEOLUS VULGARIS-RHIZOBIUM TROPICI: EFECTO DEL ESTRES SALINO y dirigida por el Profesor/es Dr/es CARMEN LLUCH PLA, ANTONIO OCAÑA CABRERA con objeto de mantenerla depositada desde el día 25 de Enero de 2000 hasta el día 25 de Febrero de 2000 para que pueda ser examinada por cualquier Doctor que así lo desee.

~~NO~~ → *manu*

Granada, a 25 de Enero de 2000.

LA SECRETARIA DE LA COMISIÓN  
DE DOCTORADO

*S. WJ*



Fdo.: SULTANA WAHNON BENSUSAN  
Secretaria de la Comisión de Doctorado



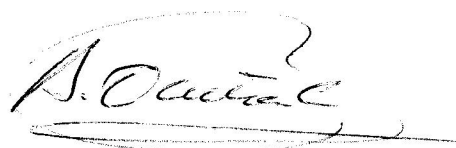
**ESTUDIO DEL METABOLISMO CARBONADO EN LA SIMBIOSIS  
PHASEOLUS VULGARIS-RHIZOBIUM TROPICI : EFECTO DEL ESTRES  
SALINO**

**Memoria que presenta la Licenciada  
en Química D<sup>a</sup> Lina Pliego Marín,  
para aspirar al grado de Doctor.**

*Lina Pliego Marín*  
**Fdo. Lina Pliego Marín**

**DIRECTORES:**

  
**Fdo. Dra. Carmen Lluch Pla**  
**Catedrática de Fisiología Vegetal**  
**Universidad de Granada**

  
**Fdo. Antonio Ocaña Cabrera**  
**Doctor en Ciencias Biológicas**  
**Universidad de Granada**

Esta Tesis Doctoral se ha realizado en el Laboratorio de Fijación de Nitrógeno del Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Granada, y ha sido financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología del Gobierno de México y por los proyectos INCO-950717 (Contract Number ERBIC18CT960081) concedido por la CCE titulado "Nitrogen Fixation and Yield of Grain Legume in Saline Mediterranean Zones (FYSAME)" y PB95-1159 de la DGICYT titulado "Efecto del Estrés Salino en la Fijación Simbiótica de Nitrógeno: Mecanismos de Adaptación en el Nódulo".

## Agradecimientos

Quiero expresar mi más atento agradecimiento a todas aquellas personas que de una manera u otra han contribuido para llevar a cabo tanto el trabajo experimental, como la elaboración de la presente memoria.

A la Dra. Carmen Lluch Plá, directora de esta Tesis, por haber confiado en mi persona y ser incluida dentro de su grupo de investigación. Agradezco su dinamismo, tenacidad e incansable lucha por hacer que en nuestro grupo prevaleciera siempre la inquietud del aprendizaje e investigación, sin detenernos ante cotidianas eventualidades que siempre prevalecen en este tipo de trabajos.

Al Dr. Antonio Ocaña, también director de ese trabajo, agradezco su pronta disposición para cualquier duda ya sea relacionada con el laboratorio o manejo del ordenador.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México) por haberme brindado la posibilidad de ampliar mis conocimientos, otorgándome una beca que me permitió mi sostenimiento económico.

A todo el personal de investigación del Departamento de Biología Vegetal por el apoyo brindado siempre que se le requería: a los Dres. José María Ramos, Luis García del Moral, Luis Romero, Dolores Garrido e Isabel Agui. Así mismo no quiero pasar por desapercibidos a todos los becarios con los que conviví día a día durante la estancia en este Departamento.

No puedo olvidar a mis compañeros de lucha diaria: Marian K. a la que me une una estrecha amistad además de los infinitos "cortes" compartidos, paridos por nosotras mismas. Marian S. por los cafecitos y bocadillos compartidos. A Noelito, el cubano por su derroche de simpatía, y a la nueva generación que recientemente se ha incorporado a este laboratorio: Rosario y Hanna.

A mi esposo Celerino por su incondicional apoyo, y a mis hijos Carolina, Mariana y Sergio quienes han sido mi sustento para continuar con este arduo trabajo.

## Abreviaturas.

ADH:	Alcohol deshidrogenasa
AOA:	Ácido oxalacético
ARA:	Actividad reductora de acetileno específica
ARAP:	Actividad reductora de acetileno total por planta
AST:	Azúcares solubles totales
Ca:	Clorofila A
Cb:	Clorofila B
C <sub>x+c</sub>	Carotenos totales
DDS:	Días después de la siembra
DDT:	Días después del tratamiento
DTT:	Ditiothreitol
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
ECA:	Etanol-cloroformo-agua
EM:	Enzima málico
6PGDH:	6-fosfogluconato deshidrogenasa
IA:	Invertasa alcalina
ICDH:	Isocitrato deshidrogenasa
LDH	Lactato deshidrogenasa
LR:	Longitud de radícula
LE:	Longitud de epicotilo
MDH:	Malato deshidrogenasa
MDS:	Mínima diferencia significativa
MOPS:	Acido 3-propanensulfónico
PSPA:	Peso seco parte aérea
PSR:	Peso seco de raíz
PSP:	Peso seco de planta
PSN:	Peso seco de nódulo
PNN:	Peso normalizado de nódulo
PEP:	Fosfoenolpiruvato
PEPC:	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
PK:	Piruvato quinasa
PP:	Pentosas-fosfato
PRT:	Contenido de proteína
SS:	Sacarosa sintasa
SDS:	Dodecil sulfato de sodio
Tris:	Trihidroximetilaminometano
U:	Unidades
UDPG:	Uridin difosfato glucosa deshidrogenasa
v/v:	Volumen/volumen
v/p	Volumen/peso
□:	Coefficiente de extinción molar

c) Ciclo del ácido $\gamma$ -aminobutírico.....	30
d) Ciclo del $\beta$ -polihidroxibutirato .....	31
e) Rutas fermentativas .....	32
3.9.2 Transporte de compuestos a través de la membrana peribacteroidal .....	32
3.9.3 Respiración bacteroidal .....	32
<b>4. Salinidad .....</b>	<b>33</b>
4.1 Mecanismos de tolerancia .....	34
4.1.1 Exclusión de iones .....	34
4.1.2 Compartimentación.....	35
4.2 Procesos fisiológicos afectados por el estrés salino.....	36
4.2.1 Salinidad en germinación .....	36
4.2.2 Salinidad durante el crecimiento.....	38
4.2.3 Salinidad en la simbiosis .....	39

### III MATERIAL Y METODOS

<b>1. Material biológico.....</b>	<b>41</b>
1.1 Material vegetal .....	43
1.2 Microorganismos .....	44
<b>2. Medios de cultivo .....</b>	<b>44</b>
2.1 Preparación del medio YEM .....	44
2.2 Conservación de la cepa.....	44
2.3 Solución nutritiva.....	45
<b>3. Condiciones experimentales .....</b>	<b>45</b>
3.1 Experimentos de germinación .....	46
3.1.1 Esterilización y siembra de las semillas .....	46
3.1.2 Condiciones de germinación.....	46
3.2 Experimentos con plantas.....	46
3.2.1 Preparación del inóculo .....	46
3.2.2 Esterilización y germinación de las semillas .....	47
3.2.3 Siembra e inoculación .....	47
3.2.4 Condiciones del cultivo .....	47

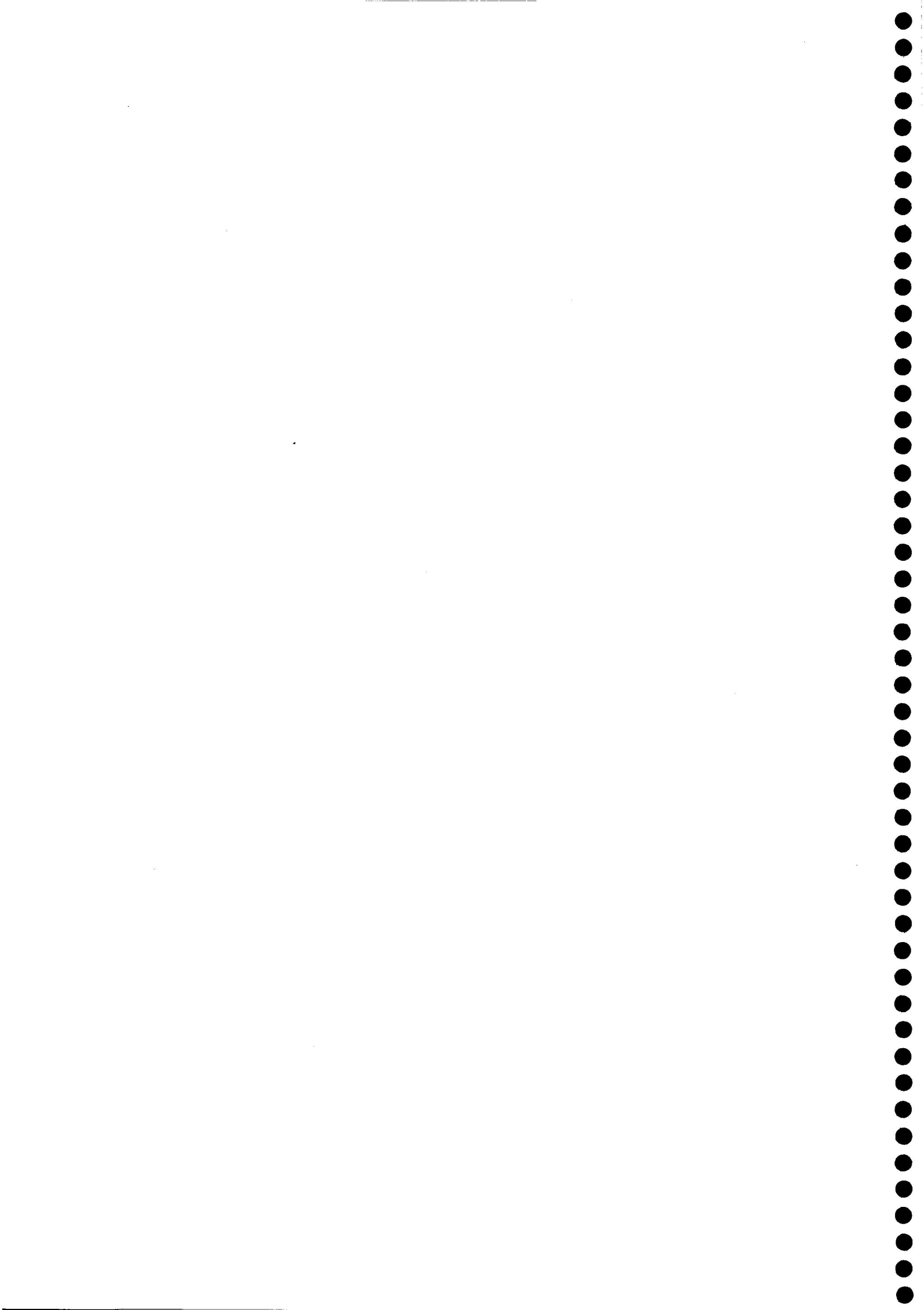
c) 6-fosfogluonato deshidrogenasa .....	61
d) Fosfoenolpiruvato carboxilasa .....	62
e) Malato deshidrogenasa.....	62
f) Isocitrato deshidrogenasa .....	62
g) Alcohol deshidrogenasa.....	63
h) Lactato deshidrogenasa.....	63
i) Piruvato deshidrogenasa .....	63
5.6.2 Preparación de extractos libres de células del citosol bacteroidal .....	64
a) Fumarasa .....	64
b) $\beta$ -hidroxibutirato deshidrogenasa.....	64
5.6.3 Preparación de extractos en radículas de semillas germinadas.....	65
5.7 Determinaciones analíticas.....	65
5.7.1 Determinación de nitratos.....	65
5.7.2 Determinación de prolina .....	65
5.7.3 Determinación de azúcares solubles totales .....	67
5.7.4 Determinación de clorofilas.....	67
5.7.5 En el citosol nodular y bacteroidal.....	68
5.7.5.1 Determinación de proteínas .....	68
a) Método de Lowry modificado por Markwell.....	68
b) Método de Bradford .....	69
5.8 Análisis estadístico de los resultados.....	70
<b>IV RESULTADOS .....</b>	<b>71</b>
<b>1. Germinación de diferentes variedades de <i>Phaseolus vulgaris</i> en condiciones de salinidad.....</b>	<b>73</b>
1.1 Análisis de crecimiento .....	73
1.2 Respuesta a nivel bioquímico.....	81
1.2.1 Contenido en prolina .....	81
1.2.2 Contenido en azúcares solubles totales .....	83
1.2.3 Contenido de proteínas.....	84
1.2.4 Enzimas del metabolismo carbonado en el nódulo.....	84

<b>2. Efecto de la fertilización nitrogenada en la simbiosis <i>Phaseolus vulgaris-Rhizobium tropici</i> CIAT 899</b> .....	89
2.1 Parámetros de crecimiento .....	90
2.2 Parámetros de fijación.....	91
2.3 Pigmentos fotosintéticos .....	94
2.4 Contenido de nitrato.....	95
2.4.1 Contenido de nitrato en nódulo.....	95
2.4.2 Contenido del nitrato en raíz.....	97
2.5 Actividad enzimática.....	98
2.5.1 Actividad nitrato reductasa.....	98
2.5.2 Actividad nitrito reductasa.....	100
<b>3. Efecto de la aplicación del estrés salino a la simbiosis <i>Phaseolus vulgaris</i> var. <i>Africa-Rhizobium tropici</i></b> .....	102
3.1 Aplicación del cloruro de sodio en el estado vegetativo.....	102
3.1.1 Parámetros de crecimiento.....	102
3.1.2 Parámetros de fijación.....	104
3.1.3 Contenido de prolina y azúcares solubles totales.....	105
3.1.4 Actividades enzimáticas del nódulo.....	106
3.2 Aplicación del cloruro de sodio desde la siembra .....	107
3.2.1 Parámetros de crecimiento.....	107
3.2.2 Parámetros de fijación.....	109
3.2.3 Contenido de prolina y azúcares solubles totales.....	111
3.2.4 Actividades enzimáticas del nódulo.....	113
<b>4. Efecto de la salinidad sobre la simbiosis <i>Phaseolus vulgaris</i> var. <i>Coco-Rhizobium tropici</i></b> .....	116
4.1 Aplicación del cloruro de sodio en el estado vegetativo.....	116
4.1.1 Parámetros de crecimiento.....	116
4.1.2 Parámetros de fijación.....	119
4.1.3 Contenido de prolina y azúcares solubles totales.....	122
4.1.4 Actividades enzimáticas del nódulo.....	126
4.2 Aplicación del cloruro de sodio desde la siembra .....	131

4.2.1	Parámetros de crecimiento.....	131
4.2.2	Parámetros de fijación.....	133
4.2.3	Contenido de prolina y azúcares solubles totales.....	135
4.2.4	Actividades enzimáticas del nódulo.....	137
4.3	Comparación de las dos simbiosis.....	143
4.3.1	Parámetros de crecimiento.....	143
4.3.2	Parámetros de fijación.....	145
4.3.3	Contenido de prolina y azúcares solubles totales.....	145
4.3.4	Actividades enzimáticas del nódulo.....	146
<b>5.</b>	<b>Efecto del estrés salino sobre el metabolismo carbonado en el citosol nodular y bacteroidal.....</b>	<b>149</b>
5.1	Parámetros de crecimiento.....	149
5.2	Parámetros de fijación.....	150
5.3	Contenido de prolina y azúcares solubles totales.....	152
5.4	Actividades enzimáticas del citosol nodular.....	154
5.5	Actividades enzimáticas del bacteroide.....	158
<b>6.</b>	<b>Respuesta de tres variedades de judía a la salinidad en relación a la respiración bacteroidal.....</b>	<b>161</b>
6.1	Parámetros de crecimiento.....	161
6.2	Parámetros de fijación.....	165
6.3	Contenido de prolina.....	168
6.4	Contenido de azúcares solubles totales.....	171
6.5	Actividades enzimáticas del nódulo.....	173
6.6	Respiración bacteroidal.....	178
6.6.1	Respiración bacteroidal a través del tiempo.....	178
6.6.2	Respiración bacteroidal con diferentes fuentes de carbono.....	182
<b>V</b>	<b>DISCUSION.....</b>	<b>185</b>
1.	Germinación de diferentes variedades de <i>Phaseolus vulgaris</i> en condiciones de salinidad.....	187

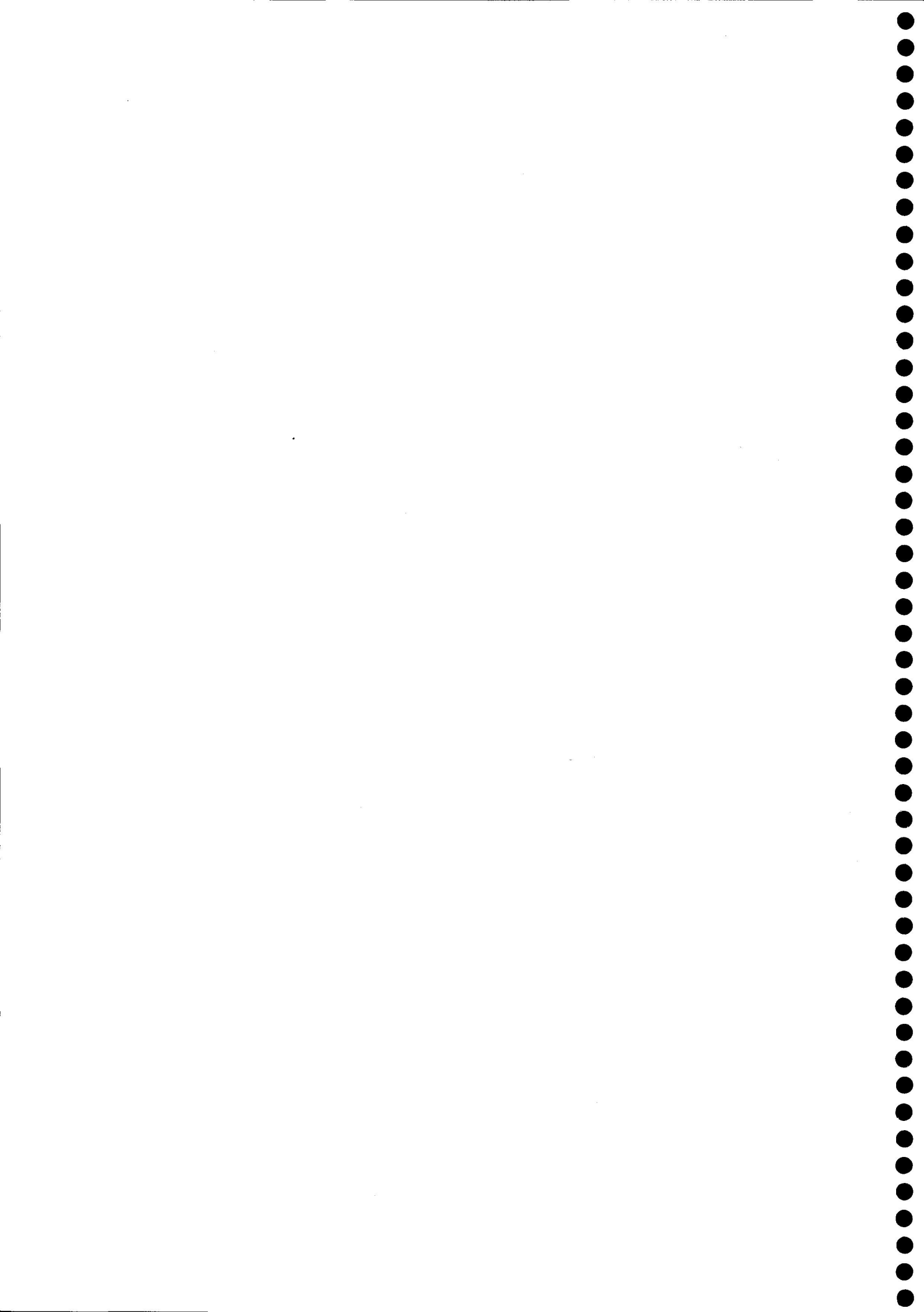


2. Efecto de la fertilización nitrogenada sobre la simbiosis <i>Phaseolus vulgaris</i> - <i>Rhizobium tropici</i> cepa Ciat 899.....	195
3. Efecto de la aplicación del estrés salino a la simbiosis <i>Phaseolus vulgaris</i> var. <i>Africa-Rhizobium tropici</i> .....	199
4. Efecto de la salinidad sobre la simbiosis <i>Phaseolus vulgaris</i> var. Coco- <i>Rhizobium tropici</i> .....	203
5. Efecto del estrés salino sobre el metabolismo carbonado en el citosol nodular y bacteroidal.....	207
6. Respuesta a la salinidad de tres variedades de <i>Phaseolus vulgaris</i> en relación a la respiración bacteroidal.....	211
<b>VI CONCLUSIONES</b> .....	217
<b>VII BIBLIOGRAFIA</b> .....	223





# I JUSTIFICACION



## JUSTIFICACION

El crecimiento exponencial de la población mundial y la consecuente pero necesaria intensificación en la producción de los cultivos ha contribuido, sin duda, al surgimiento y auge de la llamada “**revolución verde**”. El éxito de esta tecnología fue debido al uso de variedades de cereales de alto rendimiento por unidad de área que responden favorablemente a altas dosis de fertilización nitrogenada, a la aplicación de diversos y numerosos productos químicos de actividad biocida, y a la aplicación de sofisticados sistemas de irrigación que, al tiempo que aumentan la productividad de las tierras y el trabajo, incrementan también los costos de producción, y últimamente al uso de materiales transgénicos.

Sin embargo, esta intensiva y costosa explotación de recursos ha contribuido a:

- a) la contaminación del suelo y del agua del subsuelo mediante los residuos de nitratos, nitritos, plaguicidas, herbicidas, etc;
- b) la volatilización de óxidos de Nitrógeno a la atmósfera;
- c) el agotamiento de los recursos no renovables;
- d) el desequilibrio global en el ciclo de Nitrógeno, entre otros procesos.

Por lo tanto, es aconsejable un balance entre la explotación, el manejo y la conservación adecuados de los recursos y la producción de alimentos.

Puesto que el Nitrógeno es el nutriente que afecta en mayor proporción el crecimiento y rendimiento de los cultivos y que, además, la fertilización nitrogenada representa el mayor costo en la productividad agrícola, la fijación biológica del nitrógeno (**FBN**) es una buena alternativa para el medio agrícola.

La salinidad es uno de los factores ambientales que afecta a la fertilidad y productividad de los suelos y, consecuentemente, disminuye el rendimiento de los cultivos. Se conoce que las áreas o suelos con estas características aumentan de manera especial en zonas mediterráneas donde los cultivos dependen del riego con aguas salinas, puesto que las condiciones climatológicas en el medio, la calidad del agua y las características fisicoquímicas del suelo ocasionan la acumulación de sales en él. Por

tanto es necesario incrementar la tecnología y programas de recuperación de suelos salinos de forma que pueda desarrollarse una agricultura productiva y sostenible.

La judía (*Phaseolus vulgaris*) es una leguminosa de grano de gran importancia, tanto por su alto contenido proteico como por su contribución significativa a la “**agricultura sostenible**”, al formar sus raíces simbiosis efectivas con bacterias del suelo del género *Rhizobium*, que tienen la capacidad de fijar el Nitrógeno atmosférico. Sin embargo, un porcentaje importante de las áreas destinadas a este cultivo corresponde a suelos marginales, donde las condiciones ambientales y la tecnología agrícola para un desarrollo adecuado de las plantas no son las óptimas.

Aunque se sabe que la judía tiene un bajo nivel en fijación de Nitrógeno, se ha demostrado que existe una gran variabilidad genotípica al respecto. También se ha evidenciado que la fertilización nitrogenada en dosis elevadas afecta negativamente la FBN, pero la aplicación temprana de bajas dosis de N se hace necesario para un suministro adecuado de ese nutriente a las plantas, hasta que se inicie la fijación en la simbiosis.

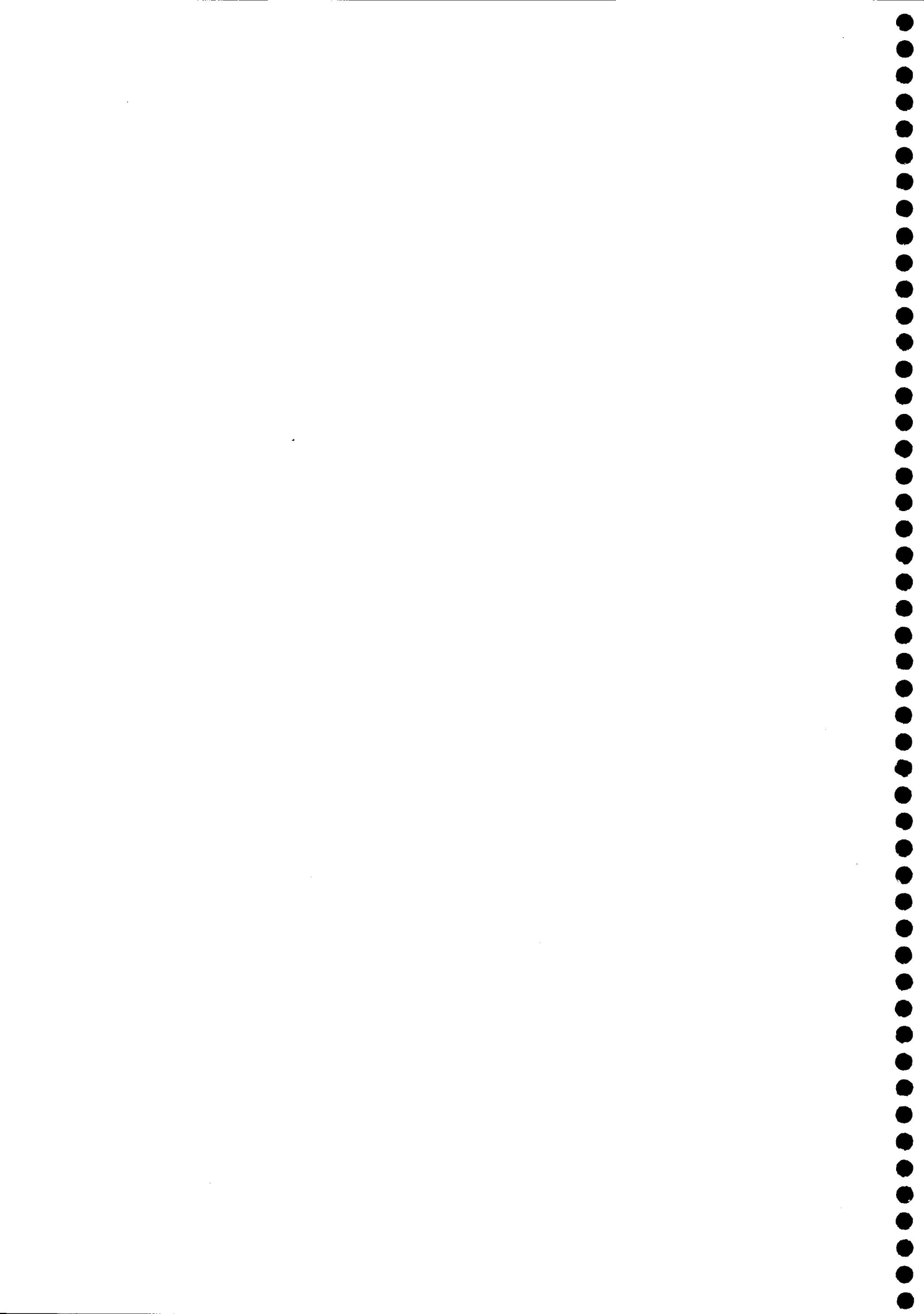
Como la mayoría de las leguminosas, la judía es considerada sensible al estrés salino, incluso en la simbiosis establecida la planta hospedera es más sensible que el microsimbionte.

Este efecto depresivo de la salinidad sobre el crecimiento de la judía puede ser debido tanto a la acumulación de iones tóxicos en los tejidos que afectan procesos fisiológicos de la planta como la germinación, fotosíntesis y transporte de iones, como a la alteración de actividades enzimáticas.

El tratamiento salino puede incidir negativamente en la simbiosis y consecuentemente reducir la magnitud de la FBN, bien por afectar el proceso de infección y formación de la estructura del nódulo, o por afectar el proceso enzimático de reducción de la molécula de N<sub>2</sub>.

En este contexto, nuestro grupo de investigación se planteó el objetivo de este trabajo, para profundizar en el estudio del efecto adverso de la salinidad sobre el crecimiento y desarrollo de la leguminosa *Phaseolus vulgaris* en simbiosis con *Rhizobium*. Se fijaron los siguiente objetivos específicos:

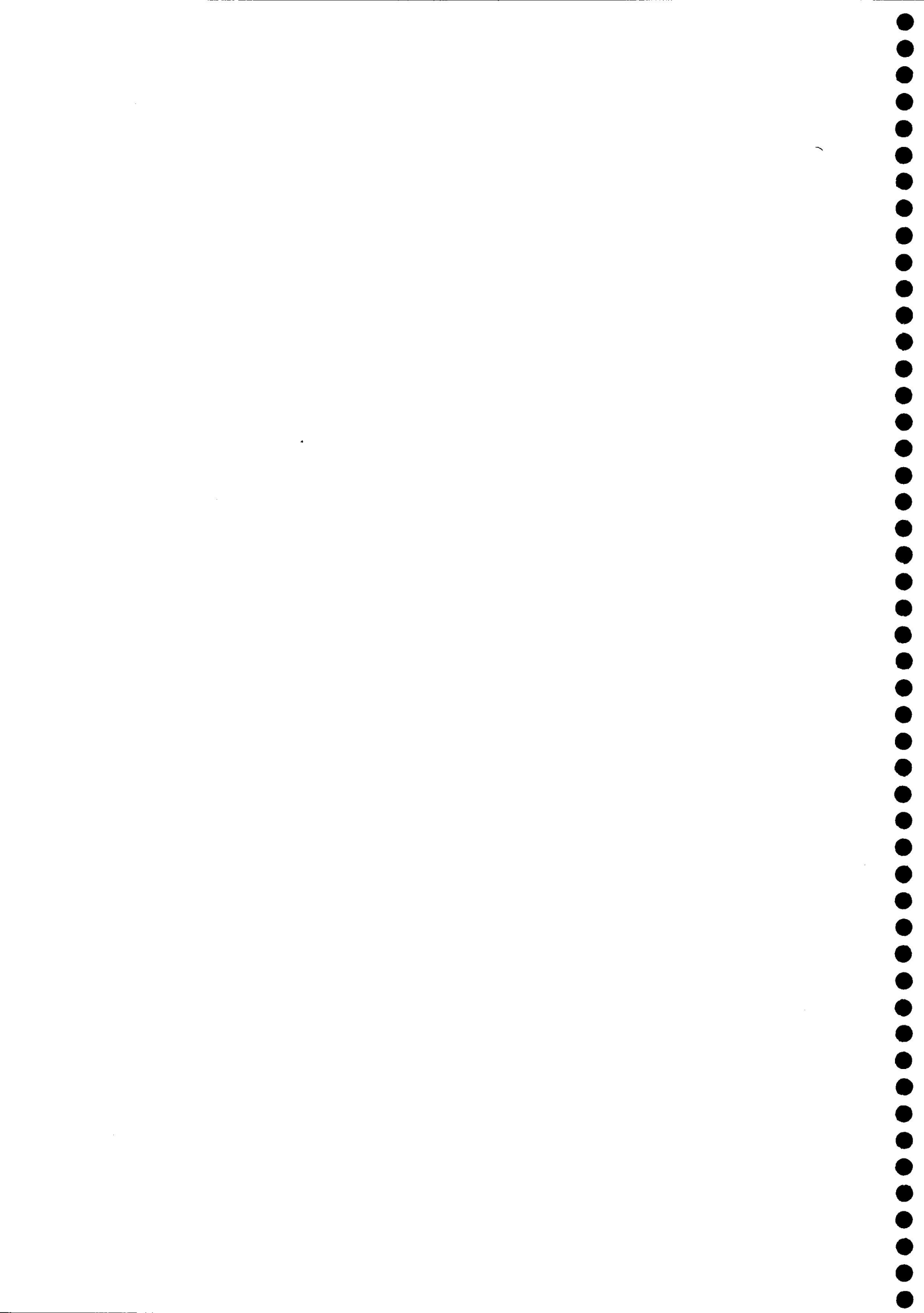
- 1.- Analizar la influencia de la aplicación de  $N-NO_3^-$  sobre la simbiosis *Phaseolus vulgaris-Rhizobium tropici*.
- 2.- Evaluar la sensibilidad de 3 variedades de judía, durante la etapa de germinación y en la simbiosis establecida, a la aplicación de NaCl.
- 3.- Valorar la respuesta al estrés salino (NaCl) de dos variedades de *Phaseolus vulgaris* en simbiosis con *Rhizobium tropici* cepa CIAT 899, aplicando la sal en diferentes estados de desarrollo del cultivo.
- 4.- Estudiar el comportamiento de las enzimas del metabolismo carbonado en la simbiosis *Phaseolus vulgaris-Rhizobium tropici*, tanto a nivel nodular como bacteroidal.







## II INTRODUCCION



## INTRODUCCION

### 1. Importancia de la fijación de nitrógeno en la agricultura

#### 1.1 Concepto de agricultura sostenible

La **agricultura sostenible** se caracteriza porque permite satisfacer las siempre cambiantes necesidades humanas mediante el uso adecuado de los recursos naturales, tratando de mantener o conservar el medio ambiente, permitiendo así que las especies que coexisten en este entorno biológico se desarrollen de una forma natural sin que sus ciclos de vida se vean interrumpidos (Bohloul *et al.* 1992). A lo largo de los años se han conocido diversas definiciones del concepto **sostenibilidad**, en la actualidad se acepta que el término involucra aspectos sociales tanto como económicos, tecnológicos y económicos. En el ámbito de la producción agrícola, el concepto agricultura sostenible se define como “aquella en la que los sistemas productivos permiten obtener beneficio continuo del uso del agua, suelo, recursos genéticos, trabajo, etc., para satisfacer las necesidades actuales de la población, sin destruir recursos naturales básicos para las generaciones futuras”.

No obstante, puesto que satisfacer las necesidades humanas ha sido la prioridad, ello a traído como consecuencia una sobreexplotación de recursos renovables y no renovables, y la intensificación en la producción de monocultivos, que lógicamente han provocado un desequilibrio en el medio ambiente.

#### 1.2 Fijación de nitrógeno en el contexto agrícola

Después del agua, el nitrógeno es el mayor factor limitante de la productividad agrícola, por lo que en muchas regiones el uso excesivo de fertilizantes nitrogenados se ha hecho una práctica común. Este hecho ha traído como consecuencia un elevado incremento en los costos de producción de los cultivos, que afecta principalmente a pequeños productores en países en vías de desarrollo, lo que aunado a las no siempre favorables políticas de apoyo a la productividad agrícola, ha provocado que el cultivo de

granos básicos sea económicamente inviable. En el medio ambiental se provoca una liberación de gases tóxicos a la atmósfera, la lixiviación de nitratos y nitritos a través del suelo dada su movilidad en el mismo y su posterior incorporación a las capas freáticas (Kinzing y Socolov, 1994).

La fijación biológica del nitrógeno (FBN) representa una buena práctica agrícola alternativa, que permite una solución, al menos parcial, de los problemas anteriormente señalados (Kammen, 1997), ya que se trata de una práctica económicamente viable y prudente desde un punto de vista ecológico (Bohlool, 1995; Brewin y Dahiya, 1997). Además, la FBN presenta otras ventajas adicionales sobre el uso de fertilizantes químicos, entre los que destacan: el incremento de la fertilidad y de la población microbiana del suelo; permite un mejor aprovechamiento del nitrógeno, ya que éste se enlaza a la materia orgánica del suelo y consecuentemente las pérdidas tanto por lixiviación como por volatilización se ven reducidas. Aún más, las leguminosas pueden ofrecer ventajas alternativas como agentes biológicos para la degradación o mineralización de plaguicidas y otros contaminantes del suelo (Walton y Anderson, 1990; Hsu y Bartha, 1979), ya que por un lado de manera indirecta puede estimular el metabolismo de los microorganismos de la rizosfera, o directamente por secuestro y/o degradación de estos contaminantes (Shimp *et al.* 1993; Stomp *et al.* 1994).

El proceso de FBN requiere grandes cantidades de fotosintetizados en forma de sacarosa para mantener los requerimientos del metabolismo del nódulo, como lo indican estudios llevados a cabo con soja, en los que se observó que se requieren aproximadamente 12.2 gramos de carbohidratos por cada gramo de nitrógeno fijado. Trasladado a un cultivo de soja en campo, esto significa que una hectárea del cultivo, que podría fijar hasta 75 kilogramos de nitrógeno, consumiría 1.5 toneladas de sacarosa en ese proceso (Brewin y Dahiya, 1997). Pese a ello, la sustitución del nitrógeno fijado biológicamente en los cultivos de leguminosas por la fertilización química con amoníaco producido por el proceso de Haber-Bosch es negativo desde el punto de vista del balance energético, ya que en el último caso es necesaria la utilización de 288 toneladas de combustible y un gasto económico de 30 billones de dólares al año.

Si bien los datos anteriores resaltan la conveniencia en el incremento del uso de FBN, existen diversas políticas a nivel social y económico que en países desarrollados, dada la solvencia de sus economías, hacen necesario implementar programas de trabajo e investigación en el campo, que estimulen el uso de cultivos que permitan el establecimiento de las asociaciones simbióticas entre las leguminosas y bacterias del género *Rhizobium* (Vance, 1998).

El panorama que se presenta en países en vías de desarrollo es diferente, ya que en ellos los costos que representa la fertilización nitrogenada es bastante elevado, aunado al hecho de que en muchos de ellos los canales de distribución de los fertilizantes no son los más adecuados. Debido a esta situación, el cultivo de leguminosas en esos países es una práctica común.

En estos países también es común el uso de cultivos múltiples y/o rotación de los mismos con leguminosas fijadoras de nitrógeno (Fujiata *et al.* 1992), que ofrecen muchas ventajas desde un punto de vista agrícola, social y económico, no únicamente a pequeños productores, sino también en el contexto de proyectos de desarrollo a nivel regional y nacional (Baudoin *et al.* 1997).

Desde un punto de vista alimenticio, las proteínas de origen vegetal en estos países representa el 83 % del total que se utiliza en el consumo humano, y de ese total, una proporción elevada tiene su origen en las leguminosas. (Maher *et al.* 1994).

## 2. Leguminosas

La familia de las leguminosas pertenece al grupo de las angiospermas dicotiledóneas, que incluye a tres subfamilias: Mimosoidae y Caesalpinoidae que comprenden árboles y arbustos, y Papilionoidae que incluye plantas de tipo herbáceo, entre ellas la judía (*Phaseolus vulgaris* L.).

### 2.1 *Phaseolus vulgaris*

La judía es cultivo anual y cuya procedencia se remonta hace mas de 7000 años en regiones de América Latina, particularmente Centroamérica.

Es una herbácea anual con gran variabilidad en los caracteres vegetativos, color y tamaño de las flores, forma y color de las vainas y semillas, etc. En general, todas tienen una raíz central bien desarrollada que crece rápidamente, con raíces laterales limitadas principalmente a la zona superior del suelo y que portan nódulos esféricos. Los tallos son delgados, retorcidos, angulosos y nerviados; también pueden ser trepadores que alcanzan dos o tres metros de altura y enanos de veinte a sesenta centímetros.

Según Solórzano y Engleman (1988), de los diferentes genotipos de judía se distinguen cuatro tipos de hábito: Tipo I, II, III y IV; en el tipo III se identificaron 3 subtipos: IIIa, IIIb, y IIIc (ver tabla 2.1)

Tabla 2.1.- Características de los tipos de hábito del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

Tipo	Crecimiento	Altura	Días de floración	Otras
I	Determinado	16-32 cm	43-58	De mata
II	Indeterminado	52-76 cm	57-73	Mateado
IIIa	Indeterminado	62-98 cm	50-68	De guía media no trepadora
IIIb	Indeterminado	100-200 cm	53-75	De guía media trepadora
IIIc	Indeterminado	110-298 cm	45-75	De guía trepadora
IV	Indeterminado	260-400 cm	45-85	De guía trepadora

### 3. Interacción *Rhizobium*-leguminosas

El establecimiento de la simbiosis entre las bacterias del género *Rhizobium* y plantas de la familia Leguminosae es un proceso complejo que implica una serie de etapas resultantes del intercambio de señales moleculares entre ambos simbioses, que regulan la expresión de genes que son los que desencadenan el proceso de infección y el desarrollo del nódulo. Para que esta interacción resulte efectiva, es

necesario que todos los eventos se manifiesten en el momento y con la intensidad adecuada.

### 3.1 Proceso de nodulación

La formación y desarrollo del nódulo puede dividirse en 3 fases generales (Sánchez *et al* 1991): a) preinfección; b) infección y formación del nódulo; c) funcionamiento de nódulo.

El primer evento que acontece es que la raíz exuda una señal molecular que, entre otros compuestos, contiene diferentes flavonoides y betaínas principalmente (Peters y Verma, 1990; Caetano-Anollés, 1997) a los que la bacteria responde con una quimiotaxia positiva, dirigiéndose a zonas localizadas de la raíz que generalmente corresponden al punto del meristemo apical. Además, en la bacteria se induce la expresión de los genes **nod** (Carson *et al.* 1994; Kondorosi, 1992; Brujin y Dwie, 1991), originando los factores Nod D que son excretados, y a los que las plantas responden provocando la primera reacción visible del inicio de la simbiosis: la deformación y curvatura del pelo radical (Yao y Vincent, 1969; Bauer, 1981; Campos *et al.* 1987), entonces la bacteria es atrapada inicialmente por una unión lábil de una proteína a un receptor de la planta y después una unión fuerte a las fibrillas de celulosa de la pared celular (Dazzo *et al.* 1984). A continuación se forma una lesión en la pared celular por acción hidrolítica de enzimas tanto de origen vegetal como bacteriano (Martínez - Molina y Olivares, 1982).

La bacteria penetra a través de una invaginación de la membrana plasmática. La planta reacciona generando nuevo material de pared celular, formándose una estructura tubular que crece hacia las células interiores de la corteza, originando de esa manera el canal de infección (Brewin, 1991; Turgeon y Bauer, 1985; Callaham y Torrey, 1981). El crecimiento del canal de infección es debido a la acumulación y fusión de vesículas derivadas del aparato de Golgi (Brewin, 1991; Verma y Zhong 1996). Durante el desarrollo del canal de infección, en la célula vegetal se observa un rearrreglo del núcleo, microtúbulos y citoplasma, formando otra estructura cónica: el canal de preinfección, el

cual, a su vez, es atravesado por el canal de infección (Brussel, *et al.* 1992). Se ha observado que la concentración de calcio aumenta o se redistribuye de manera especial en la zona que se forma el canal de infección. Finalmente, las bacterias son liberadas al citoplasma de la célula vegetal.

De manera paralela a la formación del canal de infección, o antes de que este se forme y como una respuesta a los factores Nod, se inicia el proceso de división celular en la corteza de la raíz y la inducción del meristemo nodular, este proceso es regulado por modulación hormonal entre auxinas y citoquininas (Zhang *et al.* 1996). Esta actividad meristemática puede inducirse previo al curvatura del pelo radical (Verma, 1992)

La localización del primordio nodular da origen a 2 formas principales de nódulos que presentan diferencias bastante marcadas en relación a su estructura y fisiología, estos son: **nódulos determinados e indeterminados**. En nódulos determinados, característicos de leguminosas tropicales como soja y judía, el meristemo se inicia en la corteza externa y tiene un patrón de crecimiento determinado. La actividad mitótica cesa tempranamente durante el desarrollo del nódulo, por lo que el crecimiento de éste se debe principalmente al alargamiento celular, dando como resultado una forma esférica.

En nódulos indeterminados el primordio se forma en la corteza interna (Dudley *et al.* 1987; Libbenga y Harkes, 1973), originándose un meristemo apical persistente, formando las nuevas células en el extremo terminal del nódulo. El crecimiento y funcionamiento ocurren simultáneamente, pudiéndose observar zonas intermedias de diferenciación.

Por su naturaleza química, los factores Nod son lipoquitinolisacáridos, ya que su estructura básica está formada por unidades (3 a 6) de N-acetilglucosamina unidas por enlaces  $\beta$  (1-4). Estos compuestos varían en la sustitución de grupos funcionales tanto en su extremo reductor como en el no reductor. En este último, un hidrógeno del grupo amino es sustituido por una cadena de ácido graso, que puede variar en longitud

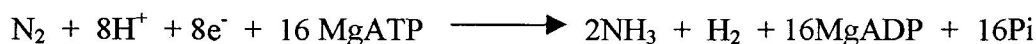


(18 a 26 átomos de C) y en grado de insaturación. También pueden darse modificaciones en C6 de este extremo (Carlson *et al.* 1994; Fellay *et al.* 1995)

En el caso de la unidad N-acetilglucosamina correspondiente al extremo reductor, puede tener sustituyentes como son radicales fucosil arabinosil, sulfatos ácido, etc., estos sustituyentes están relacionados con la especificidad del hospedero (Roche *et al.* 1996).

### 3.2 Actividad nitrogenasa

La actividad fijadora de nitrógeno está organizada en torno a la enzima **nitrogenasa**. Esta enzima cataliza la reacción:



en la que se requiere del aporte de 8 e<sup>-</sup> por molécula de nitrógeno, además de ATP, con la consecuente formación de H<sub>2</sub> que implica la desviación del 25 % de los electrones y, por lo tanto, una fuente de ineficiencia (Schubert y Evans, 1976; Dixon *et al.* 1981). No obstante, algunas cepas y/o especies de *Rhizobium* son capaces de reciclar el H<sub>2</sub> producido por medio de un sistema enzimático particular: la **hidrogenasa**.

La nitrogenasa es un complejo enzimático que consta de dos componentes proteicos denominados MoFe-proteína o componente I, y Fe-proteína o componente II. El componente I tiene un PM de 240 Kda, se trata de una proteína tetramérica  $\alpha_2\beta_2$  y sus subunidades son codificadas por los genes **nif D** y **nif K**. Presenta dos tipos de grupos prostéticos: el cofactor Fe-Mo (FeMoco) y el centro P, los cuales están distribuidos en pares a lados opuestos de la proteína. (Newton, 1997).

FeMoco contiene un átomo de molibdeno, 6 de Fe, 9 de S, y una molécula de homocitrato que, posiblemente, representa el sitio de unión y reducción del sustrato (Hawkes *et al.* 1994; Imperial *et al.* 1989). Se encuentra dentro de la subunidad alfa. Mientras tanto, el centro P consiste en dos cubos 4Fe-4S y que se enlazan a través de

uniones formadas por restos de cisteína y otro entre los S. La función del centro P es transferir los electrones entre la Fe-proteína y FeMoco. Además, parece que provee los sitios de enlace para la Fe-proteína.

La Fe-proteína es un homodímero con un PM de 60 Kda. Presenta sitios de enlace a Mg-ATP, y sirve como donador obligatorio de electrones a la FeMo-proteína y es codificada por los genes **nif H**.

El funcionamiento de la Nitrogenasa requiere de una atmósfera microaeróbica, una fuente de poder reductor y energía. Estas condiciones se deben a la naturaleza extremadamente lábil de la nitrogenasa frente al O<sub>2</sub>, ya que éste inactiva a los componentes I y II y al cofactor FeMoco (Robson y Postgate, 1980), además de que la reacción catalizada resulta ser fuertemente consumidora de energía.

Sin embargo, es un hecho que es necesaria la presencia de bajas concentraciones de O<sub>2</sub> ya que, además de ser éste el aceptor final de electrones en la cadena respiratoria y ser necesario para la producción de ATP, la naturaleza endotérmica de la reacción catalizada por la Nitrogenasa así lo requiere.

Existen diferentes mecanismos en las leguminosas que les permiten regular la concentración de O<sub>2</sub>. En los nódulos existe una hemoproteína asociada a la membrana que rodea al bacteroide y que transporta de manera selectiva al O<sub>2</sub>.

### 3.3 Estructura del nódulo

Los nódulos de las leguminosas están formados de una serie de capas de células externas que originan la corteza nodular y la llamada zona de infección.

La corteza propiamente dicha está constituida de varias capas (Brown y Walsh, 1994): la corteza externa, endodermis, corteza media o parénquima nodular y la corteza interna.

La corteza externa está formada por células grandes, pobremente empaquetadas y con grandes espacios intracelulares. La endodermis se considera una prolongación de la corteza radical. Cuando se trata de nódulos con crecimiento determinado, en esta capa se originan las llamadas escléridas, ya que las células se encuentran lignificadas. A continuación, hacia el interior del nódulo, se encuentra la corteza media, que se caracteriza por presentar células largas con grandes espacios intracelulares, sus paredes celulares no están lignificadas y es en esta región del nódulo donde están localizados los haces vasculares.

La corteza interna está formada por células perfectamente empaquetadas que aparentemente no presentan espacios intracelulares o son muy reducidos (Parson y Day, 1990). El grado de diferenciación entre estas zonas depende de las especies de leguminosas en estudio.

### 3.4 Barrera de difusión al oxígeno

Existen considerables evidencias, en base a mediciones fisiológicas y análisis matemáticos, que ponen de manifiesto la existencia de una barrera de difusión al Oxígeno en nódulos de leguminosas. El lugar exacto y modo de operación de esta barrera no se conocen sin lugar a dudas, hasta la fecha (Hunt y Layzell, 1993).

A nivel estructural esta barrera se encuentra localizada en la corteza interna, donde se presenta una capa de células muy bien empaquetadas, con espacios intracelulares sumamente reducidos y a la que se denominó **capa límite** (Parson y Day, 1990).

Purcell y Sinclair (1994) sugirieron un mecanismo osmocontráctil en la operación de la barrera de difusión. Posteriormente Serraj *et al.* (1995) mostraron evidencias anatómicas que sugerían que estaba localizada en la corteza interna, cuyas células podían colapsarse para reducir el tamaño de los espacios intracelulares y/o expeler agua dentro de ellos.

### 3.5 Metabolismo del carbono de la simbiosis

El establecimiento de la interacción *Rhizobium*-leguminosa implica un proceso cooperativo entre ambos simbioses. La planta fija y reduce el CO<sub>2</sub>, posteriormente transporta los fotosintetizados resultantes al nódulo. Este los utilizará como fuente de energía y esqueletos carbonados. A su vez, el bacteroide fija el nitrógeno atmosférico y lo reduce a amonio para posteriormente asimilarlo, por la vía glutamina sintetasa/ glutamato sintasa, en forma de ureidos o aminoácidos que, finalmente los transportará a través del xilema hacia la parte aérea. Este proceso adaptativo requiere de algunas demandas fisiológicas específicas que permitan a cada uno de los simbioses llevar a cabo de manera efectiva los eventos bioquímicos y fisiológicos correspondientes.

#### 3.5.1 Metabolismo carbonado en el citosol nodular.

Los carbohidratos son utilizados por el nódulo como fuente de carbono y energía en forma de ATP, así como de moléculas que aportan el poder reductor para llevar a cabo todas las reacciones necesarias para su crecimiento, desarrollo y mantenimiento, incluyendo el alto coste energético de la fijación del nitrógeno.

##### 3.5.1.1 Composición de metabolitos del nódulo

La sacarosa es el más abundante de los compuestos carbonados en nódulos de leguminosas (Schubert *et al.* 1995), en tanto que la glucosa y fructosa están presentes en menor proporción (Streeter, 1982; 1986; Lang *et al.* 1993).

Otros carbohidratos en menor proporción también han sido detectados en el nódulo, entre los que destacan derivados del ciclohexano como el mioinositol en soja, pinitol en lupino y trébol, y ornitol en guisante (Phillips *et al.* 1984; Streeter, 1987). También se han encontrado la trehalosa, que posiblemente es sintetizada en el bacteroide y exportada al nódulo (Streeter y Salminen, 1985), y el malonato.

### 3.5.1.2 Hidrólisis de la sacarosa

La sacarosa es transportada al nódulo vía floema y en éste puede ser metabolizada, bien sea por medio de la sacarosa sintasa, y/o por la invertasa alcalina.

En el caso de la SS, ésta tiene una actividad más importante durante el crecimiento vegetativo (Gordon, 1995), en tanto que la IA la tiene durante la etapa reproductiva. Al parecer la SS tiene una mayor relevancia en el metabolismo carbonado del nódulo (Craig, 1996), ya que mutantes de guisante con baja actividad SS no son capaces de fijar nitrógeno. Además, Anthon y Emerich (1990) observaron que en nódulos inefectivos de soja, la SS fue la única enzima que no se expresó. Desde el punto de vista energético, la hidrólisis vía SS es más favorable ya que implica únicamente 1 molécula de ATP consumida y la producción de pirofosfato (Plaxton, 1996). Otras condiciones dentro del nódulo favorecen esta vía, como la baja concentración de ATP y elevadas de PPi (Gordon, 1995).

La SS cataliza una reacción reversible en el metabolismo de la sacarosa que, en el sentido degradativo, por adición de una molécula uridín difosfato (UDP) produce uridín difosfato glucosa (UDPG) y fructosa (F). El UDPG formado es transformado a hexosa fosfatada por la enzima uridín difosfato glucosa pirofosforilasa (UDPGP).

Morel y Copeland (1989) caracterizaron a la SS como una enzima homotetramérica, con una subunidad molecular de 90 KDa. Posteriormente, Thummler y Verma (1987) observaron que la nodulina NGm-100 era idéntica a la subunidad de la SS.

La invertasa alcalina, por medio de una reacción irreversible, forma hexosas libres únicamente. La glucosa formada es fosfatada a glucosa-6 fosfato (G6P) por la hexoquinasa y la fructosa por la fructoquinasa.

La SS y la IA están presentes tanto en células infectadas como no infectadas, independientemente de que se trate de leguminosas transportadoras de ureidos o amidas.

Thummler y Verma (1987) atribuyeron a la SS cuatro funciones principales:

- 1.- Permite la formación de ácidos dicarboxílicos dadas las condiciones de actividad microaeróbica del nódulo.
- 2.- Aporta moléculas receptoras de  $\text{NH}_4^+$  durante la fijación del nitrógeno
- 3.- La UDPG puede ser usada por la planta para la síntesis de la pared celular.
- 4.- La UDPG puede ser convertida a ADP-glucosa, necesaria para la síntesis de almidón.

Los azúcares fosfatados son metabolizados por las rutas de Embden-Meyerhoff-Pharnas (EMP) y de las pentosas fosfato (PP).

### 3.5.2 Glucolisis

La glucolisis implica una serie de reacciones que inicia con la glucosa 6P que, en las fases iniciales de este proceso, es hidrolizada, originando dos azúcares de 3C: gliceraldehido-3P y dihidroxiacetona. En la parte final de este proceso el fosfoenolpiruvato formado puede ser transformado por la piruvato quinasa a piruvato, el cual, bajo condiciones de aerobiosis, produce acetil-coenzima-A que es oxidado por el ciclo de Krebs (Day y Copeland, 1991). Bajo condiciones de anaerobiosis la degradación es hasta  $\text{CO}_2$  y etanol.

Alternativamente, el fosfoenolpiruvato es carboxilado por la fosfoenolpiruvato carboxilasa originando oxalacetato. Esta reacción tiene una función muy importante tanto en la economía del carbono como en la fijación de nitrógeno (Day y Copeland 1991; Vance y Heichel, 1991; Vance y Gant 1992, por las razones que ha continuación se detallan:

- 1.- Reciclar el  $\text{CO}_2$  generado en la respiración
- 2.- Producción de substratos para la respiración (Rosendahl *et al.* 1990).
- 3.- Proveer de esqueletos carbonados para la fijación y asimilación del nitrógeno. (Christeller *et al.* 1977; King *et al.* 1986).
- 4.- Mantener el pH intracelular con un valor neutro (Israel y Jackson, 1983)

Existe una estrecha relación entre la fijación de nitrógeno y la fijación de dióxido de carbono vía PEPC (Vance *et al.* 1983; Maxwell *et al.* 84), ya que aproximadamente el 25% del carbono requerido puede ser aportado por esta enzima.

En leguminosas que transportan amidas, el CO<sub>2</sub> fijado por la fosfoenolpiruvato carboxilasa es utilizado para la asimilación y transporte de N, en tanto que en leguminosas tropicales transportadoras de ureidos es utilizado en la síntesis de intermediarios del Ciclo de Krebs, como son el ácido oxalacético y el 2-oxoglutarato.

La actividad PEPC es regulada por diferentes metabolitos como son las hexosas y triosas fosfato (Schuller, 1990) y los ácidos dicarboxílicos. Estos últimos tienen un efecto inhibitor. Puesto que en el nódulo existe el malato en altas concentraciones (Streeter, 1987), puede resultar un inhibidor bajo condiciones fisiológicas propicias. El mecanismo de inhibición está acoplado a la activación de esta enzima por la glucosa 6P y se ha observado tanto en leguminosas tropicales como templadas (Ocaña *et al.* 1996; Woo y Xu, 1998).

El ácido oxalacético generado durante la fijación oscura del CO<sub>2</sub>, es transformado a malato por la enzima malato deshidrogenasa. Su producción, al igual que la de otros ácidos dicarboxílicos, resulta ser un proceso adaptativo a las bajas concentraciones de Oxígeno en el nódulo (Vance y Heichel, 1991), necesario para mantener la actividad Nitrogenasa (Layzell, 1993). Su producción está íntimamente relacionada a la asimilación de nitrógeno en nódulos. Aumentos en la concentración de malato se correlacionan con el incremento de la actividad malato deshidrogenasa (Eagli *et al.* 1989; Haaker *et al.* 1995).

El malato originado puede ser descarboxilado a piruvato y CO<sub>2</sub>, con la concomitante reducción del piridín nucleótido (NADP<sup>+</sup> ó NAD<sup>+</sup>), por la acción catalítica del enzima málico.

El piruvato así formado es convertido a acetil-CoA por la piruvato deshidrogenasa. Alternativamente, el acetil-CoA puede generarse a partir de ácido

oxalacético por acción combinada de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), piruvato quinasa (PK) y piruvato deshidrogenasa.

### 3.5.3 Ruta de las pentosas fosfato

La ruta de las pentosas fosfato se inicia con dos reacciones de oxidación catalizadas por la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.49) y la 6 fosfogluconato deshidrogenasa (EC 1.1.1.42). Ambas fueron descritas por primera vez por Ronson y Primrose (1979) y posteriormente los demás enzimas de la ruta fueron establecidos por Saroso *et al.*, (1986) y Mc Kay *et al.*, (1989).

La glucosa-6-P deshidrogenasa (G6PDH) ha sido purificada del citosol vegetal en nódulos de soja (Hong y Copeland, 1991). Se detectan dos isoenzimas con una regulación que puede ser importante en el control de la vía de las pentosas fosfato. La 6 fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH) también ha sido caracterizada en el mismo material simbiótico (Hong y Copeland, 1992) detectando dos isoenzimas específicas por el NADP<sup>+</sup>. Presentan un máximo de actividad a pH 8.6 y 8.9 respectivamente. Son muy lábiles en ausencia de 2 mercaptoetanol, requieren para su estabilidad adición de glicerol y fosfato y 2 mercaptoetanol. Esta enzima tiene una afinidad similar por la forma reducida y oxidada de piridín nucleótido, por tanto la relación NADPH<sup>+</sup>/NADP<sup>+</sup> debe ser importante en la regulación enzimática. Como NADPH<sup>+</sup> es un potente inhibidor de la G6PDH (Hong y Copeland, 1991) es probable que exista un control coordinado en los dos primeros pasos de la vía de las pentosas fosfato.

Se considera como ruta alternativa de la rotura de carbohidratos la vía de las pentosas-fosfato que funciona generando NADPH utilizado en reacciones biosintéticas (Anthon y Emerich, 1990) y precursores biosintéticos como ribosa-5P y eritrosa-4P (Copeland y Turner, 1987). El catabolismo de las pentosas lo relacionan otros autores con la formación de ácidos aromáticos y metabolitos secundarios (Dilworth *et al.*, 1986; Chen *et al.*, 1989).



Utilizando nódulos de *Lupinus* se comprobó que esta vía contribuye escasamente a la oxidación de la glucosa (Laing *et al.*, 1979). Sin embargo, cuando Hong y Copeland (1990) estudiaron la localización subcelular de las enzimas relacionadas con la vía de las PP en nódulos de *Glycine max* demostraron que están asociadas a los plastidios y a la fracción soluble del nódulo y que la actividad específica de las enzimas implicadas incrementa con el desarrollo del nódulo. En un estudio comparativo de la utilización de esta vía oxidativa por leguminosas transportadoras de ureidos y de aminos se comprobó que la actividad específica de las enzimas de la vía de las pentosas fosfato es mayor en nódulos exportadores de ureidos (Hong y Copeland, 1990).

Los rizobios en vida libre de crecimiento rápido como *R. leguminosarum* poseen la ruta oxidativa de las pentosas-fosfato, de la que carecen los de crecimiento lento como *B. japonicum*. La evidencia de la vía de las pentosas-fosfato se ha basado habitualmente en la presencia de la actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa. Sin embargo, la presencia de la primera enzima de la vía no es una prueba inequívoca de que el ciclo completo está presente. Mc Kay *et al.* (1989) han demostrado la existencia de todas las enzimas de esta ruta en *R. leguminosarum* MNF300. Por el contrario, los bacteroides tienen limitada su capacidad de utilizar los carbohidratos mediante esta vía (Copeland *et al.*, 1989). Excepcionalmente se han encontrado algunas enzimas de la vía de las PP en bacteroides de *R. leguminosarum*. Sin embargo, no se han encontrado estas enzimas en bacteroides de *Bradyrhizobium japonicum* (Saroso *et al.*, 1984)

#### 3.5.4 Rutas fermentativas

Bajo condiciones aeróbicas, durante la respiración el oxígeno es el aceptor final de electrones, pero bajo condiciones de anaerobiosis, el etanol y el lactato son los aceptores finales de electrones. Estos compuestos son reducidos por el NADH.

En la formación de etanol, el piruvato es descarboxilado a acetaldehído a través de la piruvato descarboxilasa y, posteriormente, este compuesto es reducido a etanol por la alcohol deshidrogenasa. Alternativamente, el piruvato puede ser reducido directamente a lactato por la lactato deshidrogenasa.

Dada su naturaleza microaeróbica, el citosol nodular tiene un metabolismo anaeróbico semejante al de plantas tolerantes que desarrollan en condiciones de anegamiento (De Vries *et al.* 19), donde ocurren comúnmente las reacciones de la ruta fermentativa.

La actividad alcohol deshidrogenasa se ha encontrado en el citosol nodular de varias leguminosas, lo que sugiere que la vía fermentativa está ampliamente distribuida en esos cultivos (Tajima y La Rue, 1982; Thynn y Werner, 1990, 1996). Una función de esta deshidrogenasa en plantas es la de catalizar la reacción reversible en la que se reduce acetaldehído a etanol generando  $\text{NAD}^+$ , lo que permite el mantenimiento de niveles suficientes de ATP durante períodos de privación de oxígeno. Además, ayuda a mantener el pH citoplasmático, ya que la fermentación alcohólica, a diferencia de la láctica, no resulta en una acidificación del citoplasma (Roberts *et al.* 1984).

Estudios previos han indicado que ambas deshidrogenasas son fuertemente inducidas bajo condiciones anaeróbicas y, en los casos de soja y haba, la alcohol deshidrogenasa incrementó su actividad hasta siete veces (Waters *et al.* 1991; Andrews *et al.* 1993; 1994; Russel *et al.* 1990; Thynn y Werner, 1990). Ambas presentan patrones de expresión e inducción muy similares.

La adición de cloruro sódico al medio de crecimiento estimuló tanto la actividad alcohol deshidrogenasa como la lactato deshidrogenasa en raíces de diferentes genotipos de trigo, aunque esa respuesta no se correlacionó con el crecimiento o rendimiento del cultivo. Incluso en algunos casos parecen ser más sensibles las actividades enzimáticas que la respuesta de crecimiento (Akhtar *et al.* 1998; 1994).

### 3.5.5 Ciclo de ácidos tricarbónicos

El ácido oxalacético generado vía PEPC-MDH puede ser metabolizado a través del ciclo de los ácidos tricarbónicos. La primera reacción que ocurre es la condensación de ácido oxalacético con acetyl-CoA, formando así el citrato que, a través

de una serie de reacciones de oxido-reducción, genera poder reductor e intermediarios biosintéticos (Ting, 1982).

Una enzima de suma importancia dentro de Krebs es la NADP-ICDH, que cataliza la conversión de isocitrato a 2-oxoglutarato. Su distribución dentro de las células es de cerca del 90% en el citosol y su síntesis y activación requiere la presencia de metales divalentes. Adicionalmente, esta enzima regula el flujo del carbono hacia las vías de asimilación del nitrógeno, (Fieuw *et al.* 1994; Gallardo *et al.* 1995; Gálvez y Gadal, 1995).

### 3.6 El simbiosoma

El término simbiosoma, acuñado por Roth *et al.* (1988) define a las organelas endosimbióticas en general. En la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa vendría definido por el **bacteroide**, el **espacio peribacteroidal** (EPB) y la **membrana peribacteroidal** (MPB) como unidad funcional o **unidad peribacteroidal** (UPB). Sin embargo, Smith y Smith (1990) han criticado esta terminología.

Como sucede en muchas de la asociaciones simbióticas, al liberarse las bacterias al citoplasma de la célula vegetal, éstas son rodeadas por una membrana de naturaleza vegetal, dando origen al simbiosoma, considerándose a éste como la unidad fijadora de nitrógeno. Este compartimento (simbiosoma) es de suma importancia en la simbiosis, ya que permite el aislamiento de la célula bacteriana ya diferenciada (Roth *et al.*, 1988; Verma y Hong, 1996).

Cuando la bacteria se encuentra en esta forma endosimbiótica presenta una forma y tamaño diferentes a los que normalmente tiene cuando crece en vida libre, y son diferenciadas en bacteroides. Bajo estas condiciones el contenido de ADN incrementa de 4 a 8 veces (Bisseling *et al.* 1977).

### 3.7 Membrana peribacteroidal

La membrana peribacteroidal (MPB) tiene dos funciones importantes en la simbiosis: aislar al endosimbionte de la célula vegetal, y regular el intercambio y transporte de metabolitos entre la célula vegetal y la bacteria por medio de nodulinas localizadas específicamente en la MPB (Verma y Fortin 1988; ). Además, la MPB influye en la efectividad del nódulo, ya que simbiosis poco efectivas presentan una MPB desintegrada o poco desarrollada.

Si bien la MPB es de origen vegetal (Roy y Stayce, 1989), *Rhizobium* también influye en su biogénesis, ya sea por contribuir en el suministro de proteínas durante su formación o por secreción de señales moleculares de naturaleza semejante a los factores Nod y que controlan el flujo de las vesículas a la MPB (Verma y Zhong, 1996). Estas señales son denominadas factores EDO (factores de endocitosis).

La MPB tiene una naturaleza proteica y lipídica diferente de otras membranas vegetales (Verma, 1992; Perotto *et al.* 1995). Se origina desde la membrana plasmática durante la endocitosis (Verma *et al.* 1978) por liberación de vesículas originadas en el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico (Hoblein *et al.* 1994), de manera paralela a la liberación de la bacteria desde el canal de infección.. En la proliferación de la MPB se requiere la síntesis masiva de lípidos y proteínas, y las vesículas antes mencionadas

### 3.8 El espacio peribacteroidal

El espacio confinado entre el microsimbionte encapsulado y la MPB es conocido como espacio peribacteroidal (EPB). Es un compartimento especializado rodeado por la MPB. De Felipe *et al.* (1995) encontraron que en nódulos de *Lupinus albus* y *Phaseolus vulgaris* es muy limitado.

Como sucede en muchas simbiosis, están presentes sistemas enzimáticos tanto de origen vegetal como bacteriano (Smith y Douglas, 1987; Smith y Smith, 1990; Verma y Hong, 1996)), como son ATPasas (de la MPB) y pirofosfatasa (bacterianas)

que energizan la MPB y que afectan el movimiento de iones, la capacidad amortiguadora y acidificación del EPB. Para contrarrestar estos efectos negativos sobre el EPB, éste es equilibrado con diferentes metabolitos como son ácidos dicarboxílicos, además de la apertura de canales específicos en la MPB, como lo es la nodulina 26 que facilita el transporte activo de metabolitos. El EPB contiene otras proteínas como son  $\alpha$ -manosidasas y otras enzimas hidrolíticas (Mellor y Werner, 1987).

### 3.9. El bacteroide

Cuando el *Rhizobium* en el simbiosoma se diferencia a su forma endosimbiótica origina al bacteroide propiamente dicho, el cual, en esas condiciones, es capaz de fijar nitrógeno molecular (Newcomb, 1981; Roth *et al.* 1988). De manera concomitante a la diferenciación del bacteroide, el polisacárido de reserva, glucógeno, presente en la bacteria cuando crece en vida libre, desaparece, haciéndose evidentes reservas en forma de polihidroxibutirato (PHB) que en la bacteria normalmente se presenta en pequeñas cantidades (Tajima *et al.* 1986).

#### 3.9.1 Metabolismo del carbono en el bacteroide

Para una eficiente fijación de nitrógeno por el bacteroide es necesario que éste tenga un suministro adecuado de esqueletos carbonados, poder reductor y ATP. Aunque una amplia variedad de compuestos están disponibles en el nódulo para servir como fuente de carbono y energía, solo determinados compuestos son utilizados para tales fines.

##### 3.9.1.1 Substratos carbonados

Si bien los *Rhizobium* en vida libre son capaces de crecer utilizando como fuentes de carbono azúcares, ácidos dicarboxílicos y otros compuestos aromáticos, en los bacteroides existe una preferencia sobre determinados substratos que es debida a la selectividad de la MPB. Una serie de evidencias proponen que los ácidos dicarboxílicos son la principal fuente de carbono para los bacteroides:

- a) Malato, succinato y fumarato, se encuentran en altas concentraciones en el nódulo (Vance y Heichel, 1991).
- b) Con excepción del aspartato, los ácidos dicarboxílicos son rápida y preferentemente transportados a través de la MPB, por medio de un mecanismo activo.
- c) Los bacteroides poseen un sistema de transporte de ácidos dicarboxílicos constitutivo (*dct*). Mutantes defectivos en este sistema forman nódulos incapaces de fijar nitrógeno (Ronsson *et al.* 1981; Arwas *et al.* 1985; Engelke *et al.* 1987).
- d) Para que los bacteroides fijen nitrógeno efectivamente es imprescindible la funcionalidad de Ciclo de Krebs. Mutantes que carezcan de alguna enzima de este ciclo, como la succinato deshidrogenasa o  $\alpha$ -cetoglutarato quinasa, (Duncan y Fraenkel, 1979; Gardiol *et al.* 1982) resultan inefectivos, mientras que mutantes que carecen del sistema de transporte de carbohidratos no afectan el establecimiento de la simbiosis.
- e) En bacteroides aislados, los ácidos dicarboxílicos soportan altos niveles de actividad nitrogenasa (Bergensen y Turner, 1967; Delgado *et al.* 1993).

También se ha puesto en evidencia de que los aminoácidos pudieran servir como fuente de carbono o energía a los bacteroides. (Khol *et al.* 1994). Así, los aminoácidos glutamato y prolina aumentaron la respiración y favorecieron la fijación de nitrógeno en bacteroides aislados, aunque parece ser que esto fue debido a la desaminación del aminoácido (Bergensen *et al.* 1990; Zhu *et al.* 1992). La prolina también se considera una importante fuente de carbono para bacteroides de *Bradyrhizobium japonicum* (Zhu *et al.*, 1992). Sin embargo, el gen que codifica la enzima clave de la síntesis de la prolina se localiza en el citosol de las células infectadas (Szoke *et al.*, 1992) lo que implica el transporte a los bacteroides de los nódulos de soja (Udvardi *et al.*, 1990) y de "cowpea" (Glenn *et al.*, 1991) sin haberse detectado transportador de prolina en la membrana del bacteroide ni en la MPB. Por tanto, la posibilidad de que la prolina sea una fuente de carbono se discute, pudiendo tener un significado importante en condiciones de estrés (Kohl *et al.*, 1994).

### 3.9.1. Vías metabólicas en el bacteroide

Aunque las enzimas relacionadas con la oxidación de carbohidratos han sido detectadas en el bacteroide, el nivel de las mismas es muy bajo (Streeter, 1991). La incapacidad del bacteroide para metabolizar glucosa (Stowers, 1985) se correlacionó con la baja actividad de las enzimas que degradan azúcares en *Rhizobium leguminosarum* (Gleen *et al.* 1984). No obstante, la glucosa actúa como fuente de energía en aislados de judía y soja (Trinchant *et al.* 1981, 1983).

Saroso *et al.* (1985) encontraron, en *Rhizobium* NGR 234, baja actividad fosfofructoquinasa y fructosa, 1-6 bifosfato, por lo que es probable que la vía de Embden-Meyerhoff-Parnas no sea significativa en el catabolismo de los azúcares, lo cual sugiere que el metabolismo sea a través de las rutas ED\*\*\*\* y pentosas fosfato.

#### a) Ciclo de los ácidos tricarboxílicos

La funcionalidad de este ciclo es imprescindible para la fijación de nitrógeno (Streeter, 1991; Vance y Heichel, 1991). Intermediarios biosintéticos de los ácidos tricarboxílicos, generados por acción de enzimas anapleróticas también han sido detectados, aunque algunas enzimas como la fosfoenolpiruvato carboxilasa no están presentes en el bacteroide. El ácido málico generado en el citosol nodular por acción de la PEPC-MDH es transportado al interior del bacteroide, donde es metabolizado a través del ciclo de los tricarboxílicos, requiriéndose, además, del aporte de acetyl-CoA, la cual puede originarse por la acción descarboxilante de la piruvato deshidrogenasa sobre el piruvato. La posible fuente de este ácido es la descarboxilación oxidativa del ácido oxalacético mediada por la enzima málico, quedando descartada la vía en la que intervienen las enzimas PEPCK y PK, ya que los bacteroides no poseen estas enzimas (Saroso *et al.*, 1986). El ciclo de Krebs es la ruta metabólica por medio de la cual los fotosintetizados generados en las leguminosas son metabolizados para producir energía en forma de ATP (Gardiol *et al.* 1987).

Alternativamente, los bacteroides han logrado desarrollar rutas metabólicas acopladas al ciclo de los ácidos tricarboxílicos que le dan la posibilidad de degradar los ácidos orgánicos producidos en el citosol nodular, además de producir intermediarios biosintéticos necesarios para la actividad nitrogenasa.

### **b) Ciclo de los ácidos dicarboxílicos**

Este ciclo permite la formación de compuestos de cuatro carbonos que aportan esqueletos carbonados para la asimilación del amonio y formación de aminoácidos (Urakami *et al.* 1983): Un producto importante de este ciclo es el ácido málico, el cual puede ser reutilizado mediante el ciclo de Krebs.

### **c) Ciclo del ácido $\gamma$ -aminobutírico**

Una vía alternativa en el catabolismo del glutamato es la del  $\gamma$ -aminobutírico. La descarboxilación de isocitrato genera 2-oxoglutarato. Posteriormente, por acción de diversas enzimas relacionadas con la asimilación del amonio (GDH, GS y GOGAT) se origina glutamato, que puede permitir la formación de 4-aminobutirato por acción catalítica de la glutamato descarboxilasa. Este compuesto, generado por acción enzimática de la  $\gamma$ -aminotransferasa, origina succinato. Resultados obtenidos por Salminen y Streeter (1990) indican que la baja actividad de oxoglutarato deshidrogenasa pudiera deberse a una inhibición "in vivo" en los bacteroides, además de los altos niveles de la relación NADH/NAD.

Labidi *et al.* (1996) demostraron que mutantes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* fueron incapaces de crecer con histidina y aminobutirato como únicas fuente de carbono y nitrógeno y que, posiblemente, otros aminoácidos metabolizados a través del glutamato pudieron ser una importante fuente de carbono para los bacteroides.



#### d) Ciclo del poli- $\beta$ -hidroxibutirato

El poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) es un poliéster de reserva que puede llegar a constituir del 50 al 70 % del peso seco del bacteroide (Wong y Evans, 1970). Aparentemente se acumula cuando existe un exceso en el aporte de esqueletos carbonado. Es considerado además un sustrato adecuado para mantener la respiración y fijación de nitrógeno por parte de los bacteroides cuando el aporte de fotosintetizados al nódulo se ve reducido por algún factor físico y tipo de estrés (Kim y Copeland, 1996). Sin embargo, la fijación de nitrógeno no parece ser dependiente de este polímero, ya que mutantes de *Rhizbium meliloti* y *Rhizobium etli* incapaces de sintetizar PHB no redujeron su capacidad para fijar nitrógeno simbióticamente (Ceballos *et al.* 1996; Povolo *et al.* 1994; Tombolini *et al.* 1995). Sin embargo, algunas especies de bacteroides no acumulan PHB y la razón de que esto suceda no está completamente esclarecida.

Copeland y Kim (1995), mediante estudios cromatográficos, confirmaron la acumulación de PHB en bacteroides y células crecidas en vida libre en soja, en tanto que en garbanzo solo se detectaron trazas. Adicionalmente, determinaron la actividad de las enzimas relacionadas directamente con la síntesis (3-cetotiolasa y aceto acetil-CoA reductasa) y degradación del PHB (PHB-despolimerasa y 3-Hidroxibutirato deshidrogenasa), así como algunas relacionadas a éstas (MDH e ICDH), encontrando que el nivel de actividad de estas enzima fue similar en bacteroides y extractos de células en soja, mientras que en garbanzo se apreciaron diferencias, por lo que sugirieron que ésto, junto con la condiciones que prevalecen en el nódulo, serían determinantes en la acumulación de PHB.

La actividad Nitrogenasa puede inhibirse por elevadas concentraciones de sustratos (succinato o malato), ya que la Enzima málico (NAD ó NADP dependiente), podría redirigir el flujo de carbono hacia la producción del polisacárido polihidroxibutirato (PHB) que, como ya se mencionó, puede representar el 70 % del peso seco en bacteroides. (Trinchant, 1994). La acumulación de grandes cantidades de PHB sugiere que la cantidad de sustratos liberados en el bacteroide excede a lo requerido (Day y Copeland, 1991).

### e) Rutas fermentativas

Bajo condiciones microaeróbicas, el piruvato puede ser metabolizado a través de las rutas fermentativas, bien sea por la enzima alanina deshidrogenasa generando alanina, o bien por acción de la LDH originando lactato, y también por acción de la ADH para formar alcohol (Tajima *et al.* 1986; Suganuma y Yamamoto, 1987).

### 3.9.2 Transporte de compuestos a través de la MPB

Como ya se puso de manifiesto, los ácidos dicarboxílicos son la mayor fuente de carbono para el bacteroide, por lo que es lógico suponer la presencia de transportadores de estos compuestos en la MPB. En soja, la MPB posee un cargador que actúa como uniporte para el ion dicarboxilato. Se trata de un mecanismo pasivo, que se genera de un diferencial de potencial eléctrico a través de la MPB, con el subsecuente transporte y metabolismo por los bacteroides. Este transportador es diferente al de otras membranas y del DcTA del bacteroide. Aunque se postula que la nodulina 26 de la MPB es el propio transportador, es necesario realizar estudios más detallados al respecto. Esta nodulina es fosforilada por una proteína quinasa, y el mecanismo de fosforilación con el transporte de malato en el simbiosoma.

Con relación al transporte de amonio, cuando los *Rhizobium* crecen en vida libre, éste puede ser a través de dos vías: I) difusión simple; II) transportadores de amonio (Amt). Este último ocurre cuando la concentración de amonio en el medio es baja. Sin embargo, en bacteroides, este sistema no se expresa, por lo que la mayoría del amonio producido durante la fijación de nitrógeno no es asimilado por el bacteroide.

### 3.9.3 Respiración bacteroidal

Por la naturaleza aeróbica del *Rhizobium* es necesaria la presencia de O<sub>2</sub> para generar ATP, debido al alto coste energético de la fijación de nitrógeno. Sin embargo, el O<sub>2</sub> libre puede causar también una rápida e irreversible inactivación del complejo enzimático de la Nitrogenasa.

Esta aparentemente contradictoria situación es resuelta por la existencia de un complejo sistema de respiración bacteroidal de alta afinidad que es capaz de atrapar al O<sub>2</sub> en esas condiciones de bajísima concentración.

Kahan *et al.* (1985) sugirieron un modelo en el cual un aminoácido, el glutamato, actúa como cargador de carbono y energía hacia el bacteroide. Posteriormente Salminen y Streeter (1987) demostraron la absorción, incorporación y respiración de glutamato marcado radioactivamente. En estudios efectuados por Bergensen y Turner (1988) se observó que tanto la respiración bacteroidal como la fijación de nitrógeno eran estimuladas por la adición de glutamato. Actualmente, se ha demostrado que otros substratos como succinato, lactato y glucosa también incrementan la respiración y fijación.

#### 4. Salinidad

En la actualidad, la salinidad se considera el principal tipo de estrés abiótico que afecta la productividad agrícola. Más aún, las áreas que presentan esta problemática incrementan anualmente, especialmente en zonas áridas y semiáridas.

Diferentes factores contribuyen al incremento en la problemática de la salinidad, entre los que se tienen:

- Incremento de áreas irrigadas
- Incorporación de nuevas áreas a la agricultura, cuyas características no son aptas para tal uso
- Baja calidad del agua de riego
- Sobrepastoreo
- Deforestación
- Aplicación de agroquímicos

No obstante, es posible dar un uso agrícola a suelos con esas características para mantener una producción sostenible y beneficiosa, siempre y cuando se tomen decisiones de manejo adecuado de estas áreas. Para ello se hace necesario, por un lado, el tratamiento adecuado de estos suelos y, paralelamente, entender como los cultivos responden a las sales en sus diferentes estados de desarrollo, la tolerancia de los mismos, etc. El problema de la salinidad ha sido intensamente estudiado dada su compleja naturaleza, así como la diferencia en cuanto a condiciones ambientales y respuestas de las plantas.

De acuerdo a la susceptibilidad de las plantas cuando son sometidas a la salinidad, son clasificadas en: halofitas y glicofitas. Las halofitas comprende aquellas especies que son capaces de desarrollar en suelos salinos, y pueden ser halofitas facultativas y obligadas. Las plantas glicofitas son especies que se afectan grandemente cuando en el medio de crecimiento existen altas concentraciones de sal.

### **4.1 Mecanismos de tolerancia**

El primer efecto de la sal es una caída en el potencial hídrico y conductividad hidráulica del suelo (Ganicheva *et al.* 1988), lo que afecta la disponibilidad del agua en la interfase del suelo y la raíz, con una consecuente acumulación de la sal, originando un estrés osmótico y finalmente un efecto tóxico iónico.

Las plantas en general responden al estrés salino por medio de dos estrategias: exclusión de iones y compartimentación de iones.

#### **4.1.1 Exclusión de iones**

En el caso de las leguminosas, en general adoptan la estrategia glicofita que se caracteriza por la exclusión de sales de la parte aérea (Lauchli, 1984; Keating y Fisher, 1985). Sin embargo, la sensibilidad a la sal por estos cultivos está relacionada con la incapacidad para evitar la acumulación de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , o el grado de sensibilidad a estos iones. Es probable que la tolerancia dependa de la capacidad de las raíces para

limitar el acceso de los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  (Rhales y Samaras, 1994). Así, cultivares tolerantes de *Trifolium repens* acumularon menos iones  $\text{Cl}^-$  en la parte aérea que cultivares sensibles.

La absorción limitada de  $\text{Na}^+$  es considerada una característica relacionada a la tolerancia en determinados cultivos (Fortmeier y Schubert, 1995; Subba Rao *et al.* 1990). Sin embargo, en cultivos de *Gossypium* la acumulación de  $\text{Na}^+$  se relacionó a la sensibilidad a la sal, en tanto que para otros cultivos la tolerancia a la sal está relacionada con la acumulación de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  (Läuchli y Steler, 1982). Más aún, He y Cramer (1993) no encontraron diferencias en la acumulación de iones en especies de *Brassica* que difieren en tolerancia a la sal.

Diversos mecanismos están implicados en la exclusión de iones:

- Reducción del influjo de las células del plasmalema de la raíz (Schubert y Läuchli, 1986)
- Eflujo desde la raíz (Lessani y Marschner, 1987)
- Reabsorción en el parénquima del xilema (Yeo *et al.* 1977)
- Removilización fuera de las hojas (Lessani y Marchner, 1978).

#### 4.1.2 Compartimentación

Las plantas crecidas en altas concentraciones de  $\text{NaCl}$  en el medio responden a la sal ajustándose osmóticamente vía un doble mecanismo: acumulación de iones inorgánicos en la vacuola, y acumulación de solutos orgánicos en el citoplasma (Greeway y Munns, 1980; Wyn Jones y Gorhan, 1986; Flowers y Yeo, 1988; MacCue y Hanson, 1990). La absorción de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  observada ocurre solamente para mantener el potencial hídrico celular (Bernstein, 1963), pero esta absorción resulta tóxica para el metabolismo celular, por lo que se hace necesario su compartimentación en la vacuola y su exclusión del citoplasma. Así, Harvey *et al.* (1981) detectaron una gran acumulación de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en las vacuolas de hojas de *S. maritima* y bajas en el

citoplasma. El secuestro de estos iones proveen solutos energéticamente más económicos para el ajuste osmótico (Flowers *et al.* 1977; Yeo, 1983).

Las leguminosas, bajo condiciones de estrés salino, acumulan diversos solutos orgánicos como aminoácidos y carbohidratos para ajustarse osmóticamente, modificando la distribución de estos compuestos en la planta con relación a plantas no tratadas con NaCl (Soussi *et al.* 1998; Cordovilla *et al.* 1995; Fougere *et al.* 1991). Estos solutos orgánicos no son inhibidores del metabolismo y son acumulados principalmente en el citoplasma de la célula y en mucho menor proporción en las vacuolas (Maraim, 1990). La acumulación de prolina en respuesta al tratamiento salino está reconocido como mecanismo de tolerancia a la sal.

El nivel de producción y tipo de carbohidrato producido en plantas puede inducir tolerancia al estrés salino (Tarczynski *et al.* 1993; Thomas *et al.* 1995; Pilon-Smits *et al.* 1995; Holmstrom *et al.* 1996). No obstante, esta respuesta es transitoria y únicamente resulta ser importante durante las fases iniciales del estrés y se corresponde con el efecto negativo sobre la fotosíntesis, ya que cuando la planta se aclimata al estrés, los niveles retornan a su estado normales (Gilbert *et al.* 1997).

## 4.2 Procesos fisiológicos afectados por el estrés salino

### 4.2.1 Salinidad en germinación

El efecto negativo de la salinidad varía ampliamente en los diferentes estados de desarrollo de los cultivos (Mass y Hoffman, 1977; Shanon, 1979; Rogers *et al.* 92, 1995). En cultivos como girasol, judía, trébol y guisante, la sensibilidad se evidencia más en plantas durante el estado adulto, y ello es consecuencia de un proceso evolutivo no adaptativo, en tanto que en cultivos como soja y tomate lo son durante la germinación, debido a una evolución adaptativa (Ansari *et al.* 1980; Guerrier 1983b; Bourgeais-Chaillou *et al.* 1992).

La tolerancia a la salinidad durante la germinación es crucial para el establecimiento de los cultivos (Khan, 1991), pero la tolerancia en esta etapa no es indicativo que la planta lo sea en el estado adulto.

Estudios tempranos han demostrado que la zona del suelo donde germina la semilla es más salina que aquella donde se establece el crecimiento de la planta, ya que es en la superficie donde se da el fenómeno de evapotranspiración (Bernstein y Hayward, 1958).

La reducción de la germinación por el estrés salino es debida al efecto osmótico que disminuye la disponibilidad de agua para la semilla, y al efecto tóxico (Redman, 1974; Macharia *et al.* 1995), aunque Bliss *et al.* (1987) encontraron que los requerimientos de agua son similares, por lo que atribuyeron la disminución únicamente al efecto iónico. La interacción de ambos factores induce una disminución en el porcentaje y la velocidad de germinación (Belkhodja y Soltani, 1992), en tanto que el índice de germinación es más sensible a la sal que el porcentaje de germinación (Lovato, 1994; Marcar, 1987; West y Taylor, 1981).

La acumulación de osmolitos durante la germinación bajo condiciones de salinidad ha sido observada en diferentes cultivos como un mecanismo adaptativo para compensar la osmolaridad externa y/o los iones compartimentalizados en la vacuola (Marmabe y Ando, 1995; Misra y Dwivedi, 1995; Poljakoff-Mayber *et al.* 1995).

La salinidad afecta de manera diferente a las enzimas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos: la vía Embden-Meyer-Pharnas y la ruta oxidativa de las pentosas fosfato. En cultivares tolerantes, las de la vía glucolítica incrementaron, en tanto que en cultivares sensibles incrementó la actividad de la ruta de las pentosas fosfato (Misra y Dwivedi, 1995).

### 4.2.2 Salinidad durante el crecimiento

La salinidad afecta al crecimiento y desarrollo de los cultivos en términos de peso seco (Pessarakly *et al.* 1989; Al-Rawahy *et al.* 1999), pero otros factores están involucrados en el grado de afectación, entre los que se destacan: a) especie y cultivar usados; b) tipo de sal; c) duración e intensidad del estrés; d) tejido u órgano evaluado y estados de desarrollo de la planta.

Estudios realizados por Cordovilla *et al.* (1995a) demostraron que el estrés salino afectó de manera diferente a 4 leguminosas: *Vicia faba*, *Pisum sativa*, *Glycine max* y *Phaseolus vulgaris*, resultando las dos primeras más sensibles al estrés. Al mismo tiempo se pudo comprobar que la parte aérea resultó ser más sensible a la sal, como ha sido observado por otros investigadores (Izzo *et al.* 1993, 1996; Soussi *et al.* 1998).

Maiti *et al.* (1996) encontraron una gran variabilidad genotípica con relación a la resistencia a la sal en 19 cultivares de maíz, aunque algunos índices de tolerancia utilizados como primer criterio de selección requirieron el análisis de otras características bioquímicas.

En la aplicación de diferentes tipos de sales a cuatro cultivares de arroz, el cloruro sódico resultó ser el más tóxico. Adicionalmente, se pudo evidenciar que algunos estados de desarrollo son afectados de manera más marcada por el estrés salino. Así, la germinación resultó más tolerante que el crecimiento vegetativo (Aslam *et al.* 1993).

El tiempo de exposición a la sal es también un factor importante, pudiéndose detectar efectos negativos a corto plazo aún antes de que los iones tóxicos puedan acumularse en los tejidos. A tiempos prolongados de aplicación el efecto sobre el crecimiento se evidencia aún más (Cordovilla *et al.* 1995b). La respuesta a la salinidad provoca respuestas en el crecimiento de la planta, diferentes según el tiempo de aplicación de la sal (Munns y Thermat, 1986).



La mayoría de las leguminosas son sensibles o moderadamente tolerantes a la salinidad, ya que el rendimiento resulta afectado a concentraciones de cloruro sódico equivalentes a conductividades eléctricas menores que  $2 \text{ dS m}^{-1}$ . Frecuentemente se observa una disminución en el área foliar y un incremento en la succulencia de las hojas, provocado por la diferencia de potencial hídrico entre la planta y el medio, lo que incrementa el turgor de la hoja. Una exposición prolongada provoca una acumulación de iones, de manera acentuada en las hojas más viejas, y en casos extremos, áreas necrosadas en las mismas. Estas limitan el aporte de fotosintetizados a las zonas meristemáticas (Munns y Termaat, 1986).

#### 4.2.3 Salinidad en la simbiosis

El establecimiento de la simbiosis está precedida por una serie de etapas en las que el microsimbionte y la leguminosa interactúan y que, finalmente, concluyen en la formación del nódulo. Es lógico suponer que la salinidad afecte también esta serie de sucesos. Así, el NaCl reduce el número de pelos radicales y la formación del canal de infección (Zahran y Sprent, 1986); disminuye el número de células de *Rhizobium* que colonizan la raíz (Tu, 1981); reduce el número y peso de los nódulos (Elsheikh y Wood, 1990; Craig *et al.* 1991). Diversos estudios indican que los estados tempranos de la nodulación son más sensibles al estrés salino que los posteriores (Balasubramanian y Sinha, 1976; Singleton y Bohlool, 1984; Ikeda, 1994).

La inhibición del crecimiento y la fijación de nitrógeno han sido variables ampliamente estudiadas, observándose que la nodulación y la fijación son más sensibles que el crecimiento (Delgado *et al.* 1993; Elsheik y Wood 1990; Serraj *et al.* 1997; Soussi *et al.* 1998). Sin embargo, el grado de afectación en la fijación de nitrógeno depende de la sensibilidad a la sal tanto del microsimbionte (Velagaleti y Marsh, 1989) como de la planta. En general, el factor limitante en la simbiosis es la tolerancia de la leguminosa (Bordeleau y Prevost, 1994; Craig *et al.* 1991; Velagaleti y Marsh, 1989). Así, en la interacción de cultivares tolerantes de soja inoculadas con cepas de *Rhizobium* sensibles o tolerantes, la aplicación de 80 mM de NaCl no afectó la fijación de

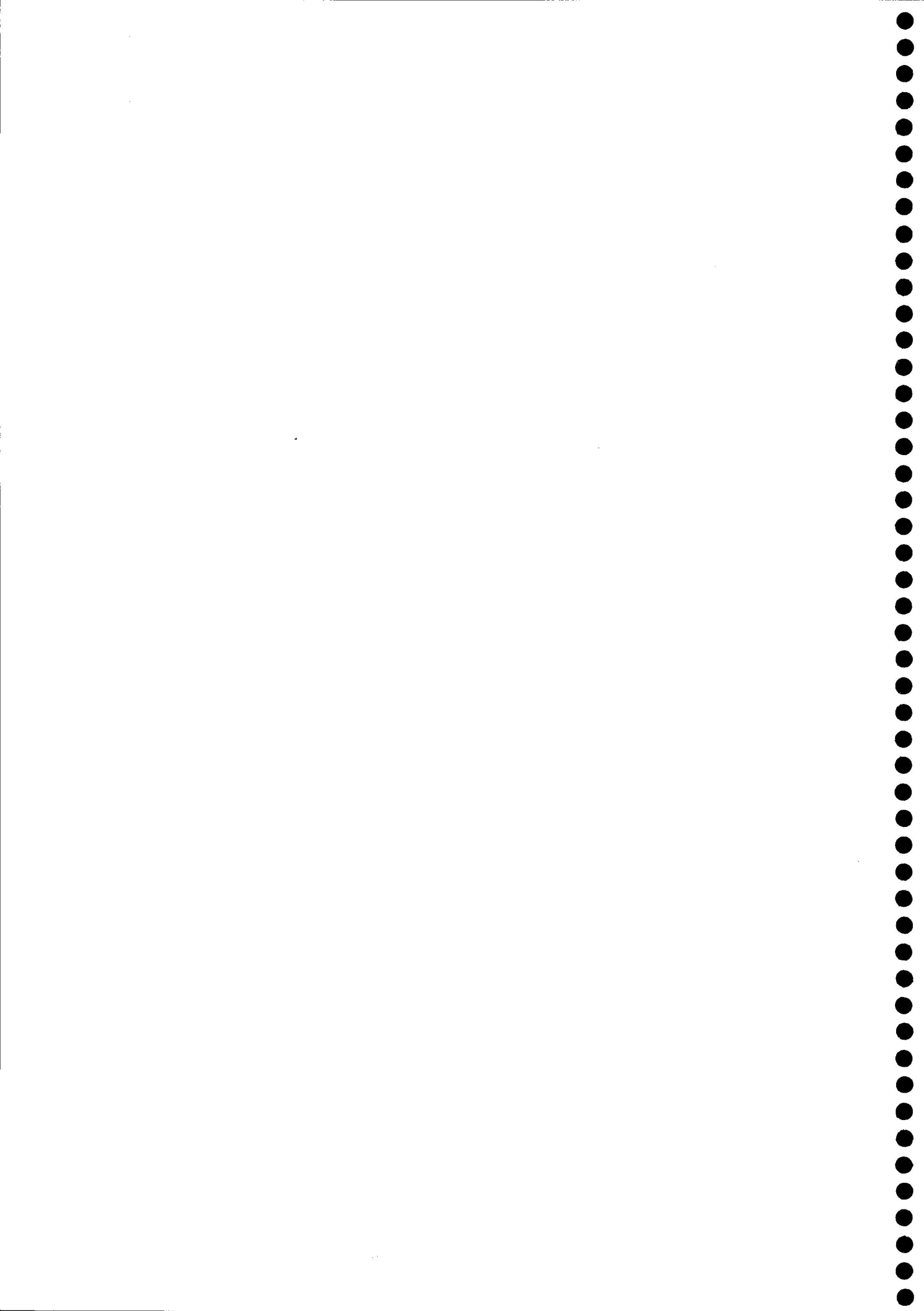
nitrógeno, sin embargo, cuando el cultivar usado fue el sensible, el nivel de inhibición incrementó significativamente (Velagaleti y Schweitzer, 1995).

Han sido sugeridas varias hipótesis para tratar de explicar el efecto de la salinidad sobre la fijación de nitrógeno, entre las que destacan: la disminución en el aporte de fotosintetizados al nódulo (Bekky *et al.* 1987 Georgiev y Atkins, 1993); reducción en el suplemento de substratos respiratorios a los bacteroides (Delgado *et al.* 1993, 1994); y alteraciones en la barrera de difusión del oxígeno (Serraj *et al.* 1994).

Se ha observado que las leguminosas de zonas templadas, que presentan nódulos indeterminados, son más tolerantes a la sal que las leguminosas tropicales, dada su capacidad para regenerar las zonas afectadas por el estrés (Bordeleau y Prévost, 1994). Sin embargo, se ha demostrado la recuperación de nódulos determinados sometidos este tipo de estrés (James *et al.* 1993).



III MATERIAL Y  
METODOS



## MATERIAL Y METODOS

### 1. Material biológico

#### 1.1. Material vegetal

Se utilizaron semillas de tres cultivares de *Phaseolus vulgaris* de diferente procedencia. El cultivar Africa fue proporcionado por INTERLAGSA, de Semillas Projar (Valencia, España); el cultivar Coco procede del Centro de Agricultura Tropical (CIAT, Cali, Colombia) y reproducido en Túnez por el Dr. Trelvri (INSAT); y el cultivar Bat es de origen colombiano y fue proporcionado por el CIAT de Cali, Colombia.

Las semillas del cultivar Africa son de color marrón oscuro moteado, de tamaño mediano (3 a 5 cm de longitud), las plantas presenta un hábito de crecimiento determinado arbustivo, la floración inicia a los 27 días después de la siembra y el color de las flores es blanco.

El cultivar Coco presenta semillas pequeñas de color blanco (1-3 cm de longitud) y tiene un hábito de crecimiento determinado arbustivo. La aparición de flores, de color blanco, se observó a partir de los 27 días de edad.

Las características de las semillas de Bat son: tamaño pequeño (1-3 cm longitud), color marrón claro, el crecimiento de las plantas caracterizado por un tallo erecto color morado es de mata, el estado reproductivo inicia con la aparición de flores de color morado a los 27 días de edad del cultivo.

## 1.2. Microorganismo

La bacteria seleccionada fue *Rhizobium tropici* cepa CIAT-899 y fue proporcionada por el CIAT de Cali, Colombia.

## 2. Medios de cultivos

### 2.1 Preparación del medio YEM

MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0.2 g
NaCl.....	0.1g
Manitol.....	10.0 g
Extracto de levadura .....	1.0 g
Agar (para medio sólido) .....	15.0 g
Agua destilada .....	1000 ml

Una vez disueltos todos los reactivos, se ajustó el pH del medio entre 7.0-7.2. Para el caso del medio YEM líquido, éste era repartido en matraces Erlenmeyer de 250 ml a razón de 100 ml por matraz y se esterilizó durante 20 minutos en autoclave, guardándose hasta su uso en cámara de refrigeración a 6°C.

### 2.2 Conservación de la cepa

Con la finalidad de evitar pérdidas en las características genéticas de la cepa bacteriana, ésta fue conservada en glicerol al 20 % a -80°C.

Para el trabajo rutinario, la cepa fue conservada en medio YEM sólido (Vicent, 1970) distribuido en tubos inclinados que se mantuvieron en cámara de refrigeración a una temperatura de 6°C. Aproximadamente cada 3 meses este material fue renovado por resiembra de la cepa conservada en glicerol.

### 2.3 Solución nutritiva

Para aportar los nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo de las plantas se utilizó la solución nutritiva descrita por Rigaud y Puppo (1975) que se describe:

#### Macronutrientes:

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	0.200 g
$\text{KCl}$ .....	0.200 g
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....	0.120 g
$\text{Na}_2\text{FeEDTA}$ .....	0.025 g

#### Micronutrientes:

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....	0.004 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....	0.002 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .....	0.002 g
$\text{Zn SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	0.003 g
$\text{H}_3\text{BO}_3$ .....	0.018 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .....	0.120 g

Las cantidades especificadas son para preparar 1 l de solución nutritiva. La solución se esterilizó durante 20 minutos a 125°C.

### 3. Condiciones experimentales

Todos los experimentos fueron llevados a cabo bajo condiciones controladas. La manipulación de materiales biológicos previa al establecimiento de los experimentos se hizo bajo campana de flujo laminar. El crecimiento de las plantas, en todos los experimentos, ocurrió en cámara de cultivo con temperatura, fotoperiodo y humedad relativa controlados.

### **3.1 Experimentos de germinación**

#### **3.1.1 Esterilización y siembra de semillas**

En este estudio las semillas se esterilizaron con hipoclorito de sodio al 5 % durante 3 minutos, a continuación se lavaron varias veces con abundante agua destilada estéril y se colocaron en cajas de Petri conteniendo tres capas de papel Whatman No. 3 estéril, a razón de 10 semillas por caja, y posteriormente se aplicó el tratamiento salino mediante la adición 4 ml de la solución correspondiente por un período de 6 días.

#### **3.1.2 Condiciones de germinación**

Los recipientes con las semillas fueron colocadas en una cámara de germinación a una temperatura de 25°C. Durante 5 días, las semillas fueron evaluadas diariamente considerándose como germinadas aquéllas en las que la radícula tuviera una longitud mínima de 2 mm (Avang y Redman, 1990). Durante el tiempo que duró el experimento se mantuvo una humedad adecuada en las cajas, de manera que esta variable no interfiriera en el proceso de germinación.

### **3.2 Experimentos con plantas**

#### **3.2.1 Preparación del inóculo**

El inóculo se preparó partir de un preinóculo obtenido por el desarrollo del *Rhizobium* en medio YEM líquido en agitación durante 48 h, transfiriendo un ml del preinóculo, bajo condiciones axénicas en una campana de flujo laminar, a un matraz Erlenmeyer que contenía 100 ml de medio YEM líquido, y se dejó desarrollar durante aproximadamente 36 h a una temperatura constante de 26°C hasta obtener una suspensión bacteriana con una densidad aproximada de  $10^9$  ufc ml<sup>-1</sup>.



### 3.2.2 Esterilización y germinación de semillas

Para realizar estos experimentos, las semillas, previamente seleccionadas por uniformidad en tamaño y apariencia, fueron esterilizadas durante 3 minutos con una solución de hipoclorito de sodio, después de lo cual fueron lavadas varias veces con agua destilada estéril para eliminar los restos de la solución esterilizante. A continuación las semillas se imbibieron durante 3 h en la oscuridad con baja agitación. Posteriormente, en condiciones axénicas, las semillas fueron transferidas a semilleros que contenían vermiculita húmeda y estéril, se cubrieron con bolsas de polietileno y se pregerminaron a 26°C durante 48 h.

### 3.2.3 Siembra e inoculación

Las semillas germinadas se seleccionaron, bajo condiciones axénicas, por tamaño de radícula, descartando aquéllas que tuvieran un tamaño menor a 3 cm. Para la etapa de desarrollo y crecimiento en condiciones hidropónicas fueron transferidas a jarras de Leonard (2 semillas/jarra), donde se les adicionó 1 ml del inóculo y se cubrieron con perlita, esto último con el fin de disminuir los riesgos de contaminación y reducir la evaporación.

### 3.2.4 Condiciones del cultivo

Las jarras se colocaron en la cámara de cultivo bajo las siguientes condiciones:

- Fotoperíodo: 16 h luz / 8 h oscuridad
- Temperatura: 26 °C día / 18 °C noche
- Humedad relativa: 55 % día / 75 % noche
- Intensidad lumínica: 450  $\mu\text{mol.m}^2\text{s}^{-1}$  (400-799 nm) en la superficie de las macetas, suministrada por lámparas fluorescentes Sylvania Cool-White (F71T12-CW-VHO) y lámparas incandescentes de 40 vatios (30% del total de vatios).

La distribución de las jarras en la cámara fue completamente al azar, cambiándolas de lugar periódicamente. La solución nutritiva también se sustituyó, cada semana durante las dos primeras semanas, y posteriormente cada tres días, ya que las condiciones de crecimiento del cultivo así lo requirieron.

### **4. Experimentos realizados**

#### **4.1 Germinación de diferentes variedades de *Phaseolus vulgaris* en condiciones de salinidad**

En este estudio, las semillas de 3 cultivares fueron valoradas con relación a su sensibilidad a la sal durante la etapa de germinación, para lo cual previamente se trataron según el apartado 3.1.1

Los tratamientos salinos ensayados fueron 0, 100, 200 y 300 mM de NaCl. Cada tratamiento constó de 5 repeticiones. El experimento se repitió en tres ocasiones, para tener suficiente material vegetal y corroborar los resultados obtenidos. Una vez terminado el tratamiento, las semillas germinadas fueron lavadas con agua destilada y secadas con papel filtro para efectuar las evaluaciones correspondientes. A continuación se separaron los cotiledones, epicotilo y radícula de las semillas germinadas y se pesaron. El material procedente de 2 cajas se secó a 70°C durante 48 h y se registró el peso seco de cada una de las partes. El resto de material biológico fue guardado a -80°C para posteriores determinaciones analíticas.

Las evaluaciones efectuadas fueron a nivel fisiológico (índices de germinación) y a nivel bioquímico (contenido de osmolitos y actividades enzimáticas en radículas) detallándose enseguida cada uno de los parámetros analizados.

#### 4.1.1 Parámetros de germinación

En este apartado se englobaron los índices de germinación, crecimiento y rendimiento para cada una de las variedades.

- a) Longitud de radícula y epicotilo
- b) Peso fresco y seco de radícula y epicotilo
- c) Porcentaje de germinación por día. (%Gd).
- d) Porcentaje de germinación. (% G).
- e) Precocidad de germinación
- f) Duración de germinación
- g) Velocidad de germinación
- h) Tasa de germinación.-

#### 4.1.2 Aspectos bioquímicos

En este apartado se analizó el contenido en azúcares solubles totales y prolina en radículas de los tres cultivares de judía con distintas dosis de sal. Se analizó también la actividad de algunas enzimas del metabolismo carbonado tales como: fosfoenolpiruvato carboxilasa, malato deshidrogenasa , alcohol deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa , isocitrato deshidrogenasa y piruvato quinasa.

#### 4.2 Efecto de la fertilización nitrogenada en la simbiosis *Phaseolus vulgaris* var. Africa-*Rhizobium tropici* cepa CIAT 899.

El objeto de este experimento fue seleccionar la dosis adecuada de  $\text{KNO}_3$  que permitiera el suministro necesario de N durante las etapas previas al inicio de la fijación de Nitrógeno y que, al mismo tiempo, influyera positivamente sobre el establecimiento de la simbiosis y en la fijación de  $\text{N}_2$ . Se utilizaron plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. Africa tratadas desde el inicio del cultivo, con 5 dosis de  $\text{KNO}_3$  (0, 1, 2, 5, 10 mM). Las plantas fueron recolectadas en diferentes etapas de desarrollo del cultivo: 18 días

después de la siembra (DDS), etapa que correspondió al crecimiento vegetativo; 28 DDS, correspondiendo al inicio de la floración; 34 DDS, etapa de plena floración del cultivo, y 40 DDS, correspondiente al inicio de la fructificación. El experimento se realizó dos veces y de cada tratamiento se disponía de seis repeticiones. Se evaluaron los siguientes parámetros:

- a) Crecimiento: Peso seco de parte aérea, peso seco de raíz, peso seco de planta y relación raíz-parte aérea.
- b) Fijación: Peso seco de nódulos, peso normalizado de nódulos, actividad reductora de acetileno, actividad reductora de acetileno por planta.
- c) Contenido de N-NO<sub>3</sub> en hoja, raíz y nódulo.
- d) Contenido de clorofilas
- e) Actividad nitrato reductasa (NR) en raíz y nódulos
- f) Actividad nitrito reductasa (NiR) en raíz y nódulos
- g) Contenido de proteínas en nódulos

### **4.3 Efecto de la aplicación del estrés salino a la simbiosis *Phaseolus vulgaris* var. Africa-*Rhizobium tropici*.**

Los experimentos se llevaron a cabo con plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. Africa tratadas con NaCl (0, 25, 50 y 100 mM). Se efectuaron 5 cosechas: 18 DDS (días después de la siembra), 21 DDS, 24 DDS, 27 DDS y 30 DDS. Para cada tratamiento se utilizaron 5 jarras ( 10 plantas) y el experimento se repitió nuevamente. Dadas las dimensiones de este experimento, se hizo necesario realizarlo en dos etapas. En la primera se prepararon las jarras Leonard (100) necesarias para evaluar el efecto salino adicionado a la solución nutritiva una vez establecida la simbiosis (18 DDS); en tanto que en la segunda, con un número igual de jarras, aplicando el cloruro sódico desde la siembra

En cada una de las recogidas se efectuaron las siguientes determinaciones:

- a) Análisis del crecimiento: PSR, PSPA, PSP, RPA
- b) Análisis de fijación de nitrógeno: PSN, PNN, ARA y ARAP
- c) Determinación de azúcares solubles totales en hoja, raíz y nódulo
- d) Concentración de prolina en hoja, raíz y nódulo
- e) Actividades enzimáticas en el citosol nodular: fosfoenolpiruvato carboxilasa, malato deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa, sacarosa sintasa, invertasa alcalina.
- f) Proteína en nódulo.

#### **4.4 Efecto de la aplicación del estrés salino a la simbiosis *Phaseolus vulgaris* var. *Coco-Rhizobium tropici*.**

Para este estudio se utilizaron plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. Coco en simbiosis con *Rhizobium tropici* cepa CIAT 899. El ensayo se efectuó también en dos partes. En la primera, las plantas fueron sometidas al estrés salino una vez establecida la simbiosis a dosis de 0, 10, 25 y 50 mM de NaCl. En la segunda parte las plantas fueron tratadas con la sal desde la siembra, aplicándose las mismas dosis de sal. En ambos experimentos las plantas fueron cosechadas a los 18, 21, 24, 27 y 30 días después de la siembra.

#### **4.5 Efecto del estrés salino sobre el metabolismo carbonado en el citosol nodular y bacteroidal**

En este experimento, el tratamiento salino se aplicó a las plantas desde la siembra hasta su cosecha. Además, se adicionó a la solución nutritiva KNO<sub>3</sub> 1 mM hasta los 18 DDS. El material vegetal se cosechó a los 28 DDS (inicio de floración) y se llevaron a cabo las siguientes determinaciones:

- b) Contenido de azúcares solubles totales en hoja, raíz y nódulos
- c) Contenido de clorofilas en hojas
- d) Contenido de prolina en hoja, raíz y nódulos
- e) Actividades enzimáticas del citosol nodular: fosfoenolpiruvato carboxilasa, malato deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa y lactato deshidrogenasa.
- f) Actividades enzimáticas del citosol bacteroidal: MDH, 6-PGDH, ICDH, ADH y LDH.
- g) Contenido de proteínas en nódulo.

#### 4.6 Efecto del estrés salino sobre la respiración bacteroidal

En este experimento se evaluó la respuesta de tres cultivares de judía: Africa, Coco y Bat. Las plantas fueron inoculadas con *Rhizobium tropici* cepa CIAT 899, y el tratamiento salino (0 y 50 mM) se aplicó una vez establecida la simbiosis (18 DDS). Se realizaron 3 cosechas: 18 DDS, 24 DDS y 27 DDS. La finalidad de este experimento fue analizar los cambios inducidos por la sal a nivel de crecimiento, fijación y respiración bacteroidal. Para ello se hicieron las siguientes determinaciones:

- a) Parámetros de crecimiento: PSPA, PSR, PSP, RPA
- b) Parámetros de fijación: PSN, PNN, ARA, ARAP
- c) Respiración bacteroidal utilizando diferentes fuentes de carbono: glucosa, glutamato, succinato, prolina, etanol y lactato.
- d) Actividades enzimáticas de la fracción vegetal del nódulo: PEPC, MDH, 6PGDH, ICDH, ADH.

## 5 Metodología

### 5.1 En germinación

- a) **Longitud de radícula y epicotilo.** Las semillas tratadas durante seis días fueron cosechadas, separando y midiendo la longitud de radícula y epicotilo.
- b) **Peso fresco y seco de radícula y epicotilo.** El peso fresco radícula y epicotilo se determinó después de que las semillas fueron evaluadas en relación al inciso anterior. Para determinar el peso seco, cada una de las partes fueron sometidas a secado en una estufa por espacio de 48 horas a 70°C..
- c) **Porcentaje de germinación por día. (%Gd).** Registrado como el número promedio de semillas que germinaron en un día de tratamiento salino.
- d) **Porcentaje de germinación. (% G).** Corresponidió al número promedio de semillas germinadas durante el tiempo que fueron tratadas, tomando como base 100 semillas. Se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula (Singh y Ambawatia, 1990):

$$\% G = \frac{\text{No. de semillas germinadas}}{\text{No. total de semillas}} \times 100$$

- g) **Precocidad de germinación.-** Se refiere al número de semillas germinadas en el primer día de tratamiento (Belkhodja y Soltani, 1992)
- h) **Duración de germinación.-** Comprende el intervalo de tiempo entre el día en que germinó la primera semilla y el día en que germinó la última semilla.
- i) **Velocidad de germinación.-** Definida como el tiempo requerido para que las semillas germinen. Se expresa según la siguiente ecuación:

$$VG = \frac{N_1 + N_2 + \dots + N_n}{N_1 T_1 + N_2 T_2 + \dots + N_n T_n}$$

Donde  $N_1$  y  $N_2$  son el número de semillas germinadas en los tiempos  $T_1$  y  $T_2$ .

- j) **Tasa de germinación.**- Representa la sumatoria del número de semillas germinadas en el día “n” divididas entre el tiempo “t”. Se calculó según la fórmula (Zaiter et al. 1994):

$$TG = \sum(n_i / t_i) \times 100$$

## 5.2 Crecimiento de planta

Las plantas cosechadas se lavaron con abundante agua para eliminar todos los restos de vermiculita, a continuación se secaron con papel filtro y se separó la raíz de la parte aérea. Para cada planta, se separaron cuidadosamente los nódulos de la raíz y se registraron los pesos frescos de cada uno de estos tejidos vegetales. Una porción de cada parte fue separada, pesada, perfectamente homogeneizada con lo obtenido en el resto de las plantas y guardada a  $-80^{\circ}\text{C}$  para realizar las posteriores determinaciones bioquímicas. El material restante se secó en la estufa a  $70^{\circ}\text{C}$  durante 48 h y se registró su peso seco.

De manera paralela se tomó una porción de raíz nodulada (aproximadamente 2 g) que se utilizó para determinar la actividad Nitrogenasa por la prueba de reducción de acetileno la cual es descrita en el apartado 5.2. El peso fresco y seco de esta porción también fue considerado para los valores del análisis del crecimiento.

Para la determinación del peso normalizado de nódulos se hizo uso de la siguiente fórmula:

$$PNN = \frac{PSN}{PSPA}$$

En donde el PSN esta dado en mg y el PSPA en g. Este parámetro es considerado más apropiado para la valorar la nodulación.



### 5.3 Fijación de nitrógeno: actividad nitrogenasa

La actividad nitrogenasa se determinó por la prueba de reducción de acetileno según la metodología de Herdina y Silsbury (1991). Una porción de 2-3 g de raíz nodulada se incubó en viales sellados perfectamente a los que, previa extracción de un 10 % de su atmósfera, se le adicionó el mismo volumen de acetileno. Los viales se incubaron en la oscuridad durante 10 y 20 minutos, tiempo en el cual se tomaron muestras que fueron recogidas en frascos sellados. Alícuotas de 0.2 ml fueron extraídas de estos frascos para cuantificar, por cromatografía de gases, el acetileno reducido.

El etileno formado se valoró en un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer 8600 equipado con una columna de Poropak. Finalmente, la actividad reductora de acetileno (ARA) se expresó en  $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 (\text{g PSN})^{-1} \text{h}^{-1}$ .

### 5.4 Aislamiento de la fracción soluble de nódulos y bacteroide

#### 5.4.1 Obtención de la fracción citosólica

El aislamiento de los bacteroides se efectuó en condiciones de microaerobiosis de acuerdo con la metodología de Delgado *et al.* (1993). Los nódulos se homogeneizaron en la solución tampón descrita en el apartado 5.6.1.a pero a razón de 4g/ ml. Después de homogeneizar, el sobrenadante se filtró a través de 4 capas de gasa y se centrifugó a 250 g durante 5 min a 4°C para eliminar los restos vegetales. El nuevo sobrenadante se centrifugó a 8000 g por 10 min para sedimentar los bacteroides. El precipitado final se lavó 3 veces con tampón de fosfato sódico 50 mM pH 7.4, 0.3 M de sacarosa y 2 mM de  $\text{MgSO}_4$ . Los bacteroides se resuspendieron en tampón de fosfato sódico 25 mM pH 7

#### 5.4.2 Obtención de la fracción soluble de bacteroides

La suspensión bacteroidal obtenida en el inciso 5.4.1 se sonicó en un baño de hielo durante 5 minutos a intervalos de 5 segundos. Finalmente, el extracto celular obtenido se centrifugó por espacio de 30 min a 30000 g, recuperando el sobrenadante que se utilizó como fracción soluble del bacteroide.

#### 5.4.3 Respiración bacteroidal

La respiración de los bacteroides se evaluó midiendo el O<sub>2</sub> consumido en la cámara de un electrodo de oxígeno Hansatech. Para ello, los bacteroides, aislados según lo especificado en el apartado 5.3.1, se incubaron a 25°C con diferentes sustratos. La mezcla de reacción (2 ml) consistió en:

Tampón NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7.4.....	25.0 mM
Sustrato.....	10.0 mM
Extracto .....	50.0 µl

Los sustratos adicionados fueron: glucosa, malato, succinato, prolina, glutamato, etanol, lactato. La desaparición de O<sub>2</sub> disuelto en la cámara de reacción se registró por medio de un microprocesador Hanna H14818. Las lecturas se hicieron a intervalos de 1 min durante 10 min. Se efectuaron dos repeticiones en los ensayos y la respiración se expresó en µ mol O<sub>2</sub> mg prot<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

### 5.5 Determinaciones enzimáticas del metabolismo del nitrógeno en nódulos

#### 5.5.1. Actividad nitrato reductasa

La actividad nitrato reductasa fue determinada “in vitro” en nódulo y raíz por el método de Caba *et al.* (1990) y Galván (1996). El material vegetal se homogeneizó en

tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.5, Na<sub>2</sub>EDTA 2 mM, DTT 2 mM y caseína soluble 1.5 % (p/v) en un mortero sobre hielo. El homogeneizado se filtró y centrifugó a 2500 g durante 5 min para eliminar los restos celulares. El sobrenadante se centrifugó a 30 000 g durante 30 min. El extracto obtenido se usó para determinar la actividad NR. La cuantificación de la actividad de esta enzima se basa en la aparición de nitrito en el medio de reacción, formado de las siguientes sustancias:

Tampón fosfato pH 7.5 .....	50.0 mM
KNO <sub>3</sub> .....	10.0 mM
Cisteína.....	1.0 mM
NADH.....	0.2 mM

La reacción se inició con adición del extracto. A continuación se incubó la mezcla en un baño termostático a 30°C durante 30 min. Transcurrido ese tiempo, la reacción se detuvo por adición de acetato de zinc 1 M y agitación vigorosa para oxidar de manera total los restos de NADH que pudieran estar presentes en la mezcla de reacción. Finalmente, se centrifugó a 3500 g durante 5 min y se valoró colorimétricamente el nitrito formado por el método de Snell y Snell (1949) y Hageman y Hucklesby (1971). A 1 ml del sobrenadante obtenido se le agregó 1 mL del reactivo de sulfanilamida (5g sulfanilamida en 100 ml de HCl concentrado y se lleva a 500 ml con agua destilada), 1 ml de NNEDA (100 g en 500 ml de agua destilada) y 3 ml de agua destilada. Se agitó fuertemente y dejó en reposo por espacio de 20 min hasta la aparición de color. Se midió la absorbancia a 540 nm. Paralelamente se prepararon una serie de patrones de concentración conocida para elaborar una curva patrón. Se prepararon también dos controles: un blanco en el que la enzima se sustituye por el medio de extracción, y un control a tiempo cero. Para cada tratamiento se hicieron 4 repeticiones.

### 5.5.2 Actividad nitrito reductasa

La valoración de la actividad nitrito reductasa en nódulo y raíz se hizo “in vitro” según la metodología de Caba *et al.* (1990), utilizando como medio de extracción tampón maleico-KOH 100 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol al 2 % (v/v) y etilenglicol al 15 % (v/v), de la misma manera que para NR pero usando una relación 1:12 (p/v) para nódulo y 1/6 para raíz. En este caso se valoró el nitrito desaparecido en el medio de reacción utilizando como donador de electrones el sistema metil viológeno-ditionito (Lillo, 1984). La mezcla de reacción consistió en:

Tampón fosfato potásico pH 7.5.....	50.00 mM
Nitrito de potasio .....	2.00 mM
Metil viológeno.....	0.75 mM
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (disuelto en NaHCO <sub>3</sub> ) .....	21.00 mM

Este último reactivo es el que inicia la reacción. La mezcla de reacción se incubó en un baño termostatzado a 28°C durante 30 min. La reacción se detiene por agitación vigorosa de los tubos hasta la completa oxidación del ditionito, enseguida se adicionaron 8 ml de agua y, tras agitarlos, se valoraron alícuotas (0.25 ml) de esta dilución, determinándose el contenido de nitrito de la misma manera que se hizo para la NR. Se prepararon cuatro repeticiones y un blanco. La actividad se expresó en  $\mu$  mol NO<sub>2</sub><sup>-</sup> red gPF<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

## 5.6 Actividades enzimáticas del metabolismo carbonado

### 5.6.1 Preparación de extractos libres de células del citosol nodular

El medio de extracción utilizado dependió de la actividad a determinar. La extracción se llevó a cabo sobre hielo a 5°C, macerando el nódulo en un mortero y agregando 1/3 en peso de PVPP durante la extracción. El macerado se filtró y centrifugó

a 30000 g durante 30 min y en el sobrenadante se determinaron las actividades enzimáticas.

- a) **Tampón Tris-HCl** 50 mM pH 7.5, Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 5 mM, glicerol al 10 % (v/v), albúmina 1mg/ml, DTT 15.42 g/l. Este tampón se utilizó para medir las actividades PEPC, MDH, 6FGDH, ICDH, ADH. En este caso, 0.3 g de tejido nodular se homogeneizó en 3 ml de tampón.
- b) **Tampón MOPS-KOH** 50 mM pH 7, DTT 10 mM, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, para determinar la actividad es IA, PK y ME.
- c) **Tampón maleico-KOH** 100 mM pH 6.8, sacarosa 100 mM, β-mercaptoetanol al 2 % (v/v), etilenglicol al 20 % (v/v), para valorar la actividad de la SS

#### 5.6.1.1 Valoración de las actividades enzimáticas

La valoración de las actividades enzimáticas en estudio se hizo por la aparición o desaparición de NADP(H) en el medio de reacción, dependiendo de que en la reacción producida el piridín nucleótido fuera oxidado o reducido. Se registró la absorbancia a 340 nm y el cálculo de la actividad se hizo de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad} = \frac{(\Delta \text{D.O. min}^{-1}) \cdot V \cdot V_t}{10^{-6} \cdot \epsilon \cdot d \cdot v}$$

donde:

$\Delta \text{D.O. min}^{-1}$  = incremento de D.O.

V = Vol. de la mezcla de reacción

V<sub>t</sub> = Vol. Total de extracto

$\epsilon$  = coeficiente de extinción molar de NADP(H)=  $6.22 \times 10^6 \times \text{cm}^2 \times \text{mol}^{-1}$ .

d = ancho de cubeta (1 cm)

V = Volumen de extracto agregado a la mezcla, en ml

