



**UNIVERSIDAD DE JAÉN**

---

**FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL**

**TESIS DOCTORAL**

**ESTUDIOS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS  
DEL CICLO DE LA GLUTAMATO SINTASA EN  
NÓDULOS DE VICIA-FABA: EFECTO DEL  
ESTRÉS SALINO**

**PRESENTADA POR:  
MARÍA DEL PILAR CORDOVILLA PALOMARES**

**DIRIGIDA POR:  
DRA. DÑA. CARMEN LLUCH PLÁ  
DR. D. FRANCISCO LIGERO LIGERO**

**JAÉN, 30 DE ABRIL DE 1993**

**ISBN 84-8439-045-4**



**ESTUDIOS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DEL CICLO DE LA GLUTAMATO  
SINTASA EN NÓDULOS DE Vicia faba : EFECTO DEL ESTRÉS SALINO**

**Cordovilla Palomares**

**M<sup>a</sup> del Pilar**

**I.S.B.N** 84-8439-045-4

**Centro** Facultad de Ciencias

**Departamento** Biología Vegetal



## **Nombre y apellidos del autor**

---

Apellidos **CORDOVILLA PALOMARES**

Nombre **M<sup>a</sup> DEL PILAR**

## **Título de la Tesis Doctoral**

---

**ESTUDIOS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DEL CICLO DE LA GLUTAMATO SINTASA EN NÓDULOS DE Vicia-Faba: EFECTO DEL ESTRÉS SALINO**

## **Fecha de lectura**

---

**30 DE ABRIL DE 1993**

## **Centro y Departamento en que fue realizada la lectura**

---

Centro **Facultad de Ciencias**

Departamento **Biología Vegetal**

## **Composición del Tribunal / Dirección de la tesis**

---

Dirección de la Tesis **Dra. D<sup>a</sup>. Carmen Lluch Plá y Dr. D. Francisco Ligeró Ligeró**

Presidente/a del Tribunal **Dr. D. José Olivares Pascual**

Vocales

**Dr. D. Victoriano Valpuesta Fernández**

**Dra. D<sup>a</sup>. Jone Aguireola Morales**

**Dr. D. José M<sup>a</sup> Maldonado Ruiz**

Secretario/a **Dr. D. José M<sup>a</sup> Ramos Clavero**

## **Calificación obtenida**

---

**APTO CUM LAUDE POR UNANIMIDAD**



UNIVERSIDAD DE JAÉN  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL

**ESTUDIOS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS  
DEL CICLO DE LA GLUTAMATO SINTASA  
EN NÓDULOS DE Vicia faba:  
EFECTO DEL ESTRÉS SALINO**

**María del Pilar Cordovilla Palomares**

**TESIS DOCTORAL  
1993**



**ESTUDIOS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DEL CICLO  
DE LA GLUTAMATO SINTASA EN NÓDULOS DE  
Vicia faba: EFECTO DEL ESTRÉS SALINO**

**MARÍA DEL PILAR CORDOVILLA PALOMARES**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL  
FACULTADA DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE GRANADA  
1993**



**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL  
FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**Estudios fisiológicos y bioquímicos del ciclo  
de la glutamato sintasa en nódulos de Vicia faba:  
efecto del estrés salino**

Memoria presentada para aspirar al Grado  
de Doctora por la Licenciada en Ciencias  
Doña María del Pilar Cordovilla Palomares

Directores:

Fdo: Dra. Carmen Lluch Plá  
Catedrático de Fisiología Vegetal.  
Facultad de Ciencias.  
Universidad de Granada.

Fdo: Francisco Ligeró Ligeró  
Profesor Titular de Fisiología  
Vegetal. Facultad de Farmacia.  
Universidad de Granada.



*A mi madre y a mis hermanos  
porque gracias a ellos ha sido posible este trabajo*



# Agradecimientos

---

En las primeras líneas de este trabajo quiero manifestar mi agradecimiento a un grupo de personas que de forma directa o indirecta han contribuido a su realización.

A los profesores Dña. Carmen Lluch Plá y D. Francisco Liger Liger, directores de esta Tesis, por su labor de dirección. Ambos me alentaron en los malos momentos, dando solución a muchos de mis problemas.

Al profesor D. Victoriano Valpuesta por aceptarme en su departamento, así como a Josefa Pérez por su gran ayuda.

A Juan Manuel Caba, M<sup>a</sup> Carmen Pérez y Piedad M<sup>a</sup> Gavilán, las primeras personas que conocí en el departamento y, que junto al resto de mis compañeros del grupo de "Fijación de Nitrógeno" en Granada, Antonio Ocaña, Inmaculada Sánchez-Guerrero, M<sup>a</sup> Jesús Delgado y Jose Luís Poveda, me ayudaron e hicieron más grato el trabajo.

A María José Ariza y Ana por su cálida acogida en las sucesivas estancias en Málaga.

A Juan Antonio Segura por su ayuda en el tratamiento de los conejos.

A mis compañeros de laboratorio en Málaga, Francisco Berteli, Elena Corrales, Carolina y Patricia Luque por su simpatía y ofrecimiento y al resto del departamento de Bioquímica, especialmente a Consuelo y Jose Manuel Matés, por tratarme como a uno más.

Al profesor D. Jesús González por sus orientaciones en microbiología y al resto del grupo que dirige; sin olvidarme de Belén Rodelas por su simpatía.

A José Herrera, por su eficaz colaboración.

Al departamento de Biología Vegetal y especialmente al grupo de "Fitohormonas".

Al profesor D. Jose María Ramos por sus orientaciones en estadística.

A los encargados del animalario de Málaga (Pedro y Miguel).

Especialmente a mi familia que siempre pensó en mi interés por encima del suyo.



# Indice

---

## PARTE 1

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1. El nitrógeno en la biosfera.....</b>	<b>3</b>
<b>2. Fijación biológica de nitrógeno.....</b>	<b>4</b>
<b>3. Fijación simbiótica de nitrógeno: simbiosis <i>Rhizobium</i>-leguminosa.....</b>	<b>6</b>
3.1. Familia <i>Leguminosaceae</i> .....	6
3.1.1. <i>Vicia faba</i> .....	8
3.2. Familia <i>Rhizobiaceae</i> .....	9
3.3. Establecimiento de simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosa .....	11
3.4. Bioquímica de la fijación de nitrógeno: Nitrogenasa e Hidrogenasa .....	13
3.5. Nodulinas .....	17
<b>4. Metabolismo del nitrógeno en plantas .....</b>	<b>22</b>
4.1. Asimilación de nitrato.....	22
4.2. Asimilación de amonio .....	25
4.2.1. Ciclo de la glutamina sintetasa-glutamato sintasa .....	25
4.2.1.1. Glutamina sintetasa .....	26
4.2.1.2. Glutamato sintasa.....	31
4.2.2. Glutamato deshidrogenasa .....	36
<b>5. Limitaciones del uso de las leguminosas: salinidad.....</b>	<b>40</b>
5.1. Efecto de la salinidad en la planta .....	41
5.2. Efectos producidos en los nódulos por la salinidad .....	44
5.3. Metabolismo nitrogenado bajo condiciones de estrés salino.....	47
5.4. Respuesta fisiológica ante el estrés salino.....	50
<b>6. Perspectivas.....</b>	<b>54</b>

## PARTE 2

<b>OBJETIVO .....</b>	<b>57</b>
-----------------------	-----------

## PARTE 3

<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	61
<b>1. Material biológico</b> .....	63
1.1. Material vegetal.....	63
1.2. Microorganismos .....	64
1.3. Material animal .....	64
<b>2. Medios de cultivo</b> .....	65
2.1. Solución nutritiva para plantas .....	65
2.2. Medios de cultivo utilizados para la conservación bacteriana y para la preparación de inóculos .....	66
2.2.1. Medio 79 de Allen.....	66
2.2.2. Medio YEM.....	67
2.2.3. Medio bacteriano para curvas de crecimiento .....	67
<b>3. Crecimiento bacteriano</b> .....	68
3.1. Crecimiento de inóculos .....	68
3.2. Efecto del NaCl sobre el crecimiento de <i>R. leguminosarum</i> .....	68
3.2.1. Tolerancia al NaCl de diferentes cepas de <i>R. leguminosarum</i> .....	68
3.2.2. Crecimiento de <i>R. leguminosarum</i> GRA19 con diferentes concentraciones de NaCl en el medio .....	68
<b>4. Cultivo de plantas</b> .....	70
4.1. Cultivo hidropónico .....	70
4.2. Esterilización y germinación de las semillas.....	70
4.3. Preparación del inóculo.....	70
4.4. Siembra e inoculación.....	71
4.5. Condiciones de la cámara de cultivo .....	71
<b>5. Experimentos realizados en plantas</b> .....	72
5.1. Desarrollo ontogénico de la actividad nitrogenasa y de las actividades del ciclo de la glutamato sintasa en nódulos de <i>V. faba</i> .....	73
5.2. Evolución en el fotoperiodo de la actividad nitrogenasa y de las actividades del ciclo de la glutamato sintasa en nódulos de <i>V. faba</i> .....	74
5.3. Efecto del NaCl aplicado en el momento de la inoculación .....	74
5.4. Efecto del NaCl aplicado a simbiosis establecidas y fijadoras de nitrógeno.....	75
5.5. Tolerancia al estrés salino en <i>V. faba</i> : Utilización de líneas puras.....	76
5.6. Interacción de la fertilización nitrogenada y la salinidad en la simbiosis <i>V. faba-R. leguminosarum</i> .....	77
<b>6. Metodología empleada</b> .....	78
6.1. Análisis del crecimiento.....	78
6.2. Actividades de la nitrogenasa .....	79
6.2.1. Producción de hidrógeno.....	79
6.2.2. Actividad reductora de acetileno.....	80
6.2.3. Cálculo de la eficiencia relativa .....	80
6.3. Enzimas de la asimilación del amonio en nódulos.....	80
6.3.1. Preparación de extractos libres de células .....	80

6.3.2. Valoración de la actividad glutamina sintetasa .....	81
6.3.3. Valoración de la actividad NADH-glutamato sintasa .....	82
6.3.4. Valoración de la actividad NADH-glutamato deshidrogenasa .....	83
6.3.5. Cálculo de las actividades NADH-GOGAT y NADH-GDH .....	83
6.4. Determinaciones analíticas .....	84
6.4.1. Determinaciones realizadas en nódulos .....	84
6.4.1.1. Determinación de proteína soluble.....	84
6.4.1.2. Determinación de prolina .....	84
6.4.2. Determinaciones realizadas en parte aérea y raíz.....	85
6.4.2.1. Determinación de nitrógeno .....	85
6.5. Presentación y estudio estadístico de los resultados .....	86
<b>7. Caracterización de la NADH-glutamato sintasa de nódulos de <i>V. faba</i></b> .....	<b>87</b>
7.1. Purificación de la enzima .....	87
7.1.1. Preparación del extracto crudo.....	87
7.1.2. Precipitación fraccionada con sulfato amónico .....	87
7.1.3. Diálisis .....	88
7.1.4. Cromatografía de intercambio iónico .....	88
7.1.5. Cromatografía de exclusión molecular .....	88
7.1.6. Criterio de pureza .....	89
7.2. Separación de posibles isoenzimas de la NADH-GOGAT .....	89
7.2.1. Preparación de extractos crudos.....	89
7.2.2. Precipitación fraccionada con sulfato amónico .....	89
7.2.3. Diálisis .....	89
7.2.4. Cromatografía en DEAE-sepharosa.....	89
7.2.5. Diálisis .....	90
7.2.6. Cromatografía en Q-sepharosa.....	90
7.3. Técnicas electroforéticas.....	91
7.3.1. Electroforesis desnaturalizante.....	91
7.3.2. Electroforesis en gradiente de acrilamida.....	92
7.3.3. Tinción de proteínas en geles .....	93
7.3.3.1. Tinción con azul Coomassie.....	93
7.3.3.2. Tinción por actividad.....	93
a) <i>Tinción positiva</i> .....	93
b) <i>Tinción negativa</i> .....	94
7.4. Determinación del peso molecular por filtración en gel .....	94
7.5. Técnicas inmunológicas.....	95
7.5.1. Obtención de anticuerpos .....	95
7.5.1.1. Inmunización del conejo.....	95
7.5.1.2. Obtención de suero .....	96
7.5.2. Métodos inmunológicos .....	96
7.5.2.1. Titulación de los anticuerpos.....	96
7.5.2.2. Electroforesis de anticuerpos precipitados por el antígeno y la proteína A-sepharosa .....	97
7.5.2.3. Ensayo de la especificidad de los anticuerpos. "Western blot" .....	98

PARTE 4

<b>RESULTADOS.....</b>	<b>101</b>
<b>I. EFECTO DEL CLORURO DE SÓDIO SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar. <i>viciae</i> .....</b>	<b>103</b>
<b>1. Tolerancia al NaCl de diferentes cepas de <i>R. leguminosarum</i> .....</b>	<b>103</b>
<b>2. Crecimiento de <i>Rhizobium leguminosarum</i> GRA19 con diferentes concentraciones de NaCl en el medio.....</b>	<b>108</b>
<b>II. CARACTERIZACIÓN DEL CICLO DE LA GLUTAMATO SINTASA EN NÓDULOS DE <i>Vicia faba</i> .....</b>	<b>112</b>
<b>3. Desarrollo ontogénico de la actividad nitrogenasa y de las actividades del ciclo de la glutamato sintasa en nódulos de <i>V. faba</i>.....</b>	<b>112</b>
3.1. Crecimiento, nodulación y acumulación de nitrógeno en planta.....	112
3.2. Actividades de la nitrogenasa: eficiencia relativa .....	117
3.3. Actividades enzimáticas de la fracción vegetal de los nódulos .....	119
<b>4. Evolución en el fotoperiodo del ciclo de la glutamato sintasa en nódulos fijadores de dinitrógeno de <i>V. faba</i> .....</b>	<b>123</b>
4.1. Actividad nitrogenasa .....	123
4.2. Actividades de la fracción vegetal de los nódulos .....	124
<b>III. EFECTO DEL ESTRÉS SALINO EN LA SIMBIOSIS DE <i>Vicia faba</i> .....</b>	<b>128</b>
<b>5. Efecto del NaCl aplicado en el momento de la inoculación.....</b>	<b>128</b>
5.1. Crecimiento y nodulación.....	128
5.2. Actividad nitrogenasa .....	133
5.3. Actividades enzimáticas de la fracción vegetal de los nódulos .....	135
<b>6. Efecto del NaCl aplicado a simbiosis establecidas y fijadoras de nitrógeno .....</b>	<b>137</b>
6.1. Crecimiento y nodulación.....	137
6.2. Actividad nitrogenasa .....	141
6.3. Actividades enzimáticas de la fracción vegetal de los nódulos .....	143
<b>7. Tolerancia al estrés salino en <i>V. faba</i>: Utilización de líneas puras.....</b>	<b>147</b>
7.1. Crecimiento y nodulación.....	147
7.2. Actividad nitrogenasa .....	153
7.3. Actividades enzimáticas de la fracción vegetal de los nódulos .....	155
<b>8. Interacción de la fertilización nitrogenada y la salinidad en la simbiosis <i>R. leguminosarum</i>-<i>V. faba</i> .....</b>	<b>161</b>
8.1. Crecimiento y nodulación .....	161
8.2. Actividad nitrogenasa.....	166
8.3. Actividades enzimáticas de la fracción vegetal de los nódulos .....	169

**IV. CARACTERIZACIÓN DE LA NADH-GLUTAMATO SINTASA DE NÓDULOS DE *Vicia faba* ..... 178**

**9. Purificación parcial y caracterización de la NADH-glutamato sintasa de la fracción vegetal de nódulos de *V. faba*..... 178**

9.1. Purificación parcial de la NADH-GOGAT de nódulos de *V. faba* ..... 178

9.2. Determinación de posibles isoformas de la NADH-GOGAT ..... 182

9.3. Determinación del peso molecular de la NADH-GOGAT ..... 183

**10. Estudio de la especificidad de los anticuerpos frente a la NADH-GOGAT ..... 186**

PARTE 5

**DISCUSION..... 191**

- Efecto del NaCl sobre el crecimiento de *Rhizobium leguminosarum* ..... 193

- Caracterización del ciclo de la glutamato sintasa en nódulos de *V. faba* ..... 194

- Efecto del estrés salino en la simbiosis de *V. faba* ..... 198

- Caracterización de la NADH-glutamato sintasa de nódulos de *V. faba* ..... 206

PARTE 6

**CONCLUSIONES..... 211**

PARTE 7

**ESTADÍSTICA..... 215**

**1. Desarrollo ontogenético de la actividad nitrogenasa y de las enzimas del ciclo de la glutamato sintasa en nódulos de *Vicia faba* ..... 217**

**2. Evolución en el fotoperíodo del ciclo de la glutamato sintasa en nódulos fijadores de nitrógeno en *Vicia faba* ..... 218**

**3. Efecto del NaCl aplicado en el momento de la inoculación..... 219**

**4. Efecto del NaCl aplicado a simbiosis establecidas y fijadoras de nitrógeno ..... 221**

<b>5. Tolerancia al estrés salino en <i>V. faba</i>: Utilización de líneas puras</b> .....	223
<b>6. Interacción de la fertilización nitrogenada y la salinidad en la simbiosis <i>V. faba</i>- <i>R. leguminosarum</i></b> .....	224

PARTE 8

<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	227
---------------------------	-----

## Abreviaturas

---

ARA:	Actividad reductora de acetileno
DEAE:	Dietilaminoetil
EDTA:	Acido diaminotetraacético
Fd:	Ferredoxina
GDH:	Glutamato deshidrogenasa
$\gamma$ GH:	$\gamma$ -glutamil hidroxamato
GOGAT:	Glutamato sintasa, glutamina 2-oxoglutarato aminotransferasa
GS:	Glutamato sintasa
$\alpha$ KG:	Acido 2-oxoglutarato
NiR:	Nitrito reductasa
NR:	Nitrato reductasa
PA:	Parte aérea
PBS:	Solución salina tamponada con fosfato
PEP:	Fosfoenolpiruvato
PEPCasa:	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
PF:	Peso fresco
PS:	Peso seco
p/v:	Peso/volumen
PVPP:	Polivinilpolipirrolidona
R/PA:	Relación raíz/parte aérea
SDS:	Lauril sulfato
TEMED:	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
Tris:	Trihidroximetilaminometano
U:	Unidades
v/v:	Volumen/volumen
$\epsilon$ :	Coficiente de extinción molar del NAD(P)H



PARTE 1

# **Introducción**

---



### 1. EL NITRÓGENO EN LA BIOSFERA

El nitrógeno constituye el 78% de la atmósfera, donde se encuentra en forma de gas químicamente inerte y por tanto no aprovechable para los seres vivos. No obstante, la litosfera es el mayor reservorio de nitrógeno y la cantidad de este elemento existente en ella es más de cincuenta veces la de la atmósfera. Sin embargo, debido a que se encuentra en forma estable en rocas primarias y sedimentarias, tiene una baja participación en el ciclo del nitrógeno de la biosfera (Subba Rao, 1977). De ahí la importancia que adquieren los mecanismos de fijación de nitrógeno y la transformación cíclica de los compuestos nitrogenados para proveer las formas de nitrógeno requeridas por los distintos organismos vivos.

Este elemento está considerado como esencial para todos los organismos vivos. Forma parte de biomoléculas como ácidos nucleicos, proteínas y de compuestos cuantitativamente menos significativos como coenzimas, vitaminas y pigmentos. Es evidente, por tanto, que para crecer, multiplicarse y sobrevivir las plantas necesitan una fuente de nitrógeno.

A pesar de que el nitrógeno es un elemento abundante en la naturaleza, también es el nutriente limitante más frecuente de la productividad vegetal. Esto es debido a que la mayoría de las plantas absorben el nitrógeno combinado del suelo, donde se encuentra como nitrógeno orgánico o inorgánico en forma de nitratos o amonio, puesto que el nitrógeno atmosférico no es directamente aprovechable por las plantas y sólo puede ser fijado por algunas bacterias del suelo, por cianofíceas y por bacterias que viven en simbiosis con leguminosas y otras especies vegetales.

### 2. FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO EN VIDA LIBRE

La fijación biológica de nitrógeno no se ha encontrado en eucariotas, pero está ampliamente distribuida entre eubacterias y arqueobacterias. Recientemente Young (1992) ha elaborado un catálogo de fijadores de nitrógeno en el que se engloban cerca de un centenar de géneros en ocho categorías, distribuidos entre la mayoría de las divisiones filogenéticas. Esta recopilación es consecuencia del estudio de la evolución a nivel molecular, por hibridación, catalogación de oligonucleótidos y secuenciación, siendo la clave del proceso la biomolécula 16S del ARN ribosómico, que es universal y conserva su función (Woese, 1987).

La aportación de amonio al suelo por fijación en vida libre es mil veces menos efectiva que la de la asociación simbiótica, puesto que casi todo el amonio que producen es autoasimilado rápidamente. Los principales fijadores en vida libre son las cianobacterias formadoras de heterocistos *Anabaena* y *Nostoc*. Entre las bacterias destacan las aerobias como *Azotobacter*, *Beijerinckia* y *Bacillus polymyxa* y las anaerobias como *Clostridium* spp, *Desulfovibrio* y *Desulfotomaculum*. La contribución de estos grupos a la fijación biológica de nitrógeno es escasa (Stewart, 1982), aunque se pueden mencionar determinadas excepciones:

- *Clostridium* en zonas pantanosas y cultivos de arroz puede contribuir por encima de 33 Kg/Ha/año al nitrógeno fijado del suelo (Mishustin y Yemstev, 1975).
- *Azospirillum* spp, cuando se asocia con las raíces de algunas plantas herbáceas y cereales (Boddey y Döbereiner, 1984; Okon, 1984), produce beneficios en uno o ambos sentidos pero sin producir cambios anatómicos ni fisiológicos importantes. Del nitrógeno fijado por *Azospirillum* la planta utiliza el 5% y

no de forma directa (Okon *et al.*, 1983), ya que la planta dispone de él según mueren las bacterias, lo que supone una previa mineralización antes de ser absorbido.

- *Azotobacter* también es capaz de formar asociaciones no simbióticas con las raíces de plantas, llegando incluso a darse casos de especificidad entre ambos organismos (Döbereiner *et al.*, 1972).

### 3. FIJACIÓN SIMBIÓTICA DE NITRÓGENO: SIMBIOSIS *Rhizobium*-LEGUMINOSA

La asociación formada entre las leguminosas y las bacterias del suelo de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* que colonizan sus raíces formando nódulos, presenta dos características claves: Por una parte es el sistema que contribuye de forma mayoritaria al ciclo del nitrógeno y por otra parte es ampliamente reconocido el interés agrícola y ecológico de estos cultivos. En consecuencia, los estudios para conocer y potenciar esta simbiosis están justificados.

#### 3.1. Familia *Leguminosaceae*

Esta numerosa familia botánica está ampliamente distribuida en el reino vegetal, estimándose entre 16000 y 20000 especies incluidas en 750 géneros (Polhill y Raven, 1981). Taubert (1984), basándose en las diferencias florales, divide esta familia en 3 subfamilias, *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* y *Papilionoideae*. Sin embargo, hay alguna reestructuración taxonómica que le adjudica rango de familia a cada una de las 3 subdivisiones, quedando incluidas como familias *Mimosaceae*, *Caesalpinaceae* y *Fabaceae*, *Leguminosaceae* o *Papilionaceae* dentro del orden *Leguminales* (Hutchinson, 1964).

A la *Caesalpinioideae* la evolución la señala como la más antigua de las tres familias (Watson, 1981). Está formada por árboles y arbustos que se utilizan en la industria maderera y como plantas ornamentales. Algunas especies producen taninos, tintes, materias primas de interés farmacéutico, gomas y mucílagos, entre otros productos de interés industrial. Los datos bibliográficos señalan que sólo un 3-5% de las especies nodulan (Sprent, 1987).

La familia *Mimosaceae* incluye árboles, plantas leñosas tropicales y subtropicales y algunas plantas herbáceas perennes. Hay numerosas especies ornamentales de utilidad en floricultura y horticultura. Son también fuentes de taninos, goma arábiga, mucílagos, perfumes y colorantes. Se consideran vegetales que aportan una fuente de nitrógeno en ecosistemas extremos, como regiones árticas o bosques australianos. El 30% de los géneros estudiados presentan nódulos radicales (Allen y Allen, 1981), excepto en *Neptunia* que forma nódulos en tallos. Al estudiar la estructura del nódulo se evidencian aspectos morfológicos característicos, como la ausencia del cordón de infección. Los nódulos se encuentran en plantas con raíces carentes de pelos radicales y no asociados a raíces laterales, por lo que en estas plantas la infección tiene lugar bien entre células epidérmicas de la raíz o bien a través de heridas (Sprent *et al.*, 1987).

La familia *Papilionaceae* incluye todos los cultivos de legumbres con frutos y semillas ricas en lípidos así como la mayor parte de especies forrajeras de importancia agrícola. También se encuentran en esta familia arbustos y árboles utilizados en horticultura ornamental y en plantaciones que previenen la erosión del suelo y aumentan el contenido en nitrógeno del mismo. Las leguminosas grano directamente explotadas por el hombre pertenecen en su mayoría a las tribus *Phaseoleae*, *Vicieae* y *Cicereae*. Las leguminosas de interés en pastos y forrajes se agrupan entorno a las tribus *Trifoliae* y *Loteae*. Además, también se encuentran en esta familia, la tribu *Aeschynomeneae* que contiene una importante leguminosa grano, el cacahuete y la tribu *Genisteae* que aporta sólo un género, *Lupinus*, al catálogo de leguminosas grano. La nodulación entre miembros de esta familia se sitúa entorno al 97%.

### 3.1.1. *Vicia faba*

Es una leguminosa anual de tallo único, erecto, duro, hueco y frondoso; su altura va de 60 a 180 cm. No tiene zarcillos, presenta una raíz bien desarrollada y muchas raíces laterales que sostienen racimos de nódulos pequeños y lobulados que crecen horizontalmente. Las hojas son alternas, pinnadas, enteras, ovaladas y con una longitud entre 5 y 7.5 cm. El peciolo es acanalado, con pequeños pulvínulos. Las flores nacen en la axila de la hoja y son de color variable.

La sistemática de las especies de haba es muy confusa. Así, clásicamente se han reconocido dos variedades distintas: *hortensis* o haba de jardín o culinaria y *equina* o haba de campo. Murotava (1931) subdivide a *Vicia faba* en dos subespecies, *paucijuga* y *faba*, según el número de foliolos por hoja y esta última en tres variedades, *major*, *equina* y *minor*, según la relación grosor/longitud del tallo. Cubero y Suso (1981) encuentran que la principal característica que discrimina a estos grupos de cultivares es el tamaño de la semilla. Cubero (1983) sugiere que existen cuatro subespecies: *minor* (semillas pequeñas, redondeadas, tipificada como el haba común), *equina* (tamaño medio, tipificada como el haba de burro), *faba* (variedad mayor, haba culinaria o de horticultura con semilla ancha y grande) y *paucijuga*, que ya había reconocido Hanelt (1972) como una raza geográfica de la subespecie *minor*.

Las semillas muestran una gran variación, algunas son angulosas y están fuertemente comprimidas y otras son casi globosas. Su coloración externa puede ser blanca, amarilla, marrón, verde, púrpura o negra; todas poseen hilo prominente, que puede ser blanco, amarillo o negro (Kay, 1979). La composición aproximada es de 11% de humedad, 30% de proteínas, 45% de carbohidratos, 2% de grasa, 8% de fibra y 4% de cenizas (Clausen y Hansen, 1968). Se han identificado como proteínas mayoritarias las globulinas de 7S y 11-13S, correspondientes a vicilina y legumina y las albúminas (Millerd 1975).

La relación entre las distintas proteínas varía con la variedad y el genotipo (Pasqualini *et al.*, 1991). La composición de aminoácidos demuestra que son más ricas en lisina que los cereales (Hagberg y Sjodin, 1975) y más pobres en aminoácidos azufrados.

### 3.2. Familia *Rhizobiaceae*

Las bacterias que forman simbiosis fijadoras de nitrógeno con las plantas leguminosas pertenecen a la familia *Rhizobiaceae*. Clásicamente se han clasificado en dos géneros: *Rhizobium* (rápido crecimiento) y *Bradyrhizobium* (lento crecimiento), basándose en la velocidad de crecimiento (tiempo de generación) en un medio manitol-extracto de levadura. Estos dos grupos difieren además en la utilización de varios compuestos carbonados (Graham, 1964). El Manual Bergey's de Bacteriología Sistemática también incluye en esta familia un tercer género, *Agrobacterium*, que forma asociaciones no mutualistas con plantas dicotiledóneas; especies como *A. tumefaciens* y *A. rubi* forman tumores en las raíces y *A. rhizogenes* estimula la formación de hipertrofias corticales y la proliferación de raíces adventicias (Sneath, 1986; Staley, 1989; Williams, 1989).

Los estudios de homología del ADN y análisis del ARN ribosómico demuestran que *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* no están relacionados entre sí; en cambio, entre *Rhizobium* y *Agrobacterium* se presenta una estrecha correlación. La principal característica que une a *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* es su capacidad de formar nódulos con las leguminosas, por lo que es de interés determinar las semejanzas entre sus genes simbióticos.

La clasificación actual, basada en el hospedador y en otras características como homología del ADN (Jarvis *et al.*, 1980), relaciones serológicas (Vincent, 1977), perfil de proteínas solubles por electroforesis (Roberts *et al.*, 1980), presencia de polisacáridos, fagotipos, serotipos y utilización de azúcares y

aminoácidos (Jordan 1984; Scholl y Elkan, 1984; Dreyfus *et al.*, 1988; Chen *et al.*, 1988), establece cinco géneros:

- Género *Rhizobium*: Se incluyen seis especies de rápido crecimiento (Elkam, 1992).
  - a) *Rhizobium leguminosarum* que agrupa tres biovariedades: biovar. *viceae*, que infecta a las leguminosas de los géneros *Pisum*, *Vicia* y *Lens*; biovar. *phaseoli* que infecta a *Phaseolus* y biovar. *trifolii* que infecta a especies de *Trifolium*.
  - b) *Rhizobium meliloti* permanece como especie independiente y nodula a las especies de los géneros *Melilotus*, *Medicago* y *Trigonella* entre otras.
  - c) *Rhizobium loti*, que agrupa a microorganismos capaces de nodular un amplio rango de hospedadores entre las que se encuentra *Lotus*, *Cicer*, *Robinia pseudoacacia*, *Onobrychis*, y *Leucaena*.
  - d) *Rhizobium galegae* que infecta a especies del género *Galega* (Lindstrom, 1989).
  - e) *Rhizobium etli* sp. nov. que previamente se había denominado *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli* (tipo I), denominándose al (tipo II) como *Rhizobium tropici* (Martínez *et al.*, 1991), ambas infectan a *Phaseolus vulgaris*.

f) *Rhizobium kuakuii* que infecta a especies del género *Astrágalus* (Chen *et al.*, 1991).

- Género *Bradyrhizobium*: Las especies de lento crecimiento quedan agrupadas en la especie *B. japonicum*, que nodula a *Glycine* y *Lupinus*.
- Género *Sinorhizobium*: Género propuesto para la antigua especie de *R. fredii* que agrupa bacterias de rápido crecimiento capaces de nodular *Glycine*. Este nuevo género incluye dos especies, *S. fredii* y *S. xinjiangensis*.
- Género *Azorhizobium*: Incluye la especie *A. caulinodans*, que forma nódulos fijadores en raíz y tallo de *Sesbania rostrata*.
- Recientemente Sprent (1990) ha incluido un quinto género, el género *Photorhizobium*.

### 3.3. Establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa

Las bacterias del género *Rhizobium* infectan las células corticales de las raíces de leguminosas y dan lugar a la formación de nódulos. El proceso de nodulación ha sido recientemente revisado por Kijne (1992) y se puede resumir en 3 etapas: a) especificidad o estado de preinfección, b) infección y formación del nódulo, en la que se incluyen, la unión de *Rhizobium* al pelo radical, la deformación de éste, la iniciación y la elongación del cordón de infección y la liberación de bacterias en el interior de las células vegetales del córtex radical, c) efectividad o funcionamiento del nódulo.

El desarrollo de los nódulos ha sido caracterizado por Vincent (1980) en una serie de etapas secuenciadas e independientes. Se le han asignado códigos fenotípicos, que pueden estar influenciados por uno o más genes (Appelbaum, 1990) y han sido revisados y ampliados por Caetano-Anollés y Gresshoff (1991). Este proceso involucra además de la etapa de preinfección, otros dos eventos independientes, la infección (invasión) y el desarrollo del nódulo, en el que se incluye la división celular, la diferenciación y la funcionalidad. El proceso de infección incluye: La unión al pelo radical (Roa), la deformación de éstos (Hac), la iniciación y la elongación del cordón de infección (Inf) y la liberación de bacterias en el interior de las células vegetales del córtex radical (Bar).

La infección de las leguminosas por *Rhizobium* ocurre a través de tres vías alternativas: A través del pelo radical, la más usual, a través de las heridas (Pueppke, 1986) y por las células epidérmicas, descrita por Faria *et al.* (1988). La naturaleza química y física de la pared celular del pelo radical es probablemente un factor crítico para determinar la infección (Sequeira, 1986). Además, en la infección hay que considerar dos aspectos claves de *Rhizobium*: Los polisacáridos que segregan, de los que al menos existen cuatro tipos (Carlson, 1982; Reuber *et al.*, 1991) que son degradados por enzimas celulolíticas y pectolíticas (Martínez-Molina y Olivares, 1982) y los genes *nod*, que controlan la infección e iniciación del nódulo, inducidos por exudados radicales (Zaat *et al.*, 1989).

En consecuencia, con la liberación de quimioattractantes por las plantas, con las señales inducidas por los genes *nod* y con las señales específicas producidas por *Rhizobium* se induce el crecimiento y el metabolismo de las células nodulares en la raíz. Una o más de estas señales moleculares es un mitógeno específico que probablemente actúe influyendo en el balance hormonal endógeno (Ligero *et al.*, 1991; Truchet *et al.*, 1991; Franssen *et al.*, 1992).

Paralelamente al proceso de infección, algunas células del córtex radical se diferencian para dar lugar a la iniciación del nódulo (Noi). Esto implica el inicio de la mitosis cortical, formación del meristemo nodular y desarrollo de la estructura del nódulo. Ambos procesos, tanto la infección como el desarrollo del nódulo, se inician a las pocas horas de haberse puesto en contacto la bacteria con la raíz. Las últimas etapas de la simbiosis incluyen la diferenciación de la bacteria en bacteroide (Bad), quedando confinado en vesículas rodeadas por la membrana peribacterioidea, la síntesis de nitrogenasa (Nif) y otros metabolitos codificados por genes requeridos para la fijación (Cop) y la persistencia del nódulo (Nop).

Se han descrito dos tipos de nódulos en las leguminosas, nódulos determinados y nódulos indeterminados, que difieren en su morfología, en la estructura y desarrollo del cordón de infección (Rae *et al.*, 1992), en su funcionamiento y en la presencia o no de meristemo apical (Sprent *et al.*, 1989). Las leguminosas de zonas templadas como *Pisum*, *Vicia*, *Trifolium* y *Medicago* desarrollan nódulos indeterminados, mientras que las leguminosas de zonas tropicales, *Glycine*, *Phaseolus*, *Vigna*, etc. presentan nódulos determinados.

### 3.4. Bioquímica de la fijación de nitrógeno: Nitrogenasa e Hidrogenasa

La capacidad de fijar nitrógeno se debe al complejo enzimático nitrogenasa (EC 1.7.99.2), purificado y aislado por primera vez por Carnaham *et al.* (1960) en *Clostridium pasteurianum*. La estructura, función y mecanismo de acción de esta enzima, ha sido objeto de estudio durante los últimos treinta años (Yates, 1992).

El complejo enzimático consta de dos componentes: el componente I, una molibdoferroproteína o nitrogenasa y el componente II, que es una ferroproteína denominada nitrogenasa reductasa. El centro activo de la enzima es un cofactor

con hierro y molibdeno denominado FeMoco (Imperial *et al.*, 1989). La actividad viene determinada por la existencia de los dos componentes, ATP-Mg<sup>2+</sup>, donadores de electrones y un sistema de protección frente al oxígeno (Postgate, 1987). Normalmente como donador de electrones para la enzima *in vivo* actúa la ferredoxina y flavodoxina (Gallon y Chaplin, 1987), que proporcionan los equivalentes de reducción necesarios para reducir al nitrógeno. El mecanismo de transferencia de electrones ha sido recientemente descrito por Thorneley (1990) mediante un proceso endergónico que requiere un mínimo de energía de 960 kJ por unidad de nitrógeno fijado. De ahí que se requieran 16 moléculas de ATP hidrolizadas por los 8 electrones transportados a través del complejo nitrogenasa (Pate y Layzell, 1990).

Se ha descrito la existencia de una nitrogenasa independiente del molibdeno y dependiente del vanadio (Bishop *et al.*, 1980; Robson *et al.*, 1986) denominada nitrogenasa-2, cuyo centro activo es el FeVaco. Asimismo, se ha encontrado una nitrogenasa-3, dependiente del hierro como único metal en el centro activo de la enzima, FeFeco (Bishop, 1990; Bishop y Premakumar, 1992).

La nitrogenasa de todos los diazotrofos en los que se ha estudiado reduce protones a hidrógeno, concomitantemente con la reducción de nitrógeno a amonio. Bulen y LeCompte (1966) describieron este hecho por primera vez en extractos de *Azotobacter* y demostraron que el proceso es dependiente del ATP. El mecanismo más aceptado para explicar esta producción de hidrógeno fue propuesto inicialmente por Chatt (1980) y revisado posteriormente por Lowe *et al.* (1985) y Thorneley y Lowe (1985). El modelo predice una estequiometría de un mol de hidrógeno producido por mol de nitrógeno fijado, lo que implica que el 25% de los electrones que pasan a través de la nitrogenasa se desvían y en consecuencia es una fuente de ineficiencia de esta actividad (Schubert y Evans, 1976; Dixon *et al.*, 1981).

La presencia de un sistema con capacidad de oxidar el hidrógeno independiente de la nitrogenasa (fenotipo Hup), se ha demostrado en algunas cepas de *Bradyrhizobium* spp, *B. japonicum*, *R. meliloti* y *R. leguminosarum* biovar. *viceae* (Evans *et al.*, 1981; Brewin, 1984; Evans *et al.*, 1985; 1987) y en *Azorhizobium caulinodans*, bacteria que nodula en tallos (Stam *et al.*, 1984). Puesto que ambas enzimas, nitrogenasa e hidrogenasa, están involucrados en el metabolismo del hidrógeno en los nódulos radicales, el nivel de esta molécula en el nódulo es difícil de evaluar cuantitativamente. Esto indujo a Schubert y Evans (1976) a definir el término de eficiencia relativa, que relaciona el desprendimiento de H<sub>2</sub> con el flujo de electrones a través de la nitrogenasa.

El valor de eficiencia relativa se identifica con la eficiencia del sistema fijador de nitrógeno. El máximo valor es 1 y significa que no hay liberación de hidrógeno. Para un sistema que carece de hidrogenasa su máximo valor teórico es 0.75, por tanto valores entre 0.75 y 1 indican que alguna hidrogenasa está presente aunque no lo suficientemente eficiente para consumir todo el hidrógeno (Evans *et al.*, 1981; Simpson y Burris, 1984).

A esta actividad se le atribuyen diversas funciones, todas ellas beneficiosas para la fijación de nitrógeno (Dixon, 1972). Por una parte, se elimina hidrógeno que puede inactivar a la nitrogenasa, aún cuando se cuestionan dos hechos, que la concentración de hidrógeno alcanzada sea lo suficientemente alta y que existan barreras en el medio que impidan su difusión. Sin embargo, los datos encontrados de K<sub>i</sub> del hidrógeno para inhibir la reducción de nitrógeno (Rasche y Arp, 1989), así como las concentraciones de ambos gases en el interior del nódulo (Hunt *et al.*, 1988), postulan esta función como correcta. Por otra parte, el potencial redox de la oxidación de hidrógeno es lo suficientemente bajo, - 420 mV, como para que se pueda utilizar como fuente adicional de poder reductor y energía para el sistema fijador de nitrógeno. La oxidación del hidrógeno acoplada a la formación de ATP ha sido descrita por Dixon (1968), Ruíz-

Argüeso *et al.* (1979) y Nelson y Salminen (1982), entre otros. Por último, la eliminación de hidrógeno está acoplada al consumo de oxígeno, con lo que se protege a la nitrogenasa de éste. De esta manera, se favorece el mecanismo de "protección respiratoria", presente en bacterias fijadoras de nitrógeno en aerobiosis. Esta protección respiratoria no ha sido demostrada en nódulos intactos (Serraj *et al.*, 1992; Garrido, 1992).

La hidrogenasa ha sido aislada de numerosos microorganismos (O'Brian y Maier, 1988) y purificada a homogeneidad de bacteroides (Arp, 1985) y de células quimioautotróficas (Harker *et al.*, 1984). La enzima es una proteína de localización citoplasmática unida a membranas, con un peso molecular nativo de 100 kD y dos subunidades de 65 y 35 kD. Contiene Ni y Fe en una relación 1/10. Posee dos centros 4Fe-4S, un centro 3Fe-4S y un centro con Ni (Fauque *et al.*, 1988). El donador de electrones endógeno es desconocido, pudiendo actuar el azul de metileno y el bencil viológeno como donadores exógenos. Los inhibidores de la enzima son el CO (Arp y Burris, 1981), el acetileno (Hyman y Arp, 1987) y el oxígeno (Seefeldt y Arp, 1989a). Como inactivadores actúan el oxígeno y la cianida (Seefeldt y Arp, 1989b).

Respecto al funcionamiento fisiológico y genético de la hidrogenasa, se puede indicar que esta enzima, por sí misma, no es capaz de transferir los electrones del hidrógeno al oxígeno directamente. Eisbrenner y Evans (1983) proponen la cadena transportadora de electrones en esta transferencia, profundizando en esta posibilidad se han realizado diversos estudios, como los de Emmerich *et al.* (1979) y O'Brian y Maier (1985). Los genes de la hidrogenasa se han designado como *hup*. En *Bradyrhizobium japonicum* los genes *hup* no parecen estar asociados a un plásmido (Cantrell *et al.*, 1982), mientras que en *R. leguminosarum* están localizados en el plásmido *sym* (Palacios *et al.*, 1988) de 15 kb organizadas en 6 unidades transcripcionales designadas como regiones *hup*, desde la I hasta la VI; todas ellas se transcriben

en la misma dirección (Ruíz-Argüeso *et al.*, 1991). Los genes estructurales de la hidrogenasa de *B. japonicum* están localizados en un operón simple (Sayavedra-Soto *et al.*, 1988). Al comparar la secuencia de los genes que codifican la hidrogenasa de distintos microorganismos se observa una gran homología (Hidalgo *et al.*, 1992). Sin embargo, al transferir el cósmido pHU52 que contiene el genoma de la hidrogenasa a cepas de *R. meliloti* y *R. trifolii*, sólo se detecta una actividad hidrogenasa pequeña, indicando que el fenotipo Hup no se ha integrado establemente en el cromosoma del huésped (Lambert *et al.*, 1987).

### 3.5. Nodulinas

La formación de los nódulos está acompañada de la expresión de genes específicos de plantas, cuyos productos se denominan nodulinas (Sengupta-Gopalan *et al.*, 1986; Grovers *et al.*, 1987; Gloudemans *et al.*, 1987). Pueden clasificarse en nodulinas tempranas y tardías dependiendo del momento de expresión durante el desarrollo del nódulo. Los productos de genes de plantas específicamente expresados en el estado de preinfección, no pueden ser llamados nodulinas, según la definición; sin embargo, se incluyen dentro de las nodulinas tempranas, puesto que la expresión de estos genes está ligada al nódulo (Gloudemans *et al.*, 1989). Los genes que codifican a las nodulinas tempranas se denominan ENOD y los correspondientes a las nodulinas tardías NOD (Nap y Bisseling, 1989), que pueden ir precedidos por las iniciales del género y de la especie de la planta. Cuando se obtiene la proteína o su producto de traducción *in vitro* se indica la nodulina por la letra N seguida de las iniciales de la especie vegetal y el peso molecular determinado por SDS-PAGE; también se puede adicionar la función bioquímica si se conoce (Van Kammen, 1984). Se diferencian de las proteínas bacteroidales porque son sintetizadas en ribosomas 80S por ARN-poly A<sup>+</sup>. Otra evidencia adicional del origen vegetal de las nodulinas es que el ARNm que las codifica es complementario del ADN de la planta.

En el estado de preinfección se han detectado dos genes, RH-42 y RH-44, que codifican dos proteínas de 42 y 44 kD respectivamente que están implicadas en la diferenciación y encurvamiento del pelo radical (Gloudemans *et al.*, 1989). En el proceso de infección se han identificado dos nodulinas en guisante, PsENOD-12 y PsENOD-5. La primera es una proteína formada por dos pentapéptidos iguales ricos en prolina y está unida a componentes de la pared celular. Esta nodulina, que se expresa en las células que crecen en el cordón de infección y en las que están delante del ápice del mismo, está implicada en la formación del primordio nodular (Scheres *et al.*, 1990). La segunda es una proteína rica en prolina, alanina, glicina y residuos de serina, unida a la lactato arabinosa. Sólo se expresa en las células que contiene el cordón de infección (Knox *et al.*, 1989), aunque está presente en las células infectadas iniciales del nódulo (Scheres *et al.*, 1990). Esta proteína funciona tanto en la preinfección como en el crecimiento del cordón de infección y en la proliferación bacteriana. Además, en guisante se han detectado otras dos nodulinas, la PsENOD-3 y la PsENOD-14. Ambas son metaloproteínas, con un peso molecular de 6 kD y exclusivamente localizadas en las células infectadas del nódulo (Scheres *et al.*, 1989). Por último se ha identificado una última nodulina en guisante, la PsENOD-2 (Scheres *et al.*, 1990), que guarda homología con la GmENOD-2 de soja (Bisseling *et al.*, 1991). Ambas proteínas tienen dos pentapéptidos iguales con dos residuos de prolina cada uno, el producto que forman está involucrado en la formación del parénquima nodular (van der Wield *et al.*, 1990) y en consecuencia en la formación de la barrera de difusión al oxígeno sugerida por Tjepkema y Jocum (1974) y Witty *et al.* (1986). En *Glycine max* se han identificado otras 3 nodulinas más, GmENOD-13, GmENOD-40 y GmENOD-55 (Bisseling *et al.*, 1991).

Las nodulinas tardías han sido detectadas en nódulos de todas las leguminosas estudiadas, entre las que se incluyen alfalfa (Maxwell *et al.*, 1989),

judía (Ronis *et al.*, 1985), trébol (Kneen *et al.*, 1984), altramuza (Strózycki *et al.*, 1985), guisante (Cregan y Keyser, 1986), soja (Bergensen y Nutman, 1957), haba (Phillips *et al.*, 1986) y la tropical *Sesbania* (Duc y Picard, 1986). Verma *et al.* (1992) sugieren que la inducción de las nodulinas tardías requiere una liberación endocitótica de la bacteria y además proponen, debido a la semejanza estructural encontrada entre ellas, que derivan de un ancestro común. Consecuentemente, las nodulinas tardías están relacionadas con el proceso de la fijación simbiótica de nitrógeno, por lo que se consideran nodulinas metabólicas.

A nivel del transporte de metabolitos a través de la membrana peribacteroidea, se han implicado cuatro nodulinas: Una se ha identificado como la colina-quinasa II, responsable de la integridad de la membrana peribacteroidea (Mellor *et al.*, 1986); otra, clasificada como N-24, se localiza en el interior de la membrana; la tercera conocida como N-26, se relaciona con el transporte entre la célula huésped y el bacteroide (Fischer y Hennecke, 1987) y puede ser fosforilada por una quinasa dependiente del calcio (Weaver *et al.*, 1991) y la última, identificada en *Glycine max* (Sheehy *et al.*, 1985), se ha denominado N-23 y es miembro de una pequeña familia de cinco genes todos ellos caracterizados.

La leghemoglobina, que constituye casi el 20% de la proteína total soluble del nódulo, se considera una nodulina metabólica que contribuye a crear las condiciones requeridas para la fijación de nitrógeno, ya que facilita la difusión del oxígeno al bacteroide (Sheehy *et al.*, 1985). Las leghemoglobinas están codificadas por más de un gen, así en el genoma de soja se han caracterizado cuatro genes y varios pseudogenes (Brisson y Verma, 1982).

Al estudiar el metabolismo del carbono en nódulos se ha identificado la nodulina Ngm-100 (Thummler y Verma, 1987) como una subunidad de la sacarosa sintasa nodular. Además, entre las isoenzimas de la fosfoenolpiruvato

carboxilasa (PEPC) también se puede detectar otra nodulina tardía. De hecho, se ha identificado una banda de actividad en raíz y dos bandas en nódulos de alfalfa, guisante y soja. En judía hay dos bandas en raíz y tres bandas en nódulos, lo que implica que la banda adicional observada en la actividad PEPC nodular puede ser considerada una nodulina (Deroche y Carrayol, 1989).

Otras dos nodulinas metabólicas se han descrito en el proceso de asimilación del amonio en nódulos de leguminosas. El amonio se metaboliza, prioritariamente por las enzimas del ciclo de la glutamato sintasa. Ambas proteínas se expresan específicamente en nódulos. Respecto a la glutamina sintetasa se pueden distinguir dos formas, la que se expresa como proteína específica del nódulo ( $GS_n$ ) y aquella cuya expresión se incrementa con la simbiosis (Forde y Cullimore, 1989). La expresión de la  $GS_n$  esta regulada, según la especie, por el balance carbono/nitrógeno en el nódulo (Chen *et al.*, 1990; Ortega *et al.*, 1990) y no por la disponibilidad del amonio (Hirel *et al.*, 1987).

Los nódulos de alfalfa expresan glutamato sintasa y los de judía dos isoenzimas, de las cuales una de ellas se considera específica del nódulo, la glutamato sintasa II (Anderson *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 1990); sin embargo está en discusión su consideración como nodulina, puesto que estas dos isoenzimas son inicialmente expresadas independientemente de la inducción de la nitrogenasa y en nódulos no fijadores de nitrógeno se expresan al menos el 15% de su actividad. No obstante, Egli *et al.* (1989) y Chen *et al.* (1990) determinan que la fijación simbiótica es esencial para la inducción máxima de la glutamato sintasa nodular.

También se describen nodulinas tardías que intervienen en la síntesis de asimilados nitrogenados exportados del nódulo. En las leguminosas de origen tropical que exportan ureidos se ha identificado una nodulina denominada

uricasa II, caracterizada en nódulos de judía (Padilla *et al.*, 1987) y soja (Nguyen *et al.*, 1985). Bergman *et al.* (1983) la denominaron inicialmente n-uricasa o Ngm-35 y la caracterizaron como una subunidad de 33 kD, siendo la segunda proteína más abundante del nódulo. Esta uricasa no presenta homología con los dos sistemas de uricasa que existen en raíces noduladas de soja. Se localiza en los peroxisomas de las células no infectadas del nódulo. La secuencia de aminoácidos no revela información de cómo se transporta al peroxisoma aunque la existencia de dos dominios hidrofóbicos puede facilitar el transporte a través de la membrana peroxisomal (Nguyen *et al.*, 1985). La expresión inicial de esta nodulina no depende de la fijación activa de nitrógeno (Sánchez *et al.*, 1987) sino de bajas concentraciones de oxígeno. Esto sugiere a los autores citados que en las nodulinas tardías hay dos tipos de genes, unos regulados por el desarrollo del nódulo y otros por condiciones ambientales.

#### 4. METABOLISMO DEL NITRÓGENO EN PLANTAS

El nitrógeno inorgánico es utilizado por las leguminosas mediante los procesos de fijación de nitrógeno y asimilación de nitrato. Aún cuando el nitrógeno atmosférico es mucho más abundante en la naturaleza que el nitrato, la cantidad de nitrógeno orgánico producido por la asimilación de nitrato es cien veces superior al producido por la fijación biológica debido a la amplia gama de organismos, algas, hongos y plantas superiores, capaces de asimilarlo (Guerrero *et al.*, 1981).

Las leguminosas son prácticamente las únicas plantas superiores que pueden utilizar el nitrógeno atmosférico y el nitrógeno inorgánico presente en el suelo. Cuando ambas fuentes de nitrógeno están disponibles para las plantas, la contribución de nitrógeno fijado a la nutrición de la planta varía con las condiciones de cultivo, con el genotipo de la planta (Duc, 1980) y con el contenido de nitrógeno inorgánico en el suelo (Bello *et al.*, 1980). En soja, el porcentaje de nitrógeno procedente de la fijación varía desde un 25% en suelos fértiles, a un 80% en suelos áridos (LaRue y Paterson, 1981). En alfalfa, entre el 40% y el 70% del nitrógeno total procede de la simbiosis (Heichel *et al.*, 1981), mientras que en haba el porcentaje se sitúa alrededor del 87% (Richards y Soper, 1978).

##### 4.1. Asimilación de nitrato

El nitrato junto con el amonio son las formas más usuales de nitrógeno que absorben las plantas. Además de los fertilizante y de la lluvia, el nitrato y el amonio pueden proceder también de la mineralización de la materia orgánica del suelo. El nitrato absorbido del suelo es transportado a las hojas donde prioritariamente se reduce por acción de dos enzimas, la nitrato reductasa (NR) y

la nitrito reductasa (NiR), para formar amonio. El proceso de reducción del nitrato consume ocho electrones (Stewart, 1988).

La NR (EC 1.6.6.1) requiere dos electrones que son donados por el NADH preferentemente, aún cuando puede utilizar otros donadores de electrones. En raíces de cebada se ha encontrado una NR biespecífica NAD(P)H junto con la específica del NADH, mientras que en hoja sólo se ha encontrado la NADH-NR (Dailey *et al.*, 1982). Las propiedades cinéticas, bioquímicas y fisiológicas estudiadas en la enzima foliar y radical son semejantes (Oji *et al.*, 1989). Es interesante indicar, que en soja se han separado y parcialmente caracterizado tres NR, una inducible y dos constitutivas, de las cuales una es dependiente del NADPH y otra del NADH (Streit *et al.*, 1987). La NR constitutiva se afecta directamente por los productos de la fijación biológica, los ureidos, más que por el metabolismo del nitrato *in vivo* (Li y Gresshoff, 1990).

Funcionalmente parece localizarse soluble en el citoplasma (Beever y Hageman, 1980). Sin embargo, por inmunolocalización se ha detectado en cloroplastos de algas (López-Ruiz *et al.*, 1985) y de espinacas (Kamachi *et al.*, 1987). Se puede pensar que la NR tiene epitopos comunes con algunas enzimas abundantes en el cloroplasto, lo que induciría a su aparente detección en dichos orgánulos. Schuster *et al.* (1989) informan de cuatro formas diferentes de NR, una de ellas dependiente del "factor plastídico", dos son citosólicas y la otra depende del amonio. También se ha descrito en raíces de maíz una NR-particulada asociada a membranas (Ward *et al.*, 1988; 1989).

La presencia de un sistema activo de reducción de nitrato en nódulos de leguminosas se demostró por primera vez en soja (Evans, 1954). En los nódulos pueden separarse dos fracciones, la citosólica de origen vegetal y la bacteroidea que es de origen microbiano y en ambas puede darse la reducción de nitratos. Las leguminosas de los géneros *Phaseolus*, *Lotus*, *Pisum* y *Vicia* expresan

actividad NR sólo en la fracción citosólica de los nódulos (Becana *et al.*, 1985; Caba *et al.*, 1990a). Otros géneros como *Glycine*, *Medicago* y *Vigna* muestran actividad NR tanto en citosol como en bacteroide (Streeter, 1982; Becana y Sprent, 1987; Becana y Bedmar, 1990). En un estudio realizado en nódulos de *V. faba* se comprobó que el nitrato no tiene acceso a la región bacteroidal, quedando restringida su localización a los tejidos corticales del nódulo (Sprent *et al.*, 1987).

La reducción de nitrito a amonio, mediante una transferencia de seis electrones, está catalizada por la NiR (EC 1.7.7.1). El sustrato que utiliza esta enzima raramente se acumula bajo condiciones normales en los tejidos vegetales, puesto que, la NiR invariablemente presenta unos valores mucho más elevados de actividad que la NR (Bray, 1983). Además, existe una coordinación perfecta entre esta enzima y las que secuencian la asimilación de amonio, con objeto de evitar la acumulación de amonio que podría inducir un síndrome tóxico. Weber *et al.* (1990) observan que el nivel de glutamina sintetasa es siempre mayor que el de la NiR, como medida de seguridad que evita la acumulación de amonio.

La NiR en tejidos fotosintéticos está asociada a cloroplastos (Beever y Hageman, 1980) y utiliza la ferredoxina como donador de electrones. El nitrito también puede ser metabolizado en raíz donde la NiR se asocia prioritariamente a plastidios (Suzuki *et al.*, 1981) y esporádicamente al citoplasma (Fischer y Klein, 1988), utilizando piridín nucleótidos, procedentes de la vía de las pentosas fosfato, como donadores de electrones (Bowsher *et al.*, 1988). La regulación de la expresión genética de esta enzima está mediada por el nitrato, el fitocromo y el factor plastídico, dependiendo de la especie vegetal (Mohr *et al.*, 1992).

Se ha detectado actividad NiR en ambas fracciones nodulares, citosólica (Caba *et al.*, 1990a) y bacteroidal (Streeter, 1982; Becana *et al.*, 1985), aún

cuando los datos bibliográficos de la existencia de actividad NiR en esta última fracción son contradictorios (Stephens y Neyra, 1983; Giannakis *et al.*, 1988).

### 4.2. Asimilación de amonio

La asimilación de amonio en plantas ha sido revisada ampliamente por Mifflin y Lea (1980), Lea *et al.* (1990), Kumar y Abrol (1990) y Valpuesta y Cárdenas (1992), entre otros autores. La procedencia del amonio para la planta puede ser diversa: a) como tal, se puede absorber del medio externo directamente por la raíz; b) en hojas y otros órganos de la planta, procede de la asimilación del nitrato mediante las enzimas mencionados; c) en nódulos de leguminosas, se considera el primer producto estable de la fijación del nitrógeno atmosférico (Bergensen y Turner, 1967) localizado en el bacteroide; d) en semillas y tejidos senescentes, del catabolismo de las aminas, glutamina y asparragina; e) en leguminosas tropicales, de la urea procedente del catabolismo de ureidos (Shelp *et al.*, 1985); f) en general, puede proceder del catabolismo de los aminoácidos, arginina, cisteína, serina, triptófano, fenilalanina (Mazelis, 1980; Rennenberg, 1984) y por último g) como proceso generalizado en las plantas, de la fotorrespiración (Keys *et al.*, 1978).

#### 4.2.1. Ciclo de la glutamato sintasa

Numerosas evidencias indican que la glutamina sintetasa y la glutamato sintasa operan activamente en plantas superiores desde que Tempest *et al.* (1970) descubrieran la glutamato sintasa. Los experimentos realizados con  $^{15}\text{N}$  (Lewis y Pate, 1973), con  $^{13}\text{N}$  (Wolk *et al.*, 1976; Meeks *et al.*, 1978), con inhibidores metabólicos (Mifflin y Lea, 1980) o mediante el aislamiento de orgánulos (Wallsgrove *et al.*, 1979) lo pusieron de manifiesto.

Una característica de esta ruta metabólica es su naturaleza cíclica en la cual el glutamato actúa como aceptor de amonio y como producto final de su asimilación. Rhodes *et al.* (1980) lo denominaron ciclo de la glutamato sintasa. El amonio es inicialmente incorporado en el carbono  $\gamma$  del ácido glutámico formándose la amina correspondiente, glutamina, por acción de la glutamina sintetasa que requiere ATP. Esta reacción está bloqueada por un inhibidor específico de la enzima, la metionina sulfoximina. La incorporación del amonio es altamente efectiva debido a la baja  $K_m$  de la enzima para el amonio y a la hidrólisis del ATP que favorece el equilibrio de la reacción en este sentido.

La segunda enzima, la glutamato sintasa, glutamina oxoglutarato aminotransferasa, es la encargada de transferir el grupo amino de la glutamina al carbono 2 (posición  $\alpha$ ) del ácido  $\alpha$ -cetoglutarico para formar glutamato. Es una aminación reductiva que utiliza NAD(P)H o ferredoxina reducida como donadores de electrones. El empleo de  $^{15}\text{N}$  y de azaserina, inhibidor de la transferencia de grupos amino, han demostrado el funcionamiento de esta enzima (Robertson y Farnden, 1980).

La asimilación de amonio en plantas superiores es un proceso que no puede separarse del metabolismo energético general de la planta ni del metabolismo del carbono en particular, ya que para que funcione este ciclo hace falta ATP, poder reductor y metabolitos carbonados (Mifflin y Lea, 1980).

### 4.2.1.1. Glutamina sintetasa (GS)

#### a) *En plantas superiores*

La GS (EC 6.3.1.2) es una proteína octamérica con un peso molecular de 350 kD y con subunidades de 38-45 kD, dispuestas en dos tetrámeros planares. El pH óptimo de la enzima depende del catión divalente empleado en la

reacción: Si es  $Mg^{2+}$  el pH es de 8.0 y si es  $Mn^{2+}$  el pH óptimo es de 5.0. La actividad de esta enzima se afecta por los niveles de  $Mg^{2+}$ , por la carga energética y el pH.

Se ha localizado en diferentes órganos de la planta, principalmente en hojas de una amplia variedad de especies vegetales (Hirel y Gadal, 1978). Durante el desarrollo de la semilla se ha identificado una GS en el endospermo de maíz (Oaks *et al.*, 1979) similar a la enzima radical. Citológicamente se ha encontrado en cloroplastos (O'Neal y Joy, 1973) y en citoplasma (Mifflin, 1974). Esta dual localización de la GS indica que hay más de una forma de la enzima.

La identificación de dos isoformas de esta enzima, por vez primera, la realizaron Stasiewicz y Dunham (1979) por cromatografía de intercambio iónico y las denominaron  $GS_1$  y  $GS_2$ . Posteriormente, las diferentes isoformas de la enzima se han descrito en numerosas especies vegetales (McNally y Hirel, 1983). Las raíces solo contienen una isoforma similar a la  $GS_1$  (Mann *et al.*, 1979) que ha sido definida como  $GS_R$ . Los experimentos realizados con técnicas de inmunofluorescencia han demostrado una compartimentación dual de esta actividad enzimática dentro de la hoja (McNally y Hirel, 1983), estando la  $GS_1$  restringida al citosol y la  $GS_2$  al cloroplasto.

Las tres isoformas exhiben propiedades cromatográficas diferentes y específicas. La isoforma cloroplastídica es poco termoestable y sensible a la inactivación por N-etilmaleimida y otras moléculas con grupos sulfhidrilo (Stewart *et al.*, 1980). Por utilización de anticuerpos específicos se ha demostrado que es distinta de la isoforma citosólica (Hirel *et al.*, 1987). La isoforma citosólica presenta una cinética de Michaelis-Menten semejante a la isoforma radical, pero distinta a la cloroplastídica (Smirnoff y Stewart, 1987).

En virtud de su localización subcelular se ha sugerido que la GS<sub>1</sub> puede funcionar en la asimilación de amonio en la oscuridad (McNally *et al.*, 1983), pudiendo proceder éste de la degradación proteica, de la reducción de nitratos o de la absorción del suelo (Lea *et al.*, 1990), mientras la GS<sub>2</sub> tiene un papel predominante en la asimilación del amonio procedente del proceso fotorrespiratorio. Wallsgrave *et al.* (1987) con el uso de mutantes y estudiando los cambios de nivel de los polipéptidos de ambas isoformas y de sus correspondientes ARN<sub>m</sub>, han deducido que la GS<sub>1</sub> es responsable de la asimilación de amonio en tejidos senescentes (Kamachi *et al.*, 1992).

Se asume que las diferentes isoformas están codificadas por diferentes, pero relacionados, genes y que los distintos genes se expresan específicamente en algunos órganos (Tingey *et al.*, 1987). La comparación inmunológica entre ambas isoformas ha demostrado un cierto grado de similitud estructural, ya que son reconocidas de forma cruzada por anticuerpos policlonales frente a una de ellas. El análisis de la secuencia de aminoácidos estima una homología del 75% para las isoenzimas citosólica y cloroplastídica. Los genes de la GS parecen estar regulados por diferentes factores como la luz (Edwards y Coruzzi, 1989), el fitocromo (Sakamoto *et al.*, 1990) y la disponibilidad de amonio (Hirel *et al.*, 1987).

McNally *et al.* (1983) clasifican a las plantas en cuatro categorías, basándose en la distribución de las isoformas de GS: a) el primer grupo incluye plantas que sólo contienen la GS<sub>1</sub>, son plantas etioladas o cloróticas-parasitadas (Hopfner *et al.*, 1990), b) las del segundo grupo sólo tienen GS<sub>2</sub>, a este grupo pertenecen la espinaca, el tabaco, la mostaza, etc. (Hopfner *et al.*, 1988), c) en el tercer grupo se incluyen plantas que poseen ambas isoformas, estando la isoforma GS<sub>1</sub> en menor proporción, d) las del cuarto grupo poseen también ambas isoformas, pero en este caso la isoforma GS<sub>1</sub> se encuentra en mayor proporción, perteneciendo a este grupo la mayoría de las plantas C<sub>4</sub> y las plantas

tropicales. En plantas C<sub>4</sub>, la presencia de ambas isoenzimas es similar en células de la vaina y del mesófilo (Yamaya y Oaks, 1988) lo que le confiere una ventaja en términos de eficiencia de la utilización del nitrógeno. La proporción relativa de ambas isoformas depende de diversos factores como la luz (Hirel *et al.*, 1982), el estado de desarrollo (Tobin *et al.*, 1985) o la forma de nitrógeno suministrada a la planta (Mack y Tischner, 1990).

Las diferentes isoformas de la GS están codificadas por una pequeña familia de genes que se han encontrado en diferentes partes de la planta (Hirel *et al.*, 1987; Forde *et al.*, 1989; Walter y Coruzzi, 1989; Edwards *et al.*, 1990). El patrón de expresión de los genes que codifican estas isoformas se ha conocido por su expresión en plantas transgénicas (Edwards *et al.*, 1990). El gen que codifica la forma cloroplastídica (GS<sub>2</sub>) en *Pisum sativum* es específicamente expresado en células fotosintéticas de plantas transgénicas de tabaco, mientras que la GS citosólica (GS<sub>1</sub>) es activa en los elementos del floema de las mismas plantas transgénicas. En *Phaseolus vulgaris* la familia de genes de la GS está compuesta de 5 genes, denominados *glnα*, *glnβ*, *glnγ* y *glnδ*, los 3 primeros codifican tres polipéptidos de la GS citosólica (Lara *et al.*, 1984; Benett *et al.*, 1989), el cuarto gen codifica la unidad δ de localización plastidial (Lightfoot *et al.*, 1988) y existe un quinto gen (*glnε*) que puede no ser expresado.

### *b) En nódulos*

También ha sido aislada y purificada en nódulos de distintas leguminosas (Lara *et al.*, 1984; Egli *et al.*, 1991). La GS constituye el 2% de la proteína soluble de los nódulos (McParland *et al.*, 1976) pudiendo alcanzar el 5% en el caso de *V. faba* (Caba *et al.*, 1990b). Se localiza dentro de la corteza interna de nódulos de *Alnus* (Hirel *et al.*, 1982) y en bacteroides (Planké *et al.*, 1977).

En nódulos de leguminosas Cullimore *et al.* (1983) describieron por vez primera la existencia de dos isoformas de GS, denominadas GS<sub>n1</sub> y GS<sub>n2</sub>. Lara *et al.* (1983) demostraron que el incremento de la actividad de la GS en el desarrollo de los nódulos se correlaciona con la producción de GS<sub>n1</sub>. La actividad de GS<sub>n2</sub> permanece constante durante el desarrollo del nódulo y es virtualmente idéntica a la forma de GS radical (Cullimore *et al.* , 1983). Al examinar la composición de las subunidades de las isoenzimas de GS de nódulos, Bennett y Cullimore (1989) concluyen que las subunidades aisladas pueden ensamblarse formando una variedad de isoenzimas homooctámeras y heterooctámeras  $\gamma$ ,  $\gamma/\beta$  y  $\beta$ , que constituyen tres de los cuatro polipéptidos detectados para la enzima nodular, considerando que la cuarta actividad coincide con la isoenzima plastidial compuesto sólo de subunidades  $\delta$ . Padilla *et al.* (1987) informaron que los nódulos pueden tener el polipéptido  $\alpha$ , sin embargo, en nódulos maduros la cantidad es muy baja y virtualmente indetectable si se compara con la cantidad de polipéptido  $\beta$  y  $\gamma$ . El rango de combinación de los polipéptidos puede generar diferentes isoenzimas, al variar la proporción de ellos (Cai y Wong, 1990; Green y Wong, 1992). La GS<sub>n1</sub> esta compuesta por el polipéptido  $\gamma$  y la isoforma GS<sub>n2</sub> por el polipéptido  $\beta$ , que también se expresa en raíces y hojas (Forde *et al.*, 1989).

Inicialmente el polipéptido  $\gamma$  de esta enzima se considera una nodulina (Egli *et al.*, 1989) independiente de la actividad nitrogenasa (Padilla *et al.*, 1987), aún cuando su inducción óptima requiere una activa fijación de nitrógeno. Al estudiar la expresión de los genes *gln $\alpha$*  y *gln $\beta$*  en plantas transgénicas de *Lotus corniculatus* se observó que *gln $\gamma$*  se expresa en la zona infectada del nódulo maduro donde tiene lugar la asimilación de amonio, mientras que *gln $\beta$*  se expresa en el interior del córtex (Forde *et al.*, 1989). Esta expresión diferencial de los genes de la GS sugiere que las distintas isoformas pueden condicionar diferentes funciones en el metabolismo del nitrógeno (Edwards *et al.*, 1990). Concretamente el amonio procedente de la fijación de nitrógeno regula la

expresión del gen *glnγ* (Miao *et al.*, 1990) en los tejidos infectados del nódulo; sin embargo, no difunde al córtex radical por lo que no controla la expresión del *glnβ* (Miao *et al.*, 1991). Los niveles de anhídrido carbónico también regulan la expresión del *glnγ* (Ortega *et al.*, 1992).

### 4.2.1.2. Glutamato sintasa (GOGAT)

En plantas superiores se han identificado tres formas distintas de GOGAT (Suzuki *et al.*, 1982), una dependiente de la ferredoxina (EC 1.4.7.1), otra dependiente del NADH (EC 1.4.1.14) y otra dependiente del NADPH (EC 1.4.1.13). Ha sido necesario separar las distintas actividades mediante cromatografía de intercambio iónico (Cullimore y Sims, 1981) y utilizar técnicas inmunológicas para considerarlas proteínas diferentes. Se dispone de una bibliografía reducida de esta enzima debido a su labilidad durante su manejo *in vitro* y porque existe poca cantidad, aproximadamente diez veces menos que la GS.

#### *a) Glutamato sintasa dependiente de la ferredoxina (Fd-GOGAT)*

La forma dependiente de la ferredoxina se localiza en el estroma de los cloroplastos en tejidos fotosintéticos (Wallsgrave *et al.*, 1979), en algas verdes (Cullimore y Sims, 1981) y en cianobacterias (Botella *et al.*, 1988). También se ha descrito en el parénquima xilemático y en células de la epidermis (Botella *et al.*, 1988), incluso se localiza en plastidios de raíz (Suzuki *et al.*, 1986). En nódulos de soja se ha descrito una GOGAT muy similar a la de hoja (Suzuki *et al.*, 1986), aunque la identificación de la fuente de poder reductor de esta enzima en tejidos no verdes es problemática (Lee, 1980). La existencia de la enzima Fd-GOGAT se confirmó definitivamente cuando se obtuvieron mutantes que carecían de la capacidad de reasimilar el amonio liberado en la fotorrespiración (Lea y Mifflin, 1974).

Esta enzima ha sido purificada en algas verdes (Galván *et al.*, 1984) y en algunas especies vegetales como arroz (Suzuki y Gadal, 1982), espinaca (Hirasawa y Tamura, 1984), tomate (Avila *et al.*, 1987) y maíz (Sakakibara *et al.*, 1991). Es una enzima monomérica con un peso molecular de rango entre 146-170 kD (Galván *et al.*, 1984; Hirasawa y Tamura, 1984; Márquez *et al.*, 1986). Representa el 1% de la proteína total de la hoja. La enzima es muy sensible a la azaserina, al aspartato, a cationes divalentes y a la fosfoerina (Avila *et al.*, 1987). La Fd-GOGAT es una flavoproteína con grupos Fe-S (Hirasawa y Tamura, 1984), contiene una molécula de FAD y otra de FMN como grupos prostéticos, 8 átomos de Fe no hémico y 8 átomos de S lábil por molécula del monómero. Por dicroísmo circular se le ha asignado la configuración (3Fe-4S) a los centros Fe-S de la GOGAT aislada de espinaca (Knaff *et al.*, 1991). La enzima presenta una  $K_m$  para la glutamina de 270  $\mu\text{M}$ , valor que se incrementa a 570  $\mu\text{M}$  cuando el nivel de glutamina en el medio alcanza concentraciones de 800  $\mu\text{M}$ . La  $K_m$  para el  $\alpha$ -cetoglutarato y para la ferredoxina es de 330  $\mu\text{M}$  y de 5.5  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Suzuki y Gadal, 1982).

La enzima forma un complejo electrostáticamente establecido con la ferredoxina que implica a los grupos cargados negativamente de la ferredoxina y parece producir dominios de unión similares a los presentes en los complejos que forma la ferredoxina con otras enzimas cloroplastídicas (Hirasawa *et al.*, 1991; Knaff *et al.*, 1991). Al estudiar las propiedades de oxido-reducción de la enzima se comprueba que las dos flavinas tienen el mismo potencial redox o difieren en algo menos de 30 mV (Hirasawa *et al.*, 1992) y que los centros (3Fe-4S) exhiben un potencial redox intermedio entre los centros de la ferredoxina tipo 4Fe-4S y tipo 2Fe-2S (Ackrell *et al.*, 1991).

La información sobre la genética de la Fd-GOGAT de cianobacterias es bastante escasa. La enzima fue detectada en *Nostoc* y *Anabaena* (Lea *et al.*,

1982) y su purificación y caracterización se ha llevado a cabo recientemente por Marques *et al.* (1992). Estos autores indican que la enzima de cianobacterias puede ser un ancestro de la GOGAT cloroplastidial de eucariotas debido a la gran similitud que existe en sus características, aún cuando existen algunas diferencias. El peso molecular de la proteína monomérica nativa está en el rango de 156-160 kD. Tiene una molécula de FMN y no la de FAD por proteína nativa. La  $K_m$  para glutamina, ferredoxina y  $\alpha$ -oxoglutarato es de 0.7 mM, 7  $\mu$ M y 1.7 mM, respectivamente. La azaserina y la 6-diazo-5-oxo-L-norleucina son potentes inhibidores.

Utilizando mutantes que carecen de esta enzima, Morris *et al.* (1988) han demostrado que esta actividad está íntimamente ligada a la asimilación del amonio liberado en la fotorrespiración (Kendall *et al.*, 1986). La actividad de esta enzima se incrementa con la luz (Suzuki *et al.*, 1982) o bien está mediada por el fitocromo (Hecht *et al.*, 1988).

### *b) Glutamato sintasa dependiente del NAD(P)H [NAD(P)H-GOGAT]*

La GOGAT dependiente de piridín nucleótidos se ha encontrado en raíces (Oaks y Hirel, 1985), en cultivo de tejidos (Lenee y Chapeau, 1989) y en cantidades muy pequeñas en hojas verdes de cebada y guisante (Wallsgrave *et al.*, 1982) aunque su actividad es muy escasa (Hecht *et al.*, 1987). También se ha detectado en cotiledones de leguminosas (Lea y Fowden, 1975) y en endospermo de maíz (Sodeck y da Silva, 1977). Se ha descrito su presencia en el parénquima xilemático (Botella *et al.*, 1988) y en plastidios de raíces (Suzuki *et al.*, 1986). Clásicamente, se creía que esta enzima podía utilizar como coenzima tanto el NADH como el NADPH (Beevers y Storey, 1976). Sin embargo, hay evidencias que indican que la específica del NADPH opera en bacterias (Yelton y Yoch, 1981) mientras que en plantas superiores opera la dependiente del NADH.

Los estudios sobre la NADH-GOGAT son escasos, puesto que es mucho menos activa que la Fd-GOGAT. La purificación y caracterización se ha podido llevar a cabo en determinados extractos vegetales realizados con mutantes que carezcan de Fd-GOGAT (Morris *et al.*, 1988), cultivo de tejidos (Hayakawa *et al.*, 1990), tejidos etiolados (Matoh *et al.*, 1980), endospermo (Muhitch, 1991) y cultivos de *Azospirillum brasilensis* (Vanoni *et al.*, 1992). Con la enzima purificada procedente de cultivos de arroz se han obtenido anticuerpos monoespecíficos frente a la NADH-GOGAT que no presentan reacción cruzada con la Fd-GOGAT procedente de hojas y células de arroz (Hayakawa *et al.*, 1992).

La enzima presenta un peso molecular de 200 a 240 kD. La  $K_m$  detectada para la glutamina, el  $\alpha$ -cetoglutarato y el NADH es de 811  $\mu$ M, 76  $\mu$ M y 3  $\mu$ M, respectivamente. Estos valores son parecidos a los obtenidos para la enzima detectada en nódulos radicales de leguminosas (Chen y Cullimore, 1988; Anderson *et al.*, 1989). La azaserina actúa como un potente inhibidor de esta enzima, mientras que la inhibición provocada por la fosfoserina es irrelevante (Avila *et al.*, 1987). Se trata de una flavoproteína con FMN y FAD como grupos prostéticos y centros Fe-S. Por dicroísmo circular se ha asignado la configuración (4Fe-4S) a los centros Fe-S de la enzima. La cinética enzimática sugiere que la enzima interacciona con sus sustratos en sitios catalíticos diferentes. Por analogía con otras enzimas dependientes de piridín nucleótidos, una de las flavinas es el sitio de unión del NADH como único aceptor de electrones. La transferencia de electrones ocurre vía centro (4Fe-4S) a la segunda flavina, donde tiene lugar la reducción del ácido-imino con la producción de L-glutamato (Vanoni *et al.*, 1991).

### *c) Glutamato sintasa en nódulos radicales*

En nódulos de *Phaseolus vulgaris* se han localizado dos isoformas denominadas NADH-GOGAT I y NADH-GOGAT II que se separan por intercambio iónico, considerándose esta última específica del nódulo (Chen y Cullimore, 1989). En nódulos de alfalfa (Anderson *et al.*, 1989) y de altramuz (Boland y Benny, 1977) sólo se ha detectado una isoforma. Ambas enzimas tienen una localización plastidial (Awonaike *et al.*, 1981; Boland *et al.*, 1982; Shelp *et al.*, 1983; Shelp y Atkins, 1984; Chen y Cullimore, 1989) pero mientras la NADH-GOGAT II se localiza casi exclusivamente en el tejido central del nódulo y representa la mayor parte de la actividad GOGAT, la NADH-GOGAT I se encuentra tanto en el córtex como en la región central y con igual actividad específica. Se ha sugerido que la NADH-GOGAT II estaría restringida a las células infectadas, participando en la asimilación del amonio producido en los bacteroides (Chen y Cullimore, 1988).

La GOGAT de nódulos se caracterizó y purificó por primera vez en altramuz (Boland, 1979). Posteriormente se llevó a cabo en nódulos de soja (Boland *et al.*, 1982) y de "cowpea" (Shelp *et al.*, 1983). Es una flavoproteína sulfoférrica, monomérica y con un peso molecular aproximado de 230 kD. Este dato fue confirmado por Anderson *et al.* (1989) en nódulos de alfalfa. Probablemente se trata de una de las subunidades enzimáticas de mayor peso molecular que se conoce. La  $K_m$  para la glutamina, el  $\alpha$ -cetoglutarato y el NADH es 466  $\mu$ M, 33  $\mu$ M y 43  $\mu$ M, respectivamente. No es inhibida por la N-etilmaleimida, lo que indica que ni el hierro, ni el grupo sulfhidrilo, ni los restos de histidina participan en el centro catalítico de la enzima (Anderson *et al.*, 1989). Al estudiar las características cinéticas de ambas isoformas de NADH-GOGAT nodular se encuentran diferencias en la  $K_m$  para la glutamina, el  $\alpha$ -cetoglutarato y el NADH y también diferencias en el pH óptimo. Mientras que la NADH-GOGAT I exhibe un amplio rango de pH centrado en torno a 8,

la NADH-GOGAT II exige un rango de pH muy estrecho cercano al 8.5. Ambas actividades son inhibidas por la azaserina, presentan la misma temperatura óptima de funcionamiento y dependen específicamente del NADH como donador de electrones.

La actividad de la NADH-GOGAT en nódulos se estimula enormemente con el desarrollo del nódulo (Boland, 1978; Groat y Vance, 1981) y decae con la inhibición de la fijación de nitrógeno (Groat y Vance, 1981). Además, la NADH-GOGAT nodular es muy poco activa en nódulos inefectivos (Vance y Johnson, 1983). Durante la nodulación, la actividad de ambas isoenzimas incrementa, pero más intensamente la de la NADH-GOGAT II (Chen y Cullimore, 1988).

Los anticuerpos frente a la NADH-GOGAT de nódulos de alfalfa reconocen a la NADH-GOGAT de nódulos de otras especies de leguminosas, aunque no presentan reacción cruzada con la NADH-GOGAT de raíces y hojas de alfalfa. La isoforma de NADH-GOGAT II específica de los nódulos parece estar inducida en la raíz como respuesta a la infección con *Rhizobium* (Anderson *et al.*, 1989) y no se expresa en otros órganos, mientras que la isoforma NADH-GOGAT I si se detecta en otros órganos de *Phaseolus vulgaris* (Chen *et al.*, 1990).

### 4.2.2. Glutamato deshidrogenasa (GDH)

En plantas superiores, la principal evidencia a favor del papel de la glutamato deshidrogenasa (EC 1.4.1.2) en la asimilación del amonio era su capacidad de catalizar la síntesis del glutamato *in vitro* mediante la unión del NADH al  $\alpha$ -cetoglutarato y amonio, liberando glutamato y NAD (Oaks y Hirel, 1985; Yamaya *et al.*, 1986). Sin embargo, se asume que es una enzima catabólica (Robinson *et al.*, 1991) y no interviene en la asimilación de amonio debido a su baja afinidad por el sustrato (Wallsgrrove *et al.*, 1983) ya que

presenta una  $K_m$  para el amonio de 10-80 mM (Mifflin y Lea, 1980). No obstante, Pahlich y Gerliz (1980) encuentran que la  $K_m$  es bifásica y que depende de la concentración de amonio. Además, la enzima está unida a membranas (Yamaya *et al.*, 1984), sugiriéndose que la  $K_m$  estudiada *in vivo* puede ser distinta a la detectada *in vitro*.

Su localización es prioritariamente mitocondrial (Stewart *et al.*, 1980). Una pequeña fracción de la actividad total se ha detectado en cloroplastos y difiere de la mitocondrial en que utiliza NADPH y en su afinidad por el amonio (Srivastava y Singh, 1987). También se ha detectado y purificado en diversos órganos y tejidos vegetales incluyendo semillas, raíces, hojas, epicotilos, cotiledones (Itagaki *et al.* 1988) y en nódulos de leguminosas (Srivastava y Singh, 1987).

La GDH generalmente utiliza como coenzima el NADH, aunque también funciona con el NADPH (Martínez-Bilbao *et al.*, 1987). Es una metaloproteína hexamérica de 298 kD, que posee grupos SH en el centro activo y formada por seis subunidades idénticas de 47 kD. La  $K_m$  obtenida para el amonio, el  $\alpha$ -cetoglutarato, el glutamato, NADPH y NADP fue 5, 1, 26, 0.01 y 0.03 mM respectivamente (Brun *et al.*, 1992). Se han descrito siete isoenzimas que pueden aumentar con el amonio en la planta (Nagel y Hartman, 1980). De las siete isoenzimas, la primera y la séptima son homohexámeros y las restantes son híbridas. Cada isoenzima tiene una función catabólica o anabólica variable (Cammaerts y Jacobs, 1985). Se comporta como una enzima alostérica en la que sus propiedades se modifican según la disponibilidad del ión calcio, que actúa como efector (Yamaya *et al.*, 1984). La reacción de aminación se activa con 100 mM de calcio mientras que la reacción de desaminación no se afecta con el calcio. El pH óptimo para la aminación es de 8.0 y para la desaminación 9.3 (Loulakakis y Roubelakis-Angelakis, 1990).

La función de la GDH se centra en la reasimilación del amonio y en la síntesis de glutamato en la mitocondria. Puede tener un papel complementario al ciclo de la glutamato sintasa (Srivastava y Singh, 1987; Rhodes *et al.*, 1989). Aún cuando la constante de Michaelis-Menten es muy elevada (Stewart *et al.*, 1980), la gran cantidad de enzima presente en los tejidos vegetales puede ser adecuada para asimilar amonio, incluso cuando la concentración intracelular del sustrato sea baja. Sin embargo, cuando se utilizan inhibidores del ciclo GS/GOGAT, como la metionina sulfoximina y asumiendo que estos inhibidores no afectan a la GDH, se observa que se acumula el amonio y no se incorpora a los aminoácidos (Rhodes *et al.*, 1989).

Otra alternativa funcional se relaciona con la oxidación del glutamato para proporcionar esqueletos carbonados al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Thomas, 1978). Mediante la técnica de RMN ha sido posible demostrar que en la incorporación primaria del amonio no está implicada la GDH, pero esta enzima se activa en la oxidación del glutamato en respuesta a una deficiencia de carbono. El papel catabólico de la enzima implica un mecanismo de regulación para el metabolismo del carbono y del nitrógeno (Robinson *et al.*, 1991).

El aumento de la actividad GDH en la senescencia de la planta es una característica observada por diversos autores (Cammaerts y Jacobs, 1984). En este estado se produce una falta de nitratos y se acumulan aminoácidos y azúcares solubles (Chaillou *et al.*, 1986), lo que entraña una activación de la glucólisis (Marques *et al.*, 1983) y por tanto un aumento de la formación de NADH. Todo esto estimula el funcionamiento de la GDH, favoreciendo la eliminación del amonio y proporcionando una función detoxificante de la enzima. La actividad aminativa de esta enzima incrementa con la edad de la planta (Tirado *et al.*, 1990a) sobre todo cuando la actividad GS del cloroplasto decae (Tirado *et al.*, 1990b). Loyola-Vargas *et al.* (1988) también la detectaron

en las primeras etapas de crecimiento antes de que la planta adquiriera una capacidad fotosintética plena.

Ante condiciones adversas y de estrés, el comportamiento de esta enzima es singular. Muñoz-Blanco y Cárdenas (1989), trabajando en diferentes condiciones tróficas de estrés, han demostrado que la actividad de la GDH es adaptativa, estando implicada en el mantenimiento de los niveles de glutamato intracelular, que no pueden ser mantenidos por el ciclo GS/GOGAT. La actividad de la GDH en condiciones de estrés ha sido descrita por Srivastava y Singh (1987), Miranda-Ham y Loyola-Vargas (1988) y por Smirnoff y Stewart (1987) entre otros autores.

### 5. LIMITACIONES DEL USO DE LAS LEGUMINOSAS: SALINIDAD

Numerosas especies de leguminosas se utilizan en agricultura y silvicultura, para consumo humano, como piensos y forrajes y en el mantenimiento de suelos y recuperación de terrenos. Además, estos cultivos suministran nitrógeno al suelo merced a su capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico (Peoples y Creswell, 1992). El efecto beneficioso de las leguminosas grano y forrajeras puede ser sustancial en la fertilidad del suelo (Robson, 1989). Sin embargo, los cultivos de leguminosas pueden verse limitados por una serie de factores ambientales adversos que merecen ser revisados.

Se ha estimado que más de  $40 \cdot 10^6$  Ha de suelo de las  $220 \cdot 10^6$  cultivables están afectadas por la salinidad. Si a este dato se añade que el desierto ocupa una extensión aproximada de  $1600 \cdot 10^6$  Ha de suelo, se puede suponer que un 40% del suelo son áreas con potenciales problemas salinos. La mayor parte de esas áreas están confinadas en la región mediterránea (World Resources, 1987). A pesar de que los suelos salinos están ampliamente distribuidos, el efecto de la salinidad en leguminosas y en la fijación de nitrógeno ha sido poco estudiado.

El efecto de los suelos salinos en el crecimiento de las plantas ha constituido un foco de investigación importante en este siglo, puesto que el estrés salino es el mayor estrés limitante en la productividad de los cultivos. La tolerancia de las plantas a la sal es un complejo fenómeno que implica cambios en la morfología y en los procesos bioquímicos y fisiológicos de las mismas (Greenway y Munns, 1980; Hanson y Hitz, 1982).

### 5.1 Efectos de la salinidad en la planta

Los dos efectos identificados como la causa probable de la toxicidad de la salinidad en las plantas son el efecto iónico y el efecto osmótico. El efecto iónico (Levitt, 1980) produce una alteración en la absorción de nitrógeno del suelo, el transporte del nitrógeno asimilado y la proteínosíntesis (Pessarakli y Tucker, 1985). Además, afecta al transporte de iones minerales en la planta y disminuye la velocidad de fotosíntesis neta en las mismas. El efecto osmótico está asociado con la carencia de extensión de la pared celular y con el retraso del crecimiento de las plantas (Lewis *et al.*, 1989).

Por otra parte, se ha demostrado que el peso seco de las plantas disminuye y que la relación raíz/parte aérea incrementa con el aumento de la concentración de NaCl en el medio de crecimiento (Seemann y Critchley, 1985). Sin embargo, según el tipo de planta y de especie, el comportamiento ante las condiciones de estrés salino es bastante diferente (Pessarakli *et al.*, 1989a). Hay que tener en cuenta que la respuesta de las plantas a la salinidad depende del grado de estrés, del estado de crecimiento, del tipo y gama de elementos nutritivos en la rizosfera y de la cantidad de nutrientes disponibles. La salinidad afecta más adversamente al estado vegetativo que al reproductivo y de madurez (Abdul-Kadir y Paulsen, 1982).

La salinidad produce síntomas visuales en las plantas, en condiciones semejantes a la deficiencia de fósforo (Hewitt, 1966) como son la prolongación de la dormancia de las yemas laterales y la reducción de la floración. También se ha descrito que contribuye a mejorar la calidad de algunos frutos (Ho *et al.*, 1987) al incrementar la concentración de hexosas y almidón durante el desarrollo del mismo (Mitchell *et al.*, 1991 a, b). Otros datos, obtenidos con plantas de *Lupinus* crecidas con 50 mM de NaCl, apuntan a la alteración de la concentración de fósforo intracelular (Treeby y van Steveninck, 1988 a, b) o a

una disminución de ATP como describen Peterson *et al.* (1987), Nieman *et al.* (1988) y Wilson *et al.* (1992) en plantas de *Phaseolus vulgaris*. En general se asume que la salinidad afecta a la sensibilidad al fósforo en los cultivos; Grattan y Maas (1988) lo detectan en cultivos de *Glycine max*. Otro macronutriente que interfiere con la salinidad o con elevadas concentraciones de sodio en el suelo es el potasio, aún cuando ambos cationes entran de forma independiente en la planta (Lazof y Cheeseman, 1988). Se requieren elevados niveles citoplasmáticos de potasio para sobrevivir en hábitats salinos (Chow *et al.*, 1990).

Uno de los efectos más estudiados de la sal es la disminución de la capacidad fotosintética en plantas (Sing *et al.*, 1990). Esta disminución es parcialmente debida a la reducción de la conductancia estomática (Brugnoli y Lauter, 1991; Melesse y Caesar, 1992) y a la consecuente restricción de la disponibilidad de dióxido de carbono para la carboxilación. La disminución de la fotosíntesis puede relacionarse con una reducción de la eficacia de la ribulosa bifosfato carboxilasa (Seemann y Sharkey, 1986) y con la sensibilización del fotosistema II por el NaCl (Ball y Anderson, 1986), incluso se ha observado un descenso de la concentración de clorofila a y b (Tewari y Singh, 1991). La salinización también altera el valor de  $\delta^{13}\text{C}$ , cambio que está cuantitativamente de acuerdo con el que predice la teoría que relaciona la discriminación isotópica con la contribución intracelular de dióxido de carbono (Farquhar *et al.*, 1982; 1989).

También se ha observado que la salinidad en el suelo modifica diversas actividades enzimáticas. Concretamente, afecta negativamente a la formación de semillas (Dubey y Rani, 1987; 1989), puesto que el nivel de diversos metabolitos se modifica debido a la alteración inducida por la sal en la actividad de distintas enzimas (Dubey, 1985). En semillas con diferente sensibilidad a la sal se muestran distintos comportamientos de amilasas, nucleasas, proteasas, fosfatasas

(Dubey y Sharma, 1990), peptidasas (Mikkonen, 1986) y peroxidasas (Mittal y Dubey, 1991). El estrés salino también causa una intensa actividad proteolítica en plantas, siendo mayor en raíces que en parte aérea. De hecho, Dubey y Rani (1990) contrastaron que la tolerancia a la sal se asocia con una elevada actividad de proteasas, aminopeptidasas y una baja actividad carboxipeptidasa. Además, en plantas resistentes o halófilas se inducen una serie de proteínas de elevado peso molecular como mecanismo de adaptación a condiciones hipersalinas. Estas proteínas no se inducen en leguminosas sensibles como *Phaseolus vulgaris* (Billard *et al.*, 1982). De igual manera se expresan Mittal y Dubey (1991) cuando indican que ante el estrés salino los cultivos tolerantes responden disminuyendo la actividad peroxidasa en el endospermo, raíz y parte aérea, mientras que los cultivos sensibles a la sal se asocian con un incremento de la actividad de estas enzimas en los mismos órganos así como de las isoenzimas.

Otro efecto de la salinidad en las plantas consiste en modificar el transporte de fotoasimilados por el floema y el flujo de iones por el xilema. Se ha descrito que la reducción de nitratos en la raíz se inhibe por la sal, lo que aumenta el transporte de nitrato en el xilema. Pate (1973) observó que la reducción de nitrato en la raíz constituye sólo un 65% en presencia de NaCl frente al 94% del control. El contenido de otros cationes como el  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  y aniones como el  $Cl^-$  se vio modificado por el estrés salino (Jeschke *et al.* 1992). El fósforo puede tener un papel en el ajuste osmótico debido al incremento de la absorción y distribución de este elemento observado en plantas sometidas a estrés salino (Treeby y van Steveninck, 1988 a, b).

Se ha asumido que la técnica de cultivo de tejidos puede ser utilizada para descifrar los mecanismos de tolerancia a la sal por las plantas (Rains, 1986) y para desarrollar plantones o embriones tolerantes a la sal (Galiba y Yamada, 1988). Los mecanismos de tolerancia son diversos, algunos de ellos relacionados con la exclusión de iones sodio y tolerancia a los cloruros (Unnikrishnan *et al.*,

1991). Sin embargo, la exclusión o acumulación de iones esta muy condicionada por los genotipos y los cultivares (Galiba *et al.*, 1989). Tiverdi *et al.* (1991) sugieren que el cultivo de células puede responder a las condiciones de estrés salino dependiendo del genotipo. Recientemente, Dracup (1991) ha realizado una revisión sobre el tema concluyendo que la tolerancia a la sal de cultivos de células tiende a no ser expresada en la planta regenerada.

### 5.2. Efectos producidos en los nódulos por la salinidad

Bernstein y Hayward (1958) y Niemann (1962) han descrito el grado de tolerancia a la sal de numerosos cultivos encontrándose las leguminosas entre los más sensibles. Una clasificación de las leguminosas según su resistencia a la sal la recopiló Laüchli en 1984 abordando cinco niveles de respuesta a la sal. Las judías muestran una ligera tolerancia cuando los niveles de sal son intermedios (Garrido, 1992), pero con 100 mM de NaCl se reduce un 85% su crecimiento (Wignarajah, 1990); en cambio *Lupinus* sp se considera una planta de respuesta halofílica al estrés salino medio (van Steveninck *et al.*, 1982).

La sal puede influir en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa afectando el crecimiento y supervivencia del *Rhizobium* en el suelo, restringiendo de esta manera la colonización radical (Zahran y Sprent, 1986), así como el proceso de infección (Singleton y Bohlool, 1984), el desarrollo del nódulo (Craig *et al.*, 1991), el número y peso de nódulos por planta (Hafeez *et al.*, 1988), el funcionamiento del nódulo (Hopmans *et al.* 1984) y por último, reduciendo la actividad nitrogenasa (Wilson, 1985).

Esta inhibición de la formación del nódulo y la fijación de nitrógeno por la sal ha sido descrita en *Glycine max* (Singleton y Bohlool, 1984), en *Glycine wightii* (Wilson, 1970), en *Trifolium alexandrinum* (Bajpai y Gupta, 1979), en *Medicago sativa* (Subba Rao *et al.*, 1972; Bekki *et al.*, 1987; Garrido *et al.*,

1992), en *Trifolium subteraneum* (Hopmans *et al.*, 1984), en *Vicia faba* (Yousef y Sprent, 1983; Zahran y Sprent, 1986), en *Vigna radiata* (Hafeez *et al.*, 1988), en *Cicer arietinum* L. (Elsheikh y Wood, 1990), en *Pisum sativum* (Delgado *et al.*, 1992) y en no-leguminosas como *Casuarina equisetifolia* (Ng, 1987).

Numerosas investigaciones han informado que la tolerancia a la salinidad del *Rhizobium* es mayor que la de la leguminosa (Wilson, 1970; Bhardwaj, 1975; Kassem *et al.*, 1985). Las bacterias pueden adaptarse al incremento de niveles de NaCl aumentando sus niveles intracelulares de potasio o glutamato (Yelton *et al.*, 1983), de aminoácidos acíclicos (Brown, 1976) o prolina (Csonka, 1989). En un estudio llevado a cabo con *Vigna radiata* se comprueba que aunque la sal reduce un 75% el peso del nódulo, la reducción de la actividad nitrogenasa no es tan drástica, lo que indica que aún cuando la salinidad afecta a la formación del nódulo, cuando éste está formado, la sal influye débilmente en su funcionamiento, puesto que en esa etapa de crecimiento la planta puede disponer de fotoasimilados que contribuyan a su funcionamiento (Hafeez *et al.*, 1988), por lo que se ha sugerido que el efecto del NaCl en la nodulación puede ser un efecto indirecto a través de la planta huésped.

Sin embargo, hay evidencias que indican que la salinidad afecta más a la nodulación que a la planta huésped, entre las que se pueden citar: *a)* El efecto de la salinidad en el contenido en nitrógeno de la planta fue más pronunciado en plantas fijadoras de nitrógeno que en plantas fertilizadas con nitratos (Pate y Dart, 1961; Alston y Graham, 1982; Yousef y Sprent, 1983). *b)* El crecimiento de las plantas a expensas de la fijación simbiótica de nitrógeno se afectó más intensamente por la sal que cuando crecían con nitrógeno combinado (Lauter *et al.*, 1981). *c)* En experimentos con raíces divididas de soja el efecto de la salinidad se observó en la nodulación y no en la parte aérea (Singleton y Bohlool, 1984). Cuando se inoculan cultivos de *Cicer arietinum* con cepas de *Rhizobium* resistentes a la sal que producen una simbiosis efectiva bajo

condiciones salinas, Elsheikh y Wood (1990) concluyen que la fijación de nitrógeno fue más sensible a la sal que el crecimiento de la planta.

La identificación de solutos intracelulares y su modificación en condiciones de estrés salino puede usarse en potencia en la selección de cultivares adaptados a la sal. La información a nivel celular de los metabolitos del nódulo y especialmente en bacteroides (Bekki *et al.*, 1987) es esencial para entender el mecanismo implicado en la inhibición de la fijación de nitrógeno por la sal. El estrés salino también disminuye la concentración de ácidos orgánicos, alrededor del 40%, tanto en nódulos como en raíces de alfalfa (Fougère *et al.*, 1991). Sin embargo, aumenta la concentración de ácido láctico, sobre todo en bacteroides donde llegó a ser el ácido mayoritario, contribuyendo parcialmente a restaurar el ajuste osmótico.

La producción de acetileno por bacteroides aislados de nódulos de *Medicago sativa* inoculada con cepas de *Rhizobium meliloti* tolerantes y no tolerantes a la sal, fue inhibida con distinta intensidad en presencia de NaCl en el medio de incubación (Bekki *et al.*, 1987). Estos autores sugirieron que la inhibición de la actividad reductora de acetileno por la sal podría estar directamente relacionada con la inhibición de la capacidad respiratoria de los bacteroides causada también por el estrés salino. Sin embargo, no es éste el principal proceso implicado en la inhibición de la capacidad fijadora de nitrógeno causada por el estrés salino a tenor de los datos obtenidos en diferentes especies de leguminosas (Garrido, 1992).

El pool de aminoácidos y de carbohidratos aumenta con el estrés salino en nódulos de *Medicago sativa* (Fougère *et al.*, 1991). Respuestas similares se han detectado en nódulos de *Vicia faba* (Venekamp y Koot, 1988) y de *Glycine max* (Ford, 1984). Entre los aminoácidos, la prolina y la asparragina exhiben un incremento espectacular (Hanson y Hitz, 1982), demostrando así su implicación

en la osmorregulación. Entre los carbohidratos, el estrés salino modifica considerablemente la relación pinitol/sacarosa y el ciclitol, que pueden contribuir a la tolerancia en este tipo de estrés (Fougère *et al.*, 1991).

### 5.3. Metabolismo nitrogenado bajo condiciones de estrés salino

La fijación de nitrógeno se modifica cuando a un suelo salino se le adiciona nitrógeno combinado (Pate y Dart, 1961). De hecho, la efectividad de la nodulación y la eficacia de la nitrogenasa están negativamente correlacionadas con la concentración de nitrógeno inorgánico en el suelo (Alston y Graham, 1982).

La salinidad puede alterar la absorción de algunos nutrientes del suelo como el nitrato (Aslam *et al.*, 1984), el potasio y calcio (Cramer *et al.*, 1987) y el amonio (Leidi *et al.*, 1992) produciendo un desequilibrio nutricional en la planta, que se traduce en un anormal crecimiento de ésta y una alteración del metabolismo no proteico. Los efectos de la salinidad ante la presencia de amonio y nitrato en el suelo son más pronunciados con este último (Pessaraki *et al.*, 1989b), aún cuando Leidi *et al.* (1992) señalan que el nitrato es mejor fuente de nitrógeno que el amonio en plantas que crecen en condiciones de estrés salino.

Generalmente, se describe que el estrés salino promueve la acumulación de nitrato, amonio y aminoácidos libres en plantas (Saad, 1979). El bajo potencial osmótico en la solución nutritiva inducido por el NaCl inhibe el metabolismo del nitrato y provoca la acumulación de compuestos nitrogenados solubles (Pessaraki y Tucker, 1985). También se describe la reducción de la proteínosíntesis; sin embargo, no se ha establecido si esta reducción es resultado de la degradación proteica (Mothes, 1956) o debida a una alteración en la incorporación de los aminoácidos a las proteínas (Stewart y Lee, 1979). Helal *et al.* (1975) observaron que el NaCl mejora la absorción de nitrógeno lábil y su

incorporación a la fracción proteica (Langdale *et al.*, 1973). La presencia de cloruros puede inhibir la absorción del nitrato (Smith y Thompson, 1971), no afectarla intensamente (Rao y Rains, 1976) o depender de la variación genotípica de la especie vegetal (Bloom y Finazzo, 1986). Los informes sobre el efecto de la salinidad en la asimilación de nitrógeno son controvertidos; es evidente que las medidas de los procesos de absorción y de asimilación del nitrógeno deben hacerse simultáneamente (Aslam *et al.*, 1984).

Kozlawski (1972) revisó en un estudio las enzimas que se alteraban en las plantas ante un estrés, enfatizando en la actividad NR. Bottacin *et al.* (1985) y Martínez y Cerdá (1989) encontraron que la actividad de esta enzima se inhibía con el NaCl. Daines y Gould (1985) y Misra y Dwivedi (1990) detectaron que en estas condiciones la enzima se estimula, mientras que Aslam *et al.* (1984) describen que no varió la actividad. Los resultados son bastante controvertidos (Abdul-Kadir y Paulsen, 1982; Bloom-Zandstra y Lampe, 1983). Para Austenfeld (1974) el efecto de la sal en esta actividad enzimática depende de la dosis y para Pessarakli *et al.* (1989a) depende del órgano estudiado. Así en *Phaseolus vulgaris* la parte aérea es más seriamente afectada que la raíz por la salinidad, mientras que en *Lupinus albus*, leguminosa tolerante a la sal, la reducción de nitrato en raíz fue totalmente inhibida (Jeschke *et al.*, 1992). Aslam *et al.* (1984) observaron que la inhibición de la actividad NR determinada *in vitro* fue mayor cuando la sal fue adicionada al medio de ensayo que cuando esta actividad enzimática fue determinada mediante el método *in vivo*. Esto indica que *in situ* la actividad NR está protegida del estrés salino. La susceptibilidad de dañarse el transportador del nitrato, más que su sistema reductor, puede ser el factor crítico para la supervivencia de la planta durante el período de estrés. Schrader (1978) también informó de una inhibición similar de la actividad NR cuando *in vitro* se adicionó amonio y cloruro sódico al medio de ensayo. Profundizando en el tema, Martínez y Cerdá (1989) concluyeron que la actividad NR se afectó directamente por la presencia de NaCl en el medio radical,

interfiriendo en la absorción de nitrato e inhibiendo su transporte de la vacuola al citosol.

La actividad NiR también se inhibe con la sal, aunque es menos sensible que la NR. Sin embargo, se ha comprobado que la NiR es más sensible al ensayo *in vitro* que *in vivo* (Rao *et al.*, 1988). Al incubar la enzima con NaCl y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se detecta que la salinidad aniónica es más tóxica que la catiónica para la supervivencia de la planta durante el período de estrés (Rao y Gnanam, 1990).

El efecto que el estrés salino produce en las enzimas de la asimilación de amonio ha sido estudiado por Miranda-Ham y Loyola-Vargas (1987; 1988), determinando que en estas condiciones se altera el metabolismo, aunque el comportamiento es diferente según el órgano vegetal que se estudie. Estas enzimas se afectan además por la interacción descrita entre la sal en el medio y la fuente de nitrógeno para la planta (Bourgeois-Chaillou *et al.*, 1992). Así, la tolerancia a la sal está relacionada con una constante en las relaciones NR/NiR, GS/GOGAT, vía predominante de la asimilación de amonio en condiciones de estrés salino según Misra y Dwivedi (1990) y GS/GDH y con un elevado contenido en malato, mientras que la sensibilidad a la sal está ligada a la utilización del nitrógeno. En el caso de plantas que crecen con amonio, la salinidad aumenta la relación GS/GOGAT y las actividades GDH y PEPC y además se produce el síndrome del amonio, caracterizado por una disminución del contenido en solutos orgánicos y minerales en la vacuola (Chaillou *et al.*, 1991). Sin embargo, con nitrato en el medio de crecimiento, la salinidad incrementa las relaciones NR/NiR en la hoja y NR/GS en raíz mientras que disminuye la relación GS/GOGAT, las actividades GDH y PEPC, la relación NR/GS en hoja y el nivel de ácidos orgánicos. En este caso no parece que la disminución del crecimiento por la sal esté ligado a la incapacidad de llevarse a cabo el ajuste osmótico.

### 5.4. Respuesta fisiológica ante el estrés

La selectiva acumulación intracelular de aminoácidos como, asparragina, glicina betaína, leucina, prolina, metionina y valina, es una respuesta fisiológica de muchos organismos al estrés osmótico (Yancey *et al.*, 1982). En plantas superiores, tal incremento se da como respuesta a la salinidad y a otros tipos de estrés como sequía y bajas temperaturas (Aspinall y Paleg, 1981; Irigoyen *et al.*, 1992).

La acumulación de prolina en respuesta al estrés salino se ha observado en halófilas (Ostrem *et al.*, 1987) y no halófilas (Aspinall y Paleg, 1981). En general, la cantidad de prolina se correlaciona con el grado de salinidad (Stewart, 1981), ya que el contenido de prolina aumenta a las pocas horas del estrés (Tewari y Singh, 1991) y puede aumentar 10 veces si se aplica exógenamente (Treichel, 1975). Cuando cesa el estrés, la prolina desciende rápidamente (Stewart, 1972).

En términos de relaciones hídricas, la acumulación de prolina en los tejidos se relaciona con un descenso en el potencial hídrico, que se produce tanto en estrés por sequía como en estrés salino. Sin embargo, bajo estrés salino el descenso del potencial hídrico se debe, íntegramente, a una disminución del potencial osmótico, mientras que en estrés por sequía se debe a una caída del potencial de turgor y del potencial osmótico puesto que disminuye el volumen de la célula.

Varias funciones fisiológicas han sido asignadas a la síntesis de prolina inducida por el estrés, puede actuar en el ajuste osmótico (Hosegawe *et al.*,

1986), como sumidero de energía y de nitrógeno (Aspinall y Paleg, 1981). Además, se la ha relacionado con los procesos de senescencia (Wang *et al.*, 1982) y también puede servir de índice de resistencia al estrés. Aunque, la relación entre ambos conceptos es bastante discutida (Levy, 1983); no obstante, en algunos trabajos con cereales se utiliza este índice por no tener disponible ningún otro (Singh *et al.*, 1973).

Entre los precursores de la biosíntesis de prolina se pueden citar los ácidos orgánicos originados como consecuencia del estrés (Göring y Plescher, 1986; Zoglauer *et al.*, 1987). En *V. faba*, Venekamp y Koot (1988) confirman estos resultados pero además concluyen que la prolina puede ser sintetizada a partir del nitrato y metabolitos carbonados procedentes de sistemas respiratorios. Sin embargo, no hay duda de que el glutamato es el principal precursor (Singh *et al.*, 1973), pudiendo proceder de la asimilación del amonio vía GS/GOGAT (Klaus *et al.*, 1985). Yamaya *et al.* (1986) cuestionan que en condiciones de estrés, ésta sea la vía de síntesis de glutamato como precursor de la prolina y proponen a la GDH como enzima que relaciona los procesos de respiración oxidativa y de biosíntesis de prolina. En este sentido, Davies (1986) describe un estímulo de las actividades deshidrogenasas como respuesta a la alteración de pH producida por el incremento en ácidos orgánicos bajo condiciones de estrés.

El metabolismo biosintético de la prolina parece ser idéntico en todos los organismos. La mayor parte de las enzimas catabólicas y biosintéticas han sido estudiadas en microorganismos. La biosíntesis de la prolina se inicia con dos reducciones y una ciclación a partir del ácido glutámico. Las enzimas que intervienen en primer lugar forman un complejo enzimático denominado pirrolín 5-carboxilasa sintasa (P5C-sintasa) en donde colaboran dos enzimas, la  $\gamma$ glutamil-quinasa y la  $\gamma$ glutamil-fosfato-reductasa; este complejo produce un intermediario inestable que rápidamente se transforma en semialdehidoglutámico (GSA) que se cicla de forma espontánea (Vogel y Bonner, 1954; Leisinger,

1987; Kohl *et al.*, 1988) para formar el metabolito clave de la ruta, el ácido 5-pirrolidin carboxílico (P5C).

La reducción de P5C a prolina se realiza mediante la P5C-reductasa (P5CR) dependiente del NAD(P)H, enzima localizada en el citoplasma de nódulos, raíces y hojas, donde el 15% de la actividad se localiza en los plastidios, lo que sugiere que la prolina puede ser sintetizada en distintos compartimentos celulares (Szoke *et al.*, 1992). La actividad de esta enzima es bastante elevada en nódulos de soja (Kohl *et al.*, 1988). Su  $K_m$  para el NADPH es 25 veces inferior a la que se detectado para el NADH. La actividad se inhibe en presencia de  $\text{NADP}^+$  y no se inhibe con la prolina; esta inhibición cesa por el estrés.

Al producirse la biosíntesis de prolina se obtiene un incremento en la disponibilidad de  $\text{NADP}^+$  como consecuencia de la reducción del P5C, lo que podría estimular la vía oxidativa de las pentosas fosfato (Krebs y Eggleston, 1974). Evidentemente, conllevaría un incremento en la producción de ribulosa 5 fosfato, que conectaría con intermediarios de la biosíntesis de ribonucleótidos purínicos. Yeh y Phang (1988) demostraron que el P5C incrementa la síntesis de ribulosa 5-fosfato y subsecuentemente del fosforribosilpirofosfato (PRPP). Asimismo, otras vías metabólicas se conectan por el complejo P5C-sintasa (Matsuzawa e Ishiguro, 1980; Brandiss y Falvey, 1992).

Kohl *et al.* (1988) consideran que la prolina tiene un papel interesante en la fijación de nitrógeno, al considerarla como esqueleto carbonado reducido que podría ser oxidado y contribuir como fuente de energía en el bacteroide. Sin embargo, esto fue cuestionado por Day *et al.* (1990) cuando detectaron que la prolina no es absorbida rápidamente por el bacteroide. Se sugirió que la membrana peribacteroidea carece de transportador de prolina y que la entrada de la prolina tendría que ser por difusión pasiva. Zhu *et al.* (1992), en experimentos con nódulos de soja *in vivo*, encuentran que el flujo de la prolina a través de la

membrana peribacteroidea es más lento que el del malato y el del succinato, pero lo suficientemente rápido para influir en eventos metabólicos de interés. Es interesante señalar que la prolina exógena estimula la actividad reductora de acetileno en nódulos intactos de soja de forma similar al succinato y glutamato (Zhu *et al.*, 1992). Otra línea que evidencia la conexión de la prolina con la fijación de nitrógeno está relacionada con el estudio del operón *ntr* (nitrógeno regulador) que regula la expresión de tres genes, el *gln A* (gen estructural de la GS), el *nif* (fijación de nitrógeno) y el *put* (utilización de prolina) (Magasanik, 1982).

La prolina sintetizada en el citosol vegetal es catabolizada en el bacteroide por la prolina deshidrogenasa (ProDH). La actividad de esta enzima se detecta prioritariamente en los bacteroides de nódulos, pero sólo un 2% en plastidios y mitocondrias (Stewart, 1981). Esta enzima es la que debe suministrar parte de la energía necesaria para la fijación de nitrógeno y aumenta entre 2 y 4 veces cuando los bacteroides se someten a un estrés (Kohl *et al.*, 1991). La compartimentación de la ProDH en los nódulos proporciona la posibilidad de que la P5CR y la ProDH jueguen un papel en la transferencia del potencial redox entre el citosol y el bacteroide.

### 6. PERSPECTIVAS

La propuesta que sugieren Epstein y Norlyn (1977) para superar la salinidad se basa en la "selección y manipulación" para la tolerancia a la sal, una propuesta eficiente y económica. Hay diferentes estrategias que han adoptado varios investigadores para superar la salinidad (Ashraf y McNeilly, 1987). Una de ellas consiste en llevar a cabo un screening del germoplasma autóctono del cultivo con objeto de identificar el cultivar más tolerante, como el realizado por Ashraf y Waheed (1990) con 133 genotipos de *Lens culinaris* M. procedentes de un germoplasma local. Pacovsky y Fuller (1991) proponen que, en un programa de mejora de la fijación de nitrógeno para *Phaseolus*, se debe identificar el germoplasma que expresa elevados niveles de GS o NADH-GOGAT específica de nódulos y este material debería usarse con cepas efectivas de *Rhizobium leguminosarum* que previamente hayan sido seleccionadas para dar lugar a una asociación simbiótica óptima.

Se han descrito otros métodos directos de selección y manipulación para mejoramiento de cultivos tolerantes a la sal sin considerar los mecanismos que inducen esta tolerancia (Epstein, 1985; Shannon, 1985). Sin embargo, los mecanismos fisiológicos son cruciales en una búsqueda rápida y para conocer los distintos parámetros objetivos que pueden favorecer un programa de mejora (Yeo y Flowers, 1984). Entre las estrategias que adoptan las plantas adaptadas a la salinidad está la intrusión o extrusión iónica en vacuola/citoplasma (Binzel *et al.*, 1988) y el incremento del nivel de solutos compatibles (Stewart y Lee, 1979; Handa *et al.*, 1986).

Sin embargo, al considerar a las leguminosas han de contemplarse como asociación simbiótica en la que la sal afecta tanto a la planta como a la bacteria y por tanto al nódulo fijador de nitrógeno. Conocer cual de los dos componentes de la simbiosis actúa como factor determinante del estrés salino es interesante. Sin

duda, los esfuerzos actuales están encaminados a que la tolerancia a la sal debe centrarse en la planta y no en el *Rhizobium*; no obstante intentamos abordar simultáneamente el estudio del efecto de la sal en ambos componentes de la simbiosis.



PARTE 2

## **Objetivo**

---



El estrés salino es uno de los mayores factores limitantes en la productividad de los cultivos de leguminosas, especialmente cuando el nitrógeno necesario para el crecimiento procede de la fijación simbiótica. La fotosíntesis, el metabolismo nitrogenado, la síntesis proteica, el transporte de fotoasimilados y el crecimiento de la planta se ven seriamente afectados por la salinidad. Esto supone un grave problema, sobre todo si se tiene en cuenta que el 40% de la superficie terrestre cultivable presenta problemas de salinidad, estando gran parte de esas áreas confinadas en las regiones mediterráneas.

Por otra parte, las leguminosas presentan gran interés por su capacidad para colonizar ecosistemas naturales, mejorando la fertilidad del suelo y permitiendo el asentamiento de otras especies vegetales, ya que el nitrógeno fijado quedará finalmente incorporado a la materia orgánica, aspecto que las hace potencialmente importantes en la lucha contra la desertización.

En el desarrollo de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa en suelos salinos, resulta evidente que la identificación de cepas de *Rhizobium* y genotipos de plantas huéspedes tolerantes a la sal pueden contribuir positivamente en el conocimiento de este tipo de estrés. El efecto del estrés salino en la simbiosis puede ser directo por inhibición del proceso de infección y/o funcionamiento de los nódulos o indirecto afectando a la fotosíntesis y/o al crecimiento vegetal. Se ha demostrado que las bacterias pueden adaptarse al incremento de sal, siendo capaces de tolerar niveles superiores de salinidad que las leguminosas que los hospedan. La tolerancia a la sal está influenciada por el estado de desarrollo de la planta, consecuentemente, la respuesta al estrés salino dependerá de los genes que estén funcionando en esa etapa de desarrollo. Esto implica que la adición de NaCl en distintas etapas de crecimiento puede dar lugar a respuestas más o menos acentuadas.

## Objetivo

El desarrollo de simbiosis efectivas en los nódulos radicales de leguminosas depende de una serie de interacciones complejas entre la planta huésped y el rizobio invasor. Ambos simbiosites responden sintetizando una serie de moléculas y/o proteínas, en las que se implican genes de la planta y de la bacteria. El nódulo morfológicamente y bioquímicamente es un órgano y en medio salino responde con un acúmulo de aminoácidos, nitrato y amonio ante el estrés osmótico, produciéndose de esta forma una alteración del metabolismo nitrogenado del nódulo.

En este trabajo se aborda el estudio de la sensibilidad al NaCl de distintas cepas de *R. leguminosarum* biovar. *viciae* y de diversos genotipos de *V. faba*. Además, se profundiza en la evolución de la simbiosis *V. faba-R. leguminosarum*, lo que permitirá relacionar el efecto del NaCl con el desarrollo de la planta. También, se compara la sensibilidad al estrés salino de leguminosas noduladas cuando crecen con distintos niveles de nitrato. Por último, se lleva a cabo la purificación y caracterización de la NADH-GOGAT de los nódulos, enzima implicada en la asimilación del amonio y que junto a la GS constituyen el ciclo de la glutamato sintasa.

PARTE 3

## **Material y Métodos**

---



## 1. MATERIAL BIOLÓGICO

### 1.1. Material vegetal

La especie vegetal elegida para el presente trabajo ha sido *Vicia faba* L., leguminosa grano de elevado interés agrícola en la región mediterránea. Se ha utilizado el cultivar comercial Alborea (Semillas Pacífico SA., Sevilla) y varias líneas puras (Tab. 1) seleccionadas por cruzamiento y autofecundación por el Dr. D. Antonio Martín (Dpto. de Mejora Genética, CSIC, Córdoba). En el estudio comparativo de propiedades inmunológicas de la NADH-GOGAT de nódulos de *Vicia faba*, se han ensayado otras especies de leguminosas como *Vicia sativa*, *Phaseolus vulgaris*, *Medicago sativa*, *Pisum sativum* y *Glycine max* (Merr .)

**Tabla 1.** Denominación y características de los cultivares de *V. faba* utilizados en el presente trabajo

Denominación	Floración (días)	Color ala	Color semilla	Color hilo	Origen <sup>(a)</sup>	Variedad botánica <sup>(b)</sup>
VF4	36-37	Blanco	Hueso	Negro	Córdoba	2
VF6	48-49	Negro	Marrón	Negro	Córdoba	2
VF15	30	Negro	Hueso	Blanco	Córdoba	2
VF16	29	Negro	Negro	Negro	Córdoba	2
VF17	45	Negro	Burdeos	Blanco	Córdoba	3-4
VF27	42	Negro	Negro	Negro	Córdoba	3-4
VF38	27	Negro	Hueso	Negro	Córdoba	2
VF46	39-40	Negro	Rojo-marrón	Negro	SA	1
VF47	55	Negro	Marrón-verdoso	Blanco	Córdoba	1
VF60	43-44	Negro	Morado	Blanco	Córdoba	2
VF61	54	Negro	Negro	Negro	Córdoba	2
VF64	31	Negro	Marrón-verde	Blanco	Córdoba	2
VF83	47	Blanco	Marrón-hueso	Negro	Córdoba	2
VF112	27	Blanco	Hueso-verdoso	Negro	Córdoba	2
ALBOREA	40-41	Negro	Hueso	Negro	Comercial	3

(a) Origen: Córdoba, obtenidas en el Departamento de Mejora Genética, CSIC, Córdoba; S.A., América del Sur.

(b) Variedad botánica y tamaño de grano: mayor (1) > esquina (2) > minor (3) > paucijuga (4).

## 1.2. Microorganismos

Se han utilizado diversas cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viceae* (Tabla 2), aisladas de nódulos radicales de *V. faba* por Hervás *et al* (1991). Como control de referencia, se ha ensayado la cepa 300 (Brewin *et al*, 1980).

Otros microorganismos utilizados han sido *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli* GR12, *Rhizobium meliloti* GR4B, *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110.

**Tabla 2.** Denominación y lugar de procedencia de las cepas de *R. leguminosarum* biovar. *viceae* aisladas de nódulos de *V. faba*.

Cepa	Procedencia	Cepa	Procedencia	Cepa	Procedencia
GRA19	Alhama	GR17	Iznalloz	GRL8	Loja
GRC20	Cubillas	GRI24	Iznalloz	GRL19	Loja
GRC37	Cubillas	GRI32	Iznalloz	GRL22	Loja
				GRLM40	La Malaha

## 1.3. Material animal

Para la obtención de suero anti-GOGAT de nódulos de *V. faba*, se han utilizado conejos de raza híbrida Nueva Zelanda-California, suministrados por Panlab (España).

Los conejos se mantuvieron en el animalario de la Universidad de Málaga. Su alimentación se realizó con pienso compuesto de la casa Panlab, dieta 112.

## 2. MEDIOS DE CULTIVO

### 2.1. Solución nutritiva para plantas

Para el cultivo de plantas se ha utilizado la solución nutritiva de Rigaud y Puppo (1975), cuya composición es la que sigue:

- Macronutrientes:

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	0.200 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	0.200 g
$\text{KCl}$ .....	0.200 g
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....	0.120 g
$\text{Na}_2\text{FeEDTA}$ (Secuestrene) .....	0,025 g

- Micronutrientes:

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ .....	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
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	0.003 g
$\text{H}_3\text{BO}_3$ .....	0.018 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .....	0.12 mg

- Agua..... 1000 ml

Se ajusta el pH a  $7.0 \pm 0.1$  con KOH y se esteriliza en autoclave a  $117^\circ\text{C}$  durante 30 min.

## 2.2. Medios de cultivo utilizados para la conservación bacteriana y para la preparación de inóculos.

Los medios de cultivo bacteriano fueron distribuidos en tubos Roux inclinados en pico de flauta. En ellos se conservaron las cepas de uso rutinario manteniéndose a 4°C y resemebrándose cada 2 ó 3 meses. Para evitar la pérdida de caracteres genéticos por sucesivas resiembras, los cultivos líquidos microbianos en fase logarítmica de crecimiento se guardaron a -20°C adicionados de glicerol a 1 50% (v/v).

### 2.2.1. Medio 79 de Allen (Allen, 1957).

Se ha utilizado para el crecimiento de las cepas de *Rhizobium*. Su composición es la siguiente:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.6 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O .....	0.2 g
CaCO <sub>3</sub> .....	1.0 g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O.....	0.2 g
NaCl .....	0,2 g
Manitol .....	7.6 g
Glucosa .....	2.4 g
Extracto de levadura.....	0.5 g
Agar.....	15.0 g
Agua destilada.....	1000 ml

Antes de esterilizar a 117°C durante 20 min, el pH se ajusta a 7.0-7.2.

### 2.2.2. Medio YEM.

Se utilizó para el crecimiento de *Bradyrhizobium* y su composición se detalla a continuación:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O .....	2.0 g
NaCl .....	0,1 g
Manitol.....	10.0 g
Extracto de levadura.....	1.0 g
Agar.....	15.0 g
Agua destilada.....	1000 ml

Se ajusta el pH a 7.0-7.2 y se esteriliza a 117° C durante 20 min.

### 2.2.3. Medio bacteriano para curvas de crecimiento.

Para seguir el crecimiento bacteriano en el tiempo se utilizó el medio líquido **YMT** , siendo su composición la siguiente:

Triptona.....	5.0 g
Extracto de levadura.....	2.5 g
Manitol .....	10.0 g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O .....	0.6 g
Agua destilada.....	1000 ml

Cuando se utilizó en forma sólida se le adicionó agar a 1 1.5%.

### **3. CRECIMIENTO BACTERIANO**

#### **3.1. Crecimiento de inóculos**

El crecimiento se llevó a cabo en medio sólido a 28°C, durante 72 h para las especies del género *Rhizobium* y de 5 a 7 días para las de *Bradyrhizobium*.

#### **3.2. Efecto del NaCl sobre el crecimiento de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viceae***

El cultivo se desarrolló a 28°C, en agitación, en tubos de ensayo (3 tubos/tratamiento) que contenían 10 ml de medio YMT, inoculados al 4% a partir de preinóculos crecidos durante 48 h. El estudio del efecto de la sal en el crecimiento bacteriano se realizó añadiendo NaCl a determinadas concentraciones.

##### **3.2.1. Tolerancia al NaCl de diferentes cepas de *R. leguminosarum***

El crecimiento en condiciones salinas, de las cepas expuestas en la tabla 2, se llevó a cabo adicionando al medio de cultivo NaCl hasta una concentración final de 75 mM, manteniéndose un control sin NaCl para cada una de ellas. Las medidas de crecimiento se realizaron a las 6, 18, 36 y 48 h, por detección de la D.O. a 620 nm en un espectrofotómetro Spectronic (20D).

##### **3.2.2. Crecimiento de *leguminosarum* GRA19 con diferentes concentraciones de NaCl en el medio**

La cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, por sus características de infectividad y efectividad, se eligió para el estudio del crecimiento con distintas

concentraciones de sal. Se ensayaron cuatro niveles de NaCl: 0, 50, 75 y 100 mM.

La medida del crecimiento se realizó a las 6, 12, 24, 48 y 72 h, por determinación de la D.O. a 620 nm. Simultáneamente, se retiraron alícuotas de cada tubo para determinar el número de células viables. Esto se hizo por diluciones decimales, depositando 0.1 ml de cultivo en placas Petri (3 placas/dilución) sobre las que se vertieron 15 ml de medio **YMT** sólido mantenido en sobrefusión a 45°C. Tras el recuento de las colonias aparecidas se calculó el valor medio (Vincent, 1970).

Para describir la fase logarítmica de crecimiento, en función del número de células viables/ml, se determinó el tiempo de generación ( $G$ ), definido como el tiempo necesario para duplicar la población. La fórmula utilizada es la que sigue:

$$G = \frac{t \cdot \log 2}{\log b - \log a}$$

donde,

- $t$  = tiempo en horas transcurrido desde el inicio hasta el final de la fase logarítmica de crecimiento
- $2$  = representa la multiplicación por escisión de las bacterias
- $b$  = número de células viables/ml al final de la fase logarítmica
- $n$  = número de células viables/ml al inicio de la fase logarítmica

## **4. CULTIVO DE PLANTAS**

### **4.1. Cultivo hidropónico**

Se ha llevado a cabo en jarras Leonard (Leonard, 1943) de 1.5 l de capacidad, con vermiculita como sustrato inerte, que permite un adecuado desarrollo radical gracias a su porosidad. Las jarras Leonard constan de 2 recipientes de vidrio que encajan perfectamente. La parte superior contiene el sustrato y la inferior la solución nutritiva. A través de una mecha de papel de jarabe asciende la solución por capilaridad, manteniéndose de esta forma el grado de humedad del sustrato. Se esterilizan en autoclave a 120°C durante 1 h.

### **4.2. Esterilización germinación de las semillas**

Las semillas de las leguminosas se esterilizaron en superficie con etanol al 96% durante 2 min y medio, lavando después con abundante agua destilada estéril al objeto de eliminar los restos de etanol. Tras la esterilización se dejaron en imbibición durante 3 ó 4 h. Transcurrido este tiempo, se colocaron en semilleros de vermiculita estéril convenientemente humedecida. La esterilización de las semillas y la preparación de los semilleros se llevó a cabo en cámara de flujo laminar para prevenir contaminaciones. Los semilleros se cubrieron con bolsas de polietileno para evitar la pérdida de humedad y se mantuvieron en oscuridad durante 72 h a 26° C en una estufa de germinación.

### **4.3. Preparación del inóculo**

El inóculo se preparó a partir de cultivos frescos (72 h) en medio sólido, adicionando solución nutritiva estéril para conseguir, por agitación mecánica, una suspensión bacteriana de  $\approx 10^9$  células · ml<sup>-1</sup>.

#### **4.4. Siembra e inoculación**

En cada jarra Leonard estéril se sembraron, en condiciones axénicas, dos semillas pregerminadas (1-3 cm de radícula) que se cubrieron con 2 ml de inóculo. Ya inoculadas se cubren con vermiculita ya continuación con una capa de perlita estéril que disminuye el riesgo de contaminación evitando a la vez las pérdidas de agua por evaporación. Antes de trasladar las jarras Leonard a la cámara de cultivo se forran con papel para que la luz no llegue al sistema radical.

#### **4.5 Condiciones de la cámara de cultivo**

Las plantas crecieron en una cámara Koxka (SA8/17-27/R) con las siguientes condiciones ambientales:

- Fotoperiodo: 16h luz/ 8h oscuridad
- Temperatura:  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  día/  $17 \pm 1^\circ\text{C}$  noche
- Humedad relativa: 55% día/ 75% noche
- Intensidad luminosa:  $500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  en la superficie de las macetas, suministrada por fluorescentes Sylvania Cool-White (F72T12-CW-VHO) y lámparas incandescentes de 60 watos (30% del total de watos ).

Las jarras Leonard se distribuyeron sobre la mesa de cultivo al azar, cambiándose de forma periódica de lugar. El recipiente inferior de la jarra Leonard se cambió por otro con solución nutritiva reciente y estéril cada siete días y cada tres a partir de la tercera semana.

## 5. EXPERIMENTOS REALIZADOS EN PLANTAS

El estudio del metabolismo del amonio en la simbiosis *V. faba* -*R. leguminosarum*, se estructuró en tres bloques de experimentos sin que ello determinara una secuencia cronológica obligada, sino que ésta seguiría el desarrollo del propio trabajo:

- Caracterización del ciclo de la glutamato sintasa en nódulos de *V. faba*.
  - Desarrollo ontogenético de la actividad nitrogenasa y de las actividades del ciclo de la glutamato sintasa en nódulos de *V. faba*.
  - Evolución en el fotoperíodo de la actividad nitrogenasa y de las actividades del ciclo de la glutamato sintasa en nódulos de *V. faba*
- Efecto del estrés salino en la simbiosis de *V. faba*
  - Efecto del NaCl aplicado en el momento de la inoculación
  - Efecto del NaCl aplicado a simbiosis establecidas y fijadoras de nitrógeno
  - Tolerancia al estrés salino en diferentes líneas puras de *V. faba*
  - Interacción de la fertilización nitrogenada y la salinidad en la simbiosis *V. faba*-*R. leguminosarum*
- Estudio de la NADH-GOGAT de la fracción vegetal de los nódulos de *V. faba*: Caracterización y propiedades antigénicas.

### 5.1. Desarrollo ontogenético de la actividad nitrogenasa y de las actividades del ciclo de la glutamato sintasa en nódulos de *V. faba*

Se utilizó el cv. Alborea de *V. faba* inoculado con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* biovar. *viceae*. Las plantas crecieron en jarras Leonard con solución nutritiva adicionada de 2 mM de KNO<sub>3</sub>, concentración descrita como no inhibidora de la nodulación (Streeter, 1988). Se realizaron recogidas cada 3 ó 4 días entre los 10 y 50 días de crecimiento, con un total de 13 muestreos. En cada recogida se utilizaron 3 jarras (6 plantas). El experimento se realizó dos veces, llevándose a cabo la determinación de los parámetros siguientes:

- a) Crecimiento y nodulación:
  - Peso seco y fresco de nódulos, raíz y parte aérea
- b) Actividad nitrogenasa de los nódulos:
  - Actividad reductora de acetileno
  - Producción de hidrógeno en aire
- c) Enzimas de la asimilación del amonio en nódulos:
  - Actividad GS
  - Actividad NADH-GOGAT
  - Actividad NADH-GDH
- d) Determinaciones analíticas:
  - Proteína soluble en nódulos
  - Contenido de nitrógeno reducido en el material vegetal

## 5.2. Evolución en el fotoperiodo de la actividad nitrogenasa y de las actividades del ciclo de la glutamato sintasa en nódulos de *V. faba*

Se han estudiado las actividades enzimáticas implicadas en la fijación de nitrógeno y asimilación del amonio durante 48 h, con determinaciones cada 3 h. Se utilizaron plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* que crecieron con 2 mM de  $\text{NO}_3^-$  durante 23 días, momento en que la actividad nitrogenasa se encuentra estabilizada y la actividad NADH-GOGAT y GS se encuentran en su punto máximo. En cada recogida se usaron 3 jarras (6 plantas) y el experimento se realizó 2 veces. Las determinaciones fueron las siguientes:

- a) Actividad nitrogenasa de los nódulos: Reducción de acetileno
- b) Enzimas de la asimilación del amonio en nódulos:
  - Actividad GS
  - Actividad NADH-GOGAT
  - Actividad NADH-GDH
- c) Determinaciones analíticas:
  - Proteína soluble en nódulos

## 5.3. Efecto del NaCl aplicado en el momento de la inoculación

Se utilizó el cv. Alborea de *V. faba* inoculado con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*. Se ensayaron cuatro niveles de NaCl (0, 50, 75 y 100 mM) que se adicionó a la solución nutritiva suplementada con 2 mM de  $\text{NO}_3^-$ . Se prepararon 9 jarras Leonard por tratamiento, realizándose recogidas a los 28, 35 y 42 días después de la siembra. El experimento se realizó dos veces, llevándose a cabo las determinaciones que siguen:

- a) Crecimiento y nodulación:
  - Peso seco y fresco de nódulos, raíz y parte aérea
  - Número de nódulos
- b) Actividad nitrogenasa de los nódulos:
  - Actividad reductora de acetileno
  - Producción de hidrógeno en aire
- c) Enzimas de la asimilación del amonio en nódulos:
  - Actividad GS
  - Actividad NADH-GOGAT
- d) Determinaciones analíticas:
  - Proteína soluble en nódulos

#### **5.4. Efecto del NaCl aplicado a simbiosis establecidas y fijadoras de nitrógeno**

Las plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* crecieron con solución nutritiva adicionada de 2 mM de  $\text{NO}_3^-$ . Tras 28 días de cultivo, se aplicaron 3 niveles de NaCl, estableciéndose un diseño experimental de 4 tratamientos salinos (0, 50, 75 y 100 Mm), con 9 jarras Leonard por tratamiento, utilizándose 3 en cada recogida, a los 7, 14 y 21 días después de la aplicación del NaCl. También, se llevó a cabo una recogida en el día 0, momento de aplicación de la sal. Los datos son media de dos experimentos. Las determinaciones realizadas fueron las que siguen:

- a) Crecimiento y nodulación:
  - Peso seco y fresco de nódulos, raíz y parte aérea
- b) Actividad nitrogenasa de los nódulos
  - Actividad reductora de acetileno

- Producción de hidrógeno en aire
- c) Enzimas de la asimilación del amonio en nódulos:
  - Actividad GS
  - Actividad NADH-GOGAT
- d) Determinaciones analíticas:
  - Proteína soluble en nódulos
  - Contenido de nitrógeno reducido en el material vegetal

### **5.5. Tolerancia al estrés salino en *V. faba*: Utilización de líneas puras**

Se utilizaron 16 genotipos de *V. faba* que crecieron con 75 Mm de NaCl desde el inicio del cultivo, nivel considerado medio-alto según experimentos anteriores. La recogida de plantas se llevó a cabo en floración, que tuvo lugar en diferentes días según las líneas (Tabla 1). Los parámetros determinados fueron los siguientes:

- a) Crecimiento y nodulación:
  - Peso seco y fresco de nódulos, raíz y parte aérea
- b) Actividad nitrogenasa de los nódulos:
  - Actividad reductora de acetileno
  - Producción de hidrógeno en aire
- c) Enzimas de la asimilación de amonio en nódulos:
  - Actividad GS
  - Actividad NADH-GOGAT
- d) Determinaciones analíticas:
  - Proteína soluble en nódulos

### 5.6. Interacción de la fertilización nitrogenada y la salinidad en la simbiosis *V. faba*-*R. leguminosarum*

La interacción de la fertilización nitrogenada y la sal en plantas inoculadas de *V. faba* cv. Alborea se ha estudiado combinando dos niveles de  $\text{NO}_3^-$  (2 y 8 Mm) y cuatro concentraciones de NaCl (0, 50, 75 y 100 Mm).

El  $\text{NO}_3^-$  se aplicó desde el inicio del cultivo y el NaCl tras 18 días de crecimiento, con incrementos sucesivos hasta el día 24 en el que se alcanzó la concentración final (Wignarajah, 1990). A partir de este momento se realizaron 4 recogidas a intervalos de 3 días. El experimento se realizó dos veces y los parámetros determinados fueron:

- a) Crecimiento y nodulación:
  - Peso seco y fresco de nódulos, raíz y parte aérea
- b) Actividad nitrogenasa de los nódulos:
  - Actividad reductora de acetileno
  - Producción de hidrógeno en aire
- c) Enzimas de la asimilación del amonio en nódulos:
  - Actividad GS
  - Actividad NADH-GOGAT
- d) Determinaciones analíticas:
- e) Proteína soluble en nódulos
  - Contenido de nitrógeno reducido en el material vegetal
  - Contenido en prolina soluble

## 6. METODOLOGÍA EMPLEADA

### 6.1. Análisis del crecimiento

En la recogida se procedió a sacar las plantas de las jarras Leonard y a lavar las raíces abundantemente con agua para eliminar los restos de vermiculita. Posteriormente, se lavaron con agua destilada, secando el exceso con papel de filtro. Los nódulos de cada planta se aislaron, registrando inmediatamente el peso fresco y el número cuando procedió. A continuación, se mezclaron de modo uniforme por tratamiento y se congelaron en nitrógeno líquido hasta su utilización.

Posteriormente, se separó raíz y parte aérea y se colocaron en estufa de corriente forzada de aire a 70° C durante 24 h. Pasado este tiempo se determinó el peso seco de cada órgano. El peso seco de los nódulos se calculó mediante un factor PS/PF obtenido de varias muestras pesadas cada día antes y después del secado.

Dado que las diferentes líneas puras florecen a distintos tiempos y por consiguiente su período de cultivo difiere de unas a otras, se calculó a efectos comparativos una tasa de crecimiento absoluto (TCA), dividiendo el peso seco de la planta por el número de días de cultivo, expresada en  $\text{mg PS (planta)}^{-1} \cdot (\text{día})^{-1}$ . Las mismas unidades tiene la tasa de crecimiento relativo (TCR), que permitió estudiar la velocidad de crecimiento en cortos intervalos de tiempo y que se calculó según la fórmula descrita por Hunt (1982):

$$\text{TCR} = (W_2 - W_1) / (t_2 - t_1)$$

donde,

$W_2$  = peso seco de la planta en la última recogida

$W_1$  = peso seco de la planta en la penúltima recogida

$t_2$  = día en que se realizó la última recogida

$t_1$  = día en que realizó la penúltima recocogida

Para nódulos se calculó su peso normalizado, resultado de dividir el PS de nódulos por el de parte aérea, expresándose en  $\text{mg PS nódulos} \cdot (\text{g PSPA})^{-1}$ . Este se considera un dato mas adecuado para estimar el desarrollo de la nodulación así como para reconocer el efecto que sobre ésta pueden tener factores como el nitrógeno combinado, genotipo de la planta, etc. (Streeter, 1985).

### 6.2. Actividades de la nitrogenasa

La producción de hidrógeno y la reducción de acetileno por la nitrogenasa se determinó en muestras de raíz (2 g) constituidas por fragmentos de 2 a 4 cm con nódulos adheridos (0.2-0.4 g de peso fresco) (Herdina y Silsbury, 1990). Tanto la producción de hidrógeno como la reducción de acetileno se midieron secuencialmente sobre la misma muestra.

#### 6.2.1. Producción de hidrógeno por la nitrogenasa

La producción de hidrógeno concomitante con la reducción de nitrógeno por la nitrogenasa fue medida utilizando cromatografía gaseosa (Schubert y Evans, 1976; Bédmar *et al.*, 1983) según la metodología descrita por Caba (1991). Se tomaron muestras de 1 ml de la atmósfera que rodea a la raíz tras 20 min de incubación. Se realizaron 6 repeticiones y la producción de hidrógeno se expresó en  $\mu\text{mol H}_2 \cdot (\text{g PS})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

### 6.2.2. Actividad reductora de acetileno

El flujo total de electrones a través de la nitrogenasa fue evaluado por el test de reducción de acetileno mediante cromatografía gaseosa (Burris, 1972), según la metodología descrita por Hervás (1988). Tras la adición de acetileno se tomaron muestras a los 10 y 20 min de la atmósfera que rodea a la raíz para cuantificar el etileno producido y la actividad se expresó en  $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot (\text{g PS})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

### 6.2.3. Cálculo de la eficiencia relativa

La eficiencia relativa (ER) de la fijación de nitrógeno se calculó a partir de los datos obtenidos en los apartados 6.2.1 y 6.2.2, según la ecuación propuesta por Schubert y Evans (1976):

$$\text{ER} = 1 - \frac{\text{H}_2 \text{ desprendido del aire}}{\text{Acetileno reducido}}$$

## 6.3. Enzimas de la asimilación del amonio en nódulos

### 6.3.1. Preparación de extractos libres de células

Para la extracción de estas enzimas se utilizó la metodología propuesta por Groat y Vance (1981), optimizada por Caba *et al* (1993). El medio de extracción consistió en tampón maleico-KOH 100 mM pH 6.8 adicionado de sacarosa 100 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 2% (v/v) y etilenglicol 15% (v/v), como estabilizantes de las enzimas. Los nódulos se homogeneizaron en mortero con medio de extracción en proporción 1/12 (p/v) y polivinilpolipirrolidona (PVPP)

insoluble en una cantidad equivalente al 50% del peso fresco de la muestra vegetal. El homogenado se filtró a través de 4 capas de gasa, a continuación se clarificó por centrifugación a 2500 g durante 5 min para eliminar restos de tejido y células y posteriormente a 30000 g durante 20 min, en una centrífuga Sorvall Superspeed RC-5B (DuPont Instruments) a 4°C. Se obtiene así una solución nítida con las proteínas solubles del citosol del nódulo, que se empleó como fuente de las enzimas. Todo el proceso de extracción se llevó a cabo en baño de hielo picado a una temperatura entre 0 y 4°C.

Las tres actividades se ensayaron dentro de las 3 h siguientes a la extracción, siguiendo las recomendaciones de Farnden y Robertson (1980) y Groat y Vance (1981). No obstante, la NADH-GOGAT, la más inestable, siempre se ensayó inmediatamente después de la extracción en un período no superior a hora y media.

### 6.3.2. Valoración de la actividad GS

La actividad GS de los nódulos se valoró mediante el ensayo semibiosintético, en el que uno de sus productos de reacción, el  $\gamma$ -glutamil hidroxamato ( $\gamma$ GH), puede valorarse mediante una reacción colorimétrica. El ensayo ha sido adaptado a partir de la metodología propuesta por Farnden y Robertson (1980), Kaiser y Lewis (1984) y Lillo (1984). Las mezclas de reacción contienen, en 1 ml de volumen total, tampón imidazol- HCl 0.15 M pH 7.8, Na<sub>2</sub>-EDTA 4 mM, L-glutamato sódico 0.15 M, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 45 mM, hidroxilamina 30 mM, ATP 10 mM y 0.2 ml de extracto, que inicia la reacción.

La reacción se desarrolla a 30° C durante 30 min. Pasado este tiempo, se detiene por la adición de 0.5 ml de reactivo de cloruro férrico [mezcla de volúmenes iguales de: 10% (p/v) FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O en HCl 2 N; 24% (p/v) ácido

tricloroacético en agua destilada y 50% (v/v) HCl en agua destilada], agitando vigorosamente. Las mezclas se centrifugaron a 3500 g durante 5 min y se registró la absorbancia del sobrenadante a 540 nm.

De cada extracto se prepararon 4 repeticiones, un blanco (omitiendo el glutámico y la hidroxilamina) y dos controles a tiempo cero (deteniendo la reacción inmediatamente antes de la incubación).

La cuantificación del  $\gamma$ -GH formado se hace a partir de una recta de calibrado obtenida con concentraciones conocidas de hidroxamato. La actividad se expresó en  $\mu\text{mol } \gamma\text{GH} \cdot (\text{gPF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

### 6.3.3. Valoración de la actividad NADH-GOGAT

La actividad NADH-GOGAT de los nódulos se determinó espectrofotométricamente siguiendo la disminución de absorbancia a 340 nm debida a la oxidación de NADH (Groat y Vance, 1981; Singh y Srivastava, 1986). La mezcla de reacción contenía, en un volumen total de 1 ml, tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.5,  $\text{Na}_2$ -EDTA 1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.1% (v/v),  $\alpha$ -cetoglutarato 2.5 mM, aminooxiacetato 1 mM, NADH 0.15 mM, L-glutamina 10 mM y 0.05 ml de extracto. La reacción se inicia con la adición de la L-glutamina. La disminución de la absorbancia, lineal al menos durante 12 min después de una fase *lag* de la misma, fue registrada durante un período de 10 min en un espectrofotómetro Beckman DU-70 termostatzado a 30°C. Se prepararon 4 repeticiones y un blanco sin  $\alpha$ -cetoglutarato para corregir la posible oxidación endógena del NADH.

### 6.3.4. Valoración de la actividad NADH-GDH

La actividad NADH-GDH en nódulos se determinó espectrofotométricamente siguiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm por oxidación del NADH. La mezcla de reacción de 1 ml contenía tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.5,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.1% (v/v),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  100 mM, NADH 0.1 mM,  $\alpha$ -cetoglutarato 2.5 Mm y 0.1 ml de extracto. La reacción se inicia con la adición del  $\alpha$ -cetoglurato. La disminución de la absorbancia, lineal al menos durante 10 min después de una corta fase *lag* de la misma, fue registrada durante 8 min en un espectrofotómetro Beckman DU-70 termostatzado a 30° C. Se prepararon 4 repeticiones y un blanco sin  $\alpha$ -cetoglutarato para corregir la posible oxidación endógena del NADH.

### 6.3.5. Cálculo de la actividades enzimáticas NADH-GOGAT y NADH-GDH

El cálculo de las actividades enzimáticas acopladas a una reacción de oxido- reducción NAD(P)H se realiza según la siguiente ecuación:

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

donde,

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

V = volumen total de la mezcla de reacción

$V_T$  = volumen total de extracto

$\epsilon$  = coeficiente de extinción molar del NAD(P)H =  $6.22 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$

d = ancho de la cubeta = 1 cm

$v$  = volumen de extracto en la mezcla

$10^6$  = para expresar la actividad en micromoles

La actividad de la enzima se expresó en  $\mu\text{mol NADH}_{\text{OX}} \cdot (\text{gPF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  o en  $\mu\text{mol NADH}_{\text{OX}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg proteína})^{-1}$ .

### 6.4. Determinaciones analíticas

#### 6.4.1. Determinaciones realizadas en nódulos

##### 6.4.1.1. Determinación de proteína soluble

Se ha seguido el método descrito por Bradford (1976). basado en la unión del azul brillante de Coomassie G-250 a las proteínas.

Se utilizaron alícuotas de 0.1 ml, convenientemente diluidas para que contengan entre 2 y 10  $\mu\text{g}$  de proteína, a las que se le añadió 1 ml de reactivo Bradford y tras agitar se midió la absorbancia a 595 nm después de 5 min y antes de 1 h.

El cálculo de la concentración de proteínas se realizó, siguiendo el mismo procedimiento, mediante una curva patrón de seroalbúmina bovina (Merk, fracción V) en cantidades comprendidas entre 2 y 10  $\mu\text{g}$ .

##### 6.4.1.2. Determinación de prolina

La extracción se realizó en mortero con ácido sulfosalicílico al 3% (p/v) como medio de extracción, con una relación peso fresco de muestra/volumen de medio de 1/10. Tras la maceración se centrifugó a 2500 g durante 10 min y

el sobrenadante obtenido se utilizó como extracto crudo para la determinación de prolina.

Se utilizaron alícuotas de 0.25 a 1 ml de extracto crudo, a las que se les adicionó 1 ml de ninhidrina, preparada al 2.5% (p/v) en una solución formada por ácido acético glacial al 60% (v/v) y ácido fosfórico al 40% (v/v), 1 ml de ácido acético glacial y ácido sulfosalicílico hasta un volumen total de 3 ml. Esta mezcla de reacción se hierve durante 60 min, se para con hielo durante 1 ó 2 min y a continuación se añaden 3 ml de tolueno, se agita fuertemente y la fase superior se utiliza para medir la absorbancia a 520 nm. Se utilizó un blanco con ácido sulfosalicílico. Para el cálculo de la concentración de prolina se preparó, siguiendo el mismo procedimiento, una curva patrón con prolina (Sigma) en cantidades comprendidas entre 10 y 100 µg.

### **6.4.2. Determinaciones realizadas en parte aérea y raíz**

El material seco y molido (polvo fino y homogéneo) se sometió a un proceso de mineralización por vía húmeda, siguiendo la técnica propuesta por Peach y Tracey (1956) y descrita por Lachica *et al.* (1965, 1973).

#### **6.4.2.1. Determinación de nitrógeno**

El nitrógeno se valoró por el método de Kjeldahl, utilizando el sistema de Bouat (Bouat y Groucet, 1965), basado en la valoración del NH<sub>3</sub> formado al reaccionar el mineralizado con NaOH. El arrastre del vapor de amoníaco se lleva a cabo por corriente de aire, lo que permite además vaciar el contenido del matraz colector una vez finalizada la valoración de cada muestra. Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro de absorción molecular Beckman-25.

Los valores se expresaron finalmente en  $\text{mg N} \cdot (\text{planta})^{-1}$  y como en el caso del crecimiento se calculó la tasa de adquisición de nitrógeno, expresada en  $\text{mg N} \cdot (\text{planta})^{-1} (\text{día})^{-1}$ .

### 6.5. Presentación y estudio estadístico de los resultados

En los distintos tipos de experimentos se utilizó un diseño completamente al azar, distribuyendo las macetas siempre de forma aleatoria por la superficie de la mesa de cultivo. Los experimentos fueron repetidos al menos una vez, considerando los valores más representativos. Los datos originales obtenidos se sometieron a un análisis estadístico consistente en:

- Análisis de la varianza multifactorial, con dos o tres entradas, según el experimento
- Test de mínimas diferencias significativas (MDS) entre medias
- Test de Tukey, que compara fuentes de variación por separado
- Coeficientes de correlación simple entre variables

Los resultados se presentan en diagramas de barra o histogramas, gráficas y tablas de medias, que en todos los casos son resúmenes de datos que no se incluyen en esta memoria.

## **7. CARACTERIZACIÓN DE LA NADH-GOGAT DE NÓDULOS DE *V. faba***

### **7.1. Purificación parcial de la enzima**

#### **7.1.1. Preparación del extracto crudo**

La extracción se realizó con un homogenizador Sorvall (USA, modelo Omnimixer 17106) en baño de hielo picado con un medio compuesto por fosfato potásico 20 mM pH 7.5,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.5% y PMSF 1 mM. Se utilizaron 50 g de nódulos de *V. faba* congelados en nitrógeno líquido. La extracción se realizó en tandas de 12-13 g, con cinco volúmenes del medio de extracción, a velocidad máxima durante 6-7 períodos de 30 segundos con intervalos de 30 segundos entre sí. El homogenado se filtró a través de dos capas de muselina y se centrifugó (Beckman, J2-21M) dos veces a 20000 g y 4°C durante 30 min, utilizando el sobrenadante, fracción citosólica del nódulo, para los siguientes pasos de purificación.

#### **7.1.2. Precipitación fraccionada con sulfato amónico**

El extracto crudo se sometió a una precipitación fraccionada con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en polvo (Merck) entre el 30 y el 60% de saturación. Se centrifugó a 20000 g durante 30 min y el precipitado se resuspendió en un tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.5 y  $\beta$ -mercaptoetanol al 0.5% (tampón de desarrollo), en un volumen total 25 veces inferior al del extracto crudo de partida.

### 7.1.3. Diálisis

El concentrado de proteínas obtenido por fraccionamiento con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  se dializó durante 3 h, frente a 100 veces su volumen, con el tampón de desarrollo anteriormente citado. Se realizaron cambios cada 30 min.

### 7.1.4. Cromatografía de intercambio iónico

El dializado se aplicó a una columna (2.5 x 22 cm) de DEAE-sephacel previamente equilibrada con el tampón de desarrollo. Una vez introducida la muestra se lavó durante toda la noche con el mismo tampón adicionado de KCl 0.1 M. La elución se realizó con gradiente lineal de KCl (0.1-0.4 M) en un volumen total 5 veces el de la columna. El flujo, que se estableció con una bomba peristáltica (LKB), fue de 20 ml/h para la introducción de la muestra, aumentándose hasta 40 ml/h para el lavado y la elución. Con ayuda de un colector (LKB) se recogieron fracciones de 4.35 ml. Las fracciones con mayor actividad NADH-GOGAT se reunieron y se concentraron por ultrafiltración en célula Amicón (modelo 8200) con membranas de 10 kD (Diaflo) y con filtros Cx-30 (Millipore) acoplados a una bomba de vacío, hasta un volumen final de 5 ml.

### 7.1.5. Cromatografía de exclusión molecular

Las fracciones concentradas procedentes del intercambio iónico se aplicaron a una columna de filtración en gel con un soporte de Sephacryl S-300 (1.5 x 38 cm). La columna se equilibró con el tampón de desarrollo. La elución se realizó con el mismo tampón a flujo de 15 ml/h, recogándose fracciones de 3 ml. Las fracciones con actividad se concentraron y se almacenaron a  $-40^\circ\text{C}$  o se estabilizaron con glicerol al 20% a  $4^\circ\text{C}$  hasta su uso.

### **7.1.6. Criterio de Dureza**

La preparación de NADH-GOGAT obtenida tras la exclusión molecular, se sometió a una electroforesis en geles de poliacrilamida al 7% en presencia de SDS, según se describe en el apartado 7.3.1, obteniéndose una banda mayoritaria de proteína (Rf de 0.22) al teñir.

## **7.2. Separación de posibles isoenzimas de la NADH-GOGAT**

### **7.2.1. Preparación de extractos crudos**

Se utilizaron 10 g de nódulos de *V. faba* congelados. La extracción se realizó según se detalla en el apartado 7.1.1.

### **7.2.2. Precipitación fraccionada con $(\text{NH}_4)_2\text{S}_0_4$**

Se llevó a cabo como se describe en el apartado 7.1.2. El precipitado entre el 30% y 60% de saturación se resuspendió en un volumen final de 3.6 ml.

### **7.2.3. Diálisis**

El concentrado de proteínas se dializó durante 3 h, frente a 100 veces su volumen en tampón de desarrollo, con cambios cada 30 min.

### **7.2.4. Cromatografía en DEAE-sepharosa**

Tras la diálisis, el concentrado, se aplicó a una columna (2.6x14.5 cm) de DEAE- sepharosa "Fast-Flow", resina de intercambio aniónico débil previamente equilibrada con 5 volúmenes de tampón de desarrollo. Cuando se

introdujo el dializado se lavó con 5 volúmenes del mismo tampón adicionado de KCl 0.1 M. La elución se realizó con gradiente lineal de KCl (0.1-0.4 M) en un volumen total de 400 ml. Se recogieron fracciones de 4.5 ml a flujo de 40 ml/h.

Las fracciones con mayor actividad NADH-GOGAT concentraron con célula Amicón hasta un volumen final de 1 ml.

### **7.2.5. Diálisis**

El concentrado se dializó en tampón de desarrollo durante 3 h, frente a 100 veces su volumen, realizándose cambios cada 60 min.

### **7.2.6. Cromatografía en Q-sepharosa**

El dializado se aplicó a una columna (1.5x16 cm) de intercambio aniónico fuerte, Q-sepharosa "Fast-Flow", previamente equilibrada con tampón de desarrollo. Tras introducir la muestra se lavó con 5 volúmenes del mismo tampón adicionado de 0.1 M de KCl. La elución se realizó con gradiente lineal de KCl (0.1-1 M) en un volumen total 5 veces el de la columna utilizada. El flujo de trabajo fue 40 ml/h.

Las fracciones con actividad NADH-GOGAT se concentraron y se almacenaron a -40°C.

### 7.3. Técnicas electroforéticas

#### 7.3.1. Electroforesis desnaturalizante

Se realizó en placa vertical según el sistema discontinuo de Laemmli (1970). El gel separador se preparó al 7% de poliacrilamida (acrilamida 30%-bisacrilamida 0.8%) en Tris-HCl 0.38 M pH 8.8 y SDS 0.1% (p/v) como agente desnaturalizante. Como catalizadores de la polimerización se utilizó persulfato amónico 0.075% (p/v) y TEMED 0.1% (v/v). Antes de añadir los catalizadores, la mezcla del gel separador se desgasificó; posteriormente, se vertió en la placa y se dejó polimerizar, con el menisco cubierto por una capa de 3 a 5 mm de etanol al 70%, a temperatura ambiente y expuesta a la luz. Una vez polimerizado se eliminó el etanol, se lavó bien y se adicionó el gel concentrador que contenía Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, poliacrilamida 4%, SDS 0.1% (p/v), persulfato amónico 0.075% (p/v) y TEMED 0.069% (v/v).

Las cubetas de electroforesis utilizadas fueron LKB (2050 Midget) y Miniprotean (Biorad) y las fuentes de alimentación LKB (MultiDrive XL) y Atom (502).

El tampón electrolito fue Tris 25 mM-glicina 190 mM pH 8.3, adicionado de SDS al 0.1% (p/v). La electroforesis se comenzó con una intensidad constante de 15 mA/gel hasta que el frente llegó al gel separador, momento en que se aumentó a 30 mA/gel.

Las proteínas utilizadas como marcadores del peso molecular, suministradas por Sigma, fueron: miosina (205 kD),  $\beta$ -galactosidasa (116 kD), fosforilasa b (97.4 kD), seroalbúmina (66 kD) y ovoalbúmina (45 kD).

Las muestras aplicadas se prepararon en una relación 4/1 con una solución compuesta de Tris 0.36 M, glicerol 30% (v/v),  $\beta$ -mercaptoetanol al 45% (v/v), SDS 18% (p/v) y azul de bromofenol 0.015% (p/v). Se calentaron a 100°C durante 5 min. La cantidad de proteína de cada muestra osciló entre 20 y 50  $\mu$ g.

### 7.3.2. Electroforesis nativa en gradiente de poliacrilamida.

La electroforesis en gradiente de poliacrilamida se utilizó para determinar el peso molecular nativo de la NADH-GOGAT de nódulos de *V. faba*. Las placas se llenaron con un gel separador en el que se estableció un gradiente lineal entre 4.5 y 10% y un gel para concentrar las muestras que contenía poliacrilamida al 4%.

La preparación de los geles fue similar a la descrita en el apartado 7.3.1, excepto que éstos no contenían SDS.

Las proteínas marcadoras del peso molecular fueron: tiroglobulina (669 kD), ferritina (440 kD), catalasa (232 kD), lactato deshidrogenasa (140 kD) y albúmina bovina (68 kD).

La electroforesis se realizó en ausencia de agentes desnaturizantes ya una intensidad constante de 10 mA/gel al inicio y de 20 mA/gel posteriormente.

Las muestras se prepararon con sacarosa al 10% (p/v) y azul de bromofenol al 0.004% (p/v). En cada pocillo se adicionó un total de 100  $\mu$ g de proteína procedente de extractos crudos o 25  $\mu$ g de proteína parcialmente purificada.

### **7.3.3. Tinción de proteínas en geles**

#### **7.3.3.1. Tinción con azul Coomassie**

Las proteínas del gel se tiñeron con azul Coomassie R-250 al 0.1% (p/v) en una solución de isopropanol al 25% (v/v) y acético al 10% (v /v), que permitió a su vez la fijación del gel, durante 30 min.

Para desteñir los geles se utilizó una mezcla de metanol a140% y acético al 10%. Este procedimiento se utilizó tanto para geles nativos como desnaturalizantes.

#### **7.3.3.2. Tinción por actividad**

##### **a) Tinción positiva**

Los geles se equilibraron con tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.5, Na<sub>2</sub>-EDTA 1 mM y β-mercaptoetanol 0.1% (v/v), durante 15 min. A continuación se incubó con el mismo tampón adicionado de α-cetoglutarato 2.5 mM, NADH 1.5 mM y L-glutamina 10 mM durante 60 min a temperatura ambiente. Posteriormente el gel se lavó 3 veces con Tris-HCl 100 mM pH 8.5 y se incubó en una solución con el mismo tampón adicionado de nitroblue tetrazolium (Sigma) 25% (p/v) y phenazina metosulfato (Sigma) 3% (p/v).

La banda de NADH-GOGAT se visualiza transparente frente al fondo morado del resto del gel, debido a que en la zona donde está la enzima, el NADH se ha oxidado a NAD<sup>+</sup>.

### b) Tinción negativa

Consiste en detectar la actividad enzimática por su capacidad diaforasa. Para ello se equilibró el gel y se incubó con fosfato potásico 50 mM pH 7.5, Na<sub>2</sub>-EDTA 1 mM y β-mercaptoetanol 0.1% (v/v), α-cetoglutarato 2.5 mM, aminooxiacetato 1 mM, NADH 0.15 mM, L-glutamina 10 mM y nitroblue tetrazolium 25% (p/v) hasta que apareció una banda morada que correspondía a la NADH-GOGAT frente al fondo transparente del resto del gel. En este caso se tiñe la actividad enzimática que capta el NADH.

### 7.4. Determinación del peso molecular por infiltración en gel

Para hacer una segunda aproximación del peso molecular de la NADH-GOGAT de nódulos efectivos de *V. faba* se utilizó una filtración en gel, sephacryl S-300 “Fast-Flow” equilibrado en una columna de 1.5 x 66 cm con el tampón de desarrollo adicionado de KCl 0,1 M para evitar posibles interacciones con la matriz de la resina. La elución se realizó con el mismo tampón a flujo de 50 ml/h, recogiendo fracciones de 1 ml.

La columna fue calibrada con los pesos moleculares de las siguientes proteínas patrón: tiroglobulina (669 kD), 8 mg/ml; apoferritina (443 kD), 10 mg/ml; p-amilasa (200 kD), 4 mg/ml; alcohol deshidrogenasa (150 kD), 10 mg/ml; albúmina bovina (66 kD), 10 mg/ml y anhidrasa carbónica (29 kD), 3 mg/ml. Para la obtención del volumen vacío de la columna se utilizó azul dextrano (2000 kD), 5 mg/ml.

Se utilizó una muestra de 1 ml con la actividad NADH-GOGAT concentrada por precipitación fraccionada con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S0<sub>4</sub> a partir de un extracto crudo. La muestra contenía 1 mg de proteína/ml.

Tanto a las preparaciones de las proteínas patrón como a la de la muestra se les adicionó glicerol al 5% para que la entrada de la proteína en el gel fuese uniforme.

### **7.5. Técnicas inmunológicas**

#### **7.5.1. Obtención de anticuerpos**

##### **7.5.1.1. Inmunización del conejo**

Se utilizaron conejos de raza híbrida Nueva Zelanda-California de 4 kg de peso. La inmunización se realizó a partir de bandas de electroforesis en geles de poliacrilamida (7%), componente que potencia la respuesta inmunológica, por lo que no fue necesario utilizar el adyuvante de Freund.

Una vez cortada la banda correspondiente al peso molecular calculado para la NADH-GOGAT, se equilibró en tampón Tris-HCl 50 mM pH 6.8 y se almacenó a -20°C hasta su uso. Antes de cada inyección se maceró con el mismo tampón hasta un volumen final de 4 a 5 ml, quedando una mezcla densa que se inyectó vía subcutánea en el lomo del animal, en 8 ó 10 dosis.

El calendario de inyecciones y sangrías fue el que se describe en la tabla 3. Las extracciones se realizaron a partir de la vena marginal de la oreja.

**Tabla 3.** Protocolo de inmunización del conejo y de obtención del suero, con un total de 6 dosis y 3 sangrías. En la última sangría se sacrificó el conejo.

<b>Días</b>	0	14	28	42	49	84	94	126	136
<b>Dosis inyectadas (µg)</b>	150	100	100	100	-	100	-	100	-
<b>Nº de dosis</b>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	-	4 <sup>a</sup>	-	6 <sup>a</sup>	-
<b>Sangrías (ml)</b>	-	-	-	-	50	-	50	-	50
<b>Nº de sangría</b>	-	-	-	-	1 <sup>a</sup>	-	2 <sup>a</sup>	-	3 <sup>a</sup>

#### **7.5.1.2. Obtención del suero**

La sangre extraída en cada una de las extracciones se repartió en tubos de centrífuga y se dejó en reposo durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación se centrifugaron a 11000 g durante 15 min, quedando el suero en la parte superior, separado de la fase celular. El complemento se inactivó calentando el suero a 56°C durante 10 min.

El suero así tratado se repartió en tubos Eppendorf a razón de 500 µl y se almacenó a -80°C.

#### **7.5.2. Métodos inmunológicos**

##### **7.5.2.1. Titulación de los anticuerpos**

Se utilizaron extractos crudos como se describe en el apartado 6.3.2.1. Alícuotas de 100 µl se incubaron con cantidades crecientes (5-60 µl) de antisuero y PBS (50 mM fosfato potásico-KOH pH 7.2, NaCl 150 mM), hasta un volumen final de 0.4 ml. Esta mezcla de reacción se incubó a 4°C durante

12 h. Pasado este tiempo, también a 4°C, se incubó en agitación con 100 µl de proteína A-sepharosa al 10% (p/v) bloqueada con albúmina bovina (Fracción V, Sigma) para evitar uniones inespecíficas de otras proteínas del suero. Finalmente, se centrifugaron las muestras a 2500 g con una temperatura de 4°C, utilizándose el sobrenadante para medir la actividad enzimática. De esta forma la titulación del anticuerpo se realiza midiendo la actividad enzimática residual del sobrenadante tras la inmunoprecipitación del antígeno.

Esta técnica fue idéntica cuando se utilizó suero preinmune.

### **7.5.2.2. Electroforesis de anticuerpos precipitados por el antígeno y la proteína A-sepharosa**

Tras la titulación de los anticuerpos el sedimento de proteína A-sepharosa, que quedó tras eliminar el sobrenadante destinado a medir la actividad enzimática, se trató como se describe a continuación:

- Se lavó tres veces con PBS.
- Se volvió a lavar dos veces con el mismo tampón adicionado de SDS al 0.1% (p/v).
- Al precipitado final, se le añadió 25 µl de una mezcla formada por Tris 24 mM pH 6.8, glicerol 50% (v/v), β-mercaptoetanol 15% (v/v), SDS 6% (p/v) y azul de bromofenol 0.005% (p/v) y se hirvió durante 5 min a 100°C. El sobrenadante que quedó se utilizó para electroforesis en geles de poliacrilamida.

### 7.5.2.3. Ensayo de especificidad de los anticuerpos. "Western blot"

#### a) Transferencia de proteínas

Consiste en transferir las proteínas desde un gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa. Se utilizó una técnica en semiseco empleando el equipo Multiphor II NovaBlot (LKB).

La electroforesis se realizó en condiciones desnaturizantes como se detalla en el apartado 7.3.1. Una vez finalizada la electroforesis el gel se incubó durante 5 min en tampón de transferencia [Tris 25 mM-glicina 190 mM pH 8.3 y metanol 20% (v/v)]. A continuación se preparó una unidad de transferencia formada por 6 piezas de papel de filtro empapadas en dicho tampón que se reparten en dos tandas entre las que se coloca el conjunto formado por el gel de poliacrilamida y la membrana de nitrocelulosa estableciéndose una estructura tipo "sandwich" que se colocó con la correspondiente orientación entre los polos de grafito. A su vez éstos últimos van protegidos por 6 capas de papel de filtro empapado en tampón de transferencia. La transferencia se realizó a una intensidad constante de 45 mA/gel durante 2 h.

#### b) Tinción con anticuerpos

Una vez realizada la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se trató según el protocolo que se menciona a continuación:

- Bloqueo en una solución compuesta por TBS [Tris 20 mM pH 8.2, NaCl 150 mM], leche en polvo al 2% (p/v) y Tween 20 al 0.05% (v/v), durante toda la noche.

## Material y métodos

- Lavar tres veces durante 10 min con TBS, leche en polvo al 0.05% (p/v) y Tween 20 al 0.05% (v/v).
- Incubar con una solución de anti-GOGAT (dilución 1:100 del suero) en TBS, albúmina bovina al 0.5% (p/v) y Tween 20 al 0.05% (p/v), durante 2 h 30 min.
- Lavar cuatro veces durante 10 min con TBS, leche en polvo al 0.05% (p/v) y Tween 20 al 0.1% (v/v).
- Incubar durante 1 h 30 min con anticuerpos de cabra frente a inmunoglobulinas de conejo (Sigma) ligados a peroxidasa, dilución 1:8000, preparados en una solución de TBS, leche en polvo al 1% (p/v) y Tween 20 al 0.05% (v/v).
- Lavar tres veces durante 15 min con TBS, leche en polvo al 0.05% (p/v) y Tween 20 al 0.1% (v/v).
- Lavar 15 min con una solución de TBS, leche en polvo al 0.05% (p/v), SDS al 0.05% (p/v) y Tween 20 al 1% (v /v).
- Mantener 15 min en agua destilada.
- El revelado de las bandas se realizó con 3,3'-diaminobenzidina (Sigma) al 30% (p/v) preparada en fosfato sódico 20 mM pH 6 a la que se le añadió peróxido de hidrógeno (Fluka) 0.1% (v/v) o con 4-cloro-1-naptol (Sigma) preparado al 0.1% (p/v) en PBS (fosfato potásico 10 mM pH 7.5, NaCl 150 mM) y adicionado de peróxido de hidrógeno al 0.05% (v/v).
- En ambos casos, una vez aparecida la banda, la reacción se detuvo con abundante agua destilada.

**c) Tinción con negro amido**

Se utilizó para teñir el patrón de proteínas y de esta forma comprobar si la transferencia fue correcta. La tinción se realizó sumergiendo la membrana durante 2 min en una solución de negro amido preparado al 1% (p/v) en acético al 10% (v/v) y metanol al 5% (v/v). El exceso de colorante se elimina con agua destilada.

PARTE 4

## **Resultados**

---



# EFFECTO DEL CLORURO DE SODIO SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Rhizobium* *leguminosarum* biovar. *viceae*

I

## 1. TOLERANCIA AL NaCl DE DIFERENTES CEPAS DE *Rhizobium* *leguminosarum*

Se utilizaron 11 cepas silvestres de *R. leguminosarum* biovar. *viceae* (Tab. 2; Material y Métodos), entre las que se encuentra la cepa 300, que crecieron con 0 y 75 mM de NaCl en el medio. El incremento en D.O. se siguió hasta las 72 h y los resultados se muestran en la figura 1.1. Según los perfiles de crecimiento de los cultivos control, se pueden diferenciar dos tipos de cepas, aquellas de crecimiento más rápido y que han llegado a fase estacionaria tras 24 h de cultivo, entre las que se incluyen las cepas GRC37, GRI7, GRI32, GRL8, GRLM40 y 300 y aquellas otras de crecimiento más lento, que llegan a fase estacionaria después de 24 h de cultivo, serían las cepas GRC20, GRI24, GRL19 y GRL22. La GRA19 se incluiría en el primer grupo (Fig. 2.1). Por otra parte, la mayoría de las cepas ensayadas entran en crecimiento logarítmico en las primeras 12 h de cultivo, a excepción de la GRI24 que entra a las 24 h.

El crecimiento en medio salino se inhibió en todas las cepas ensayadas y, puesto que los cultivos se encuentran en fase estacionaria tras 48 h, en este punto se han calculado los porcentajes de D.O. respecto al control (Tab. 1.1). Atendiendo a los valores absolutos de D.O., hubo cepas cuyo crecimiento alcanzó valores inferiores a 0.5, estas paralizaron su crecimiento casi desde el

inicio del cultivo, con una inhibición media del 77%; en este grupo se incluyen siete de las cepas ensayadas, una de ellas es la GRI24 que fue la que presentó menor crecimiento, con una inhibición del 89%. Existen tres cepas, GRI32, GRA19 y GRL8, que presentaron un elevado crecimiento, con valores de D.O. próximos a 1 e inhibiciones del 26, 32 y 42% respectivamente. Por último se destaca la GRI7 que se situaría entre ambos grupos con valores en D.O. de 0.5 y un porcentaje de inhibición del 66%. La GRI32 llegó a fase estacionaria a las 48 h de cultivo tras un retraso de 24 h respecto al control, mientras que las cepas GRA19 y GRL8 lo hicieron a la vez que el control, a las 24 h, el resto presentó un crecimiento estabilizado desde las 12 h de cultivo.

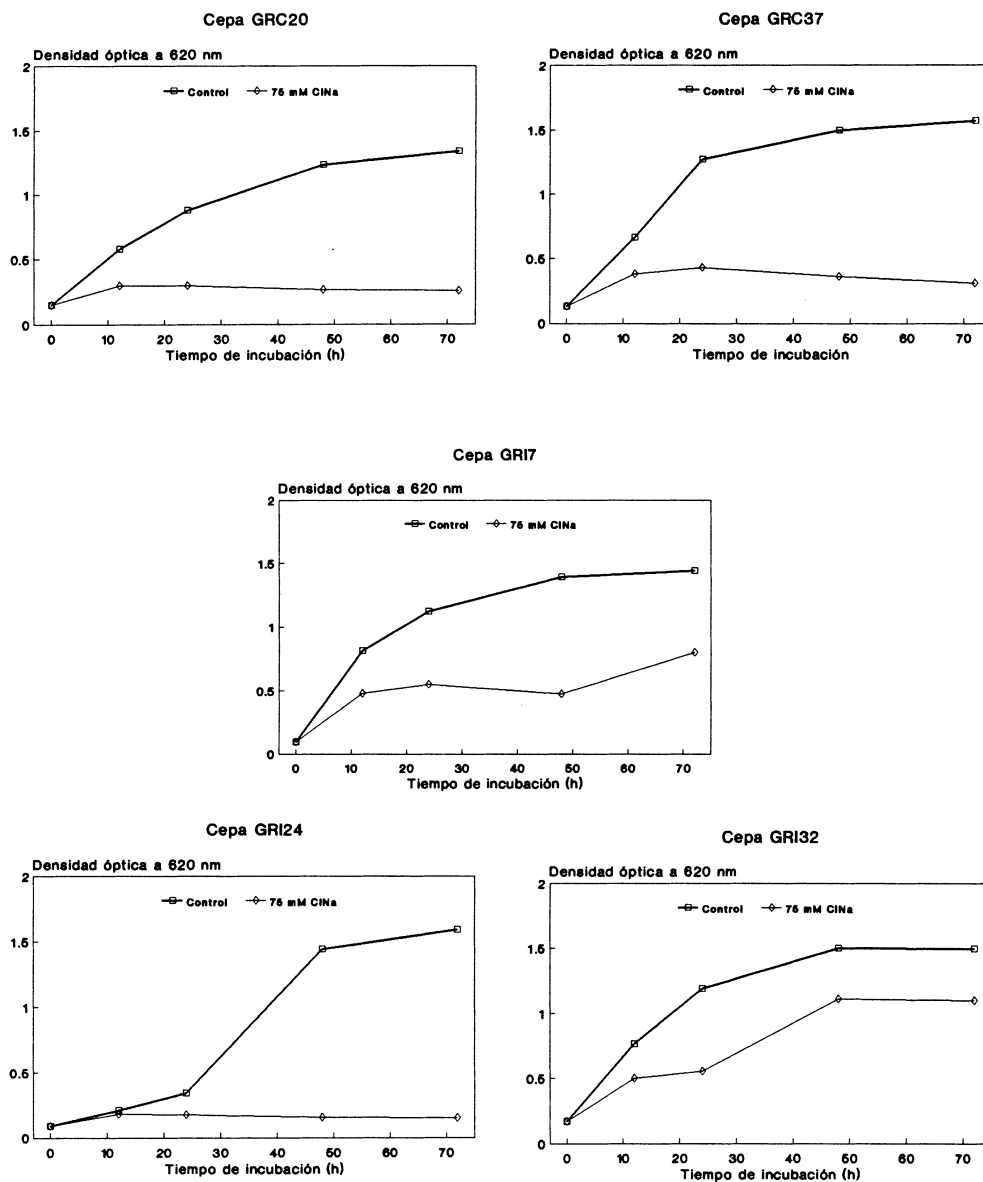


Figura 1.1.A. Curvas de crecimiento, en D.O. a 620 nm, de distintas cepas de *R. leguminosarum* biovar. *viceae*, en presencia de 0 y 75 mM de NaCl.

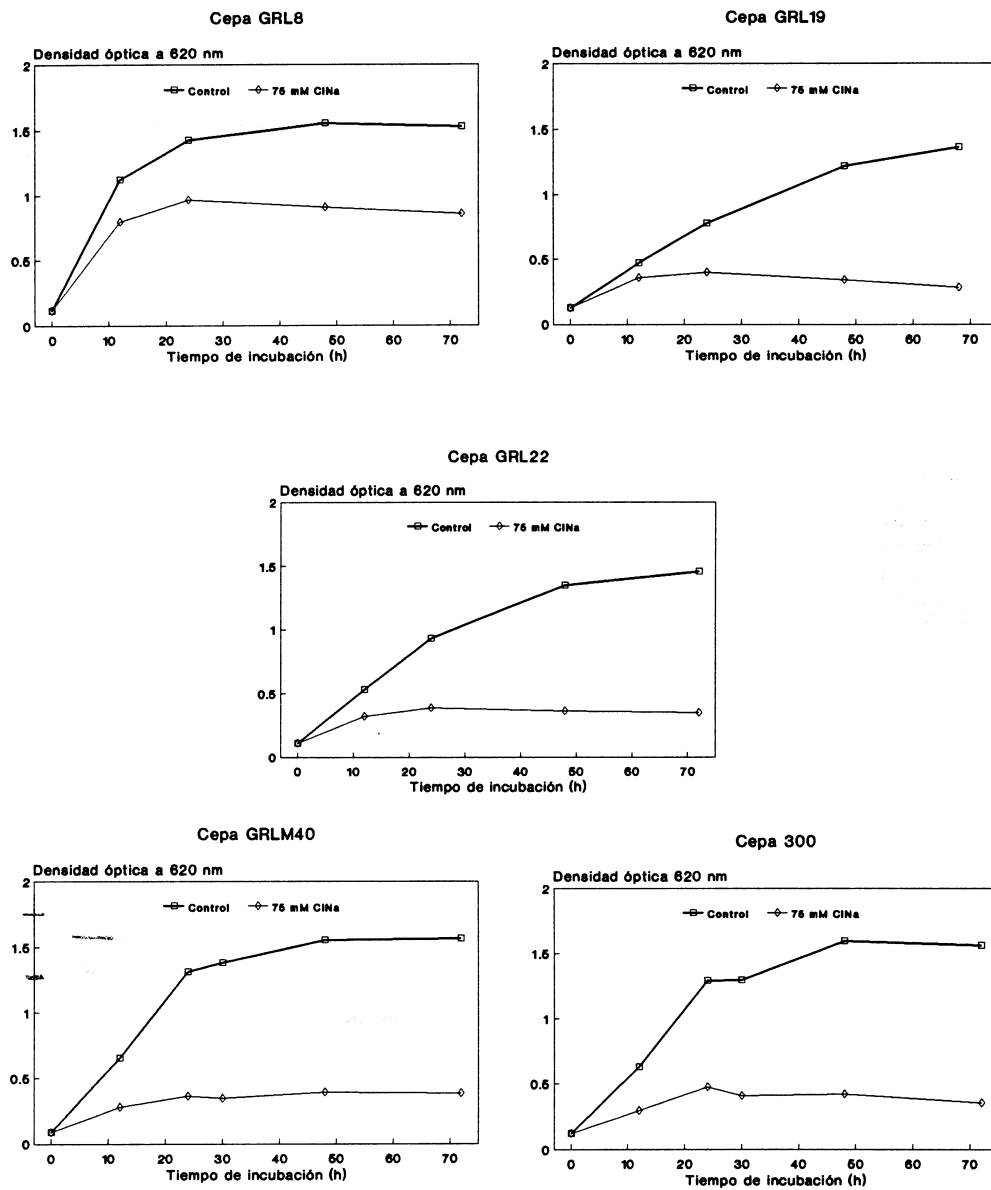


Figura 1.1.B. Curvas de crecimiento, en D.O. a 620 nm, de distintas cepas de *R. leguminosarum* biovar. *viceae*, en presencia de 0 y 75 mM de NaCl.

**Tabla 1.1.** D.O. a 620 nm, expresada en % respecto del control, de distintas cepas de *R. leguminosarum* biovar. *viceae* crecidas en presencia de 75 mM de NaCl durante 48 h.

Cepa	%	Cepa	%	Cepa	%
GRC20	22	GRI7	34	GRL8	58
GRC37	24	GRI24	11	GRL19	28
300	26	GRI32	74	GRL22	27
GRA19	68			GRLM40	25

### 2. CRECIMIENTO DE *Rhizobium leguminosarum* GRA19 CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NaCl EN EL MEDIO

El crecimiento se evaluó por medida de la D.O. a 620 nm y recuento de células viables/ml; los resultados se muestran en la figura 1.1. En función de la D.O., el perfil de crecimiento obtenido en presencia de 50 mM de NaCl coincide con el obtenido para el control. Si al medio de crecimiento se adicionan concentraciones de 75 y 100 mM, se detecta una disminución en la pendiente de la fase logarítmica que entra en estacionaria al mismo tiempo de cultivo (24 h) que el control y por tanto, con valores máximos de crecimiento mucho menores que este.

El número de células viables disminuye respecto al control en todas las concentraciones de NaCl ensayadas. En la primera medida, realizada a las 6 h de crecimiento, no se detecta efecto del NaCl, los primeros síntomas de inhibición se localizan a partir de las 12 h de cultivo. Con 50 mM de NaCl, esta inhibición se hace patente en un descenso de la pendiente de la fase logarítmica y un aumento de la transición a fase estacionaria hasta las 48 h. Con 75 y 100 mM se detecta un periodo, desde las 6 h hasta las 24 h en que apenas hay crecimiento, para continuar con una etapa de desarrollo logarítmico hasta 24 h después, momento a partir del cual el cultivo experimenta una muerte celular que se acentúa más cuanto mayor es la concentración de NaCl.

Como se observa en la figura 1.1, existen diferencias en el efecto del NaCl sobre el crecimiento de *R. leguminosarum* GRA19 según se estime la D.O. ó el número de células viables, lo que se explica porque las células muertas y los exopolisacáridos interfieren en las lecturas de turbidez.

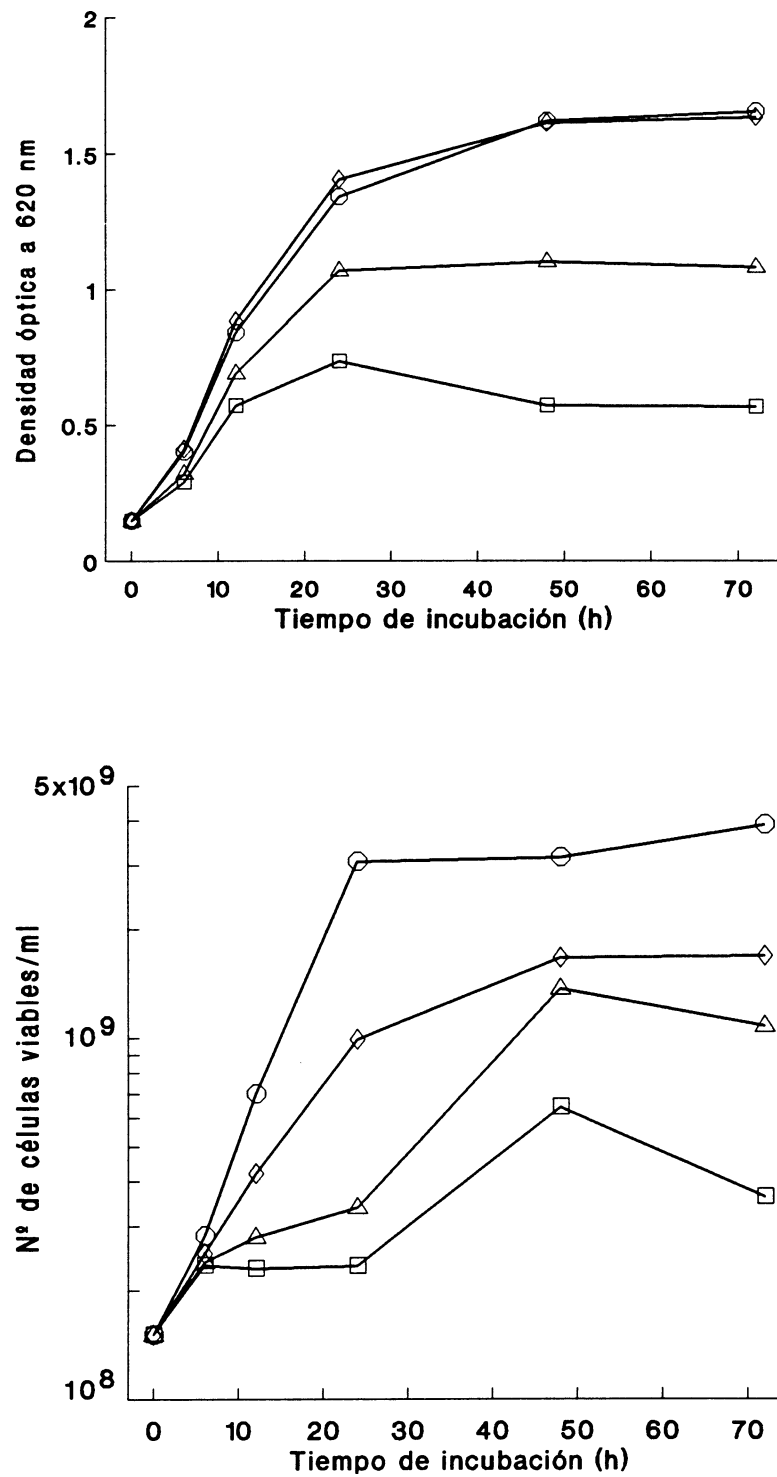
La tabla 2.1 presenta los valores de D.O. y número de células viables/ml,

## Resultados

expresados en % respecto al control, para las concentraciones de NaCl ensayadas y en el tiempo de crecimiento considerado, lo que permite visualizar mejor la tolerancia a la sal de la cepa estudiada. La D.O. desciende en función del tiempo en todos los cultivos tratados. A las 72 h de cultivo se detecta una disminución, no significativa para 50 mM, del 35% para 75 mM y del 65% para 100 mM de NaCl. El número de células viables presenta el valor mínimo a las 24 h de crecimiento en todos los tratamientos con NaCl, debido al retraso de 24 h que se produce en la llegada a fase estacionaria respecto al control.

**Tabla 2.1.** D.O. a 620 nm y número de células viables, expresadas en % respecto del control, de la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* crecida en presencia de distintas concentraciones de NaCl.

Horas de incubación	Concentración de NaCl (mM)					
	50		75		100	
	D.O.	Céls/ml	D.O.	Céls/ml	D.O.	Céls/ml
0	100	100	100	100	100	100
6	103	89	80	86	73	86
12	105	60	82	40	68	33
24	105	32	80	11	54	7
48	99	53	68	43	35	20
72	99	43	65	28	34	9



**Figura 2.1.** Curvas de crecimiento en D.O. a 620 nm (A) y número de células viables/ml (B), de la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, en presencia de distintas concentraciones de NaCl, 0 (○), 50 (◊), 75 (△) y 100 (◻) mM.

El tiempo de generación (Tab. 2.2) aumenta en presencia de NaCl, lo que indica la dificultad que encuentra la bacteria para crecer. Con 50 mM, se experimenta una duplicación del tiempo de generación y a su vez un descenso, aproximadamente a la mitad, de la población máxima; esto es debido a que la fase logarítmica dura lo mismo que en el cultivo control (12 h). Los resultados obtenidos para ambos parámetros cuando las bacterias crecieron con 75 mM de NaCl son parecidos a los obtenidos con 50 mM, sin embargo no son comparables a los obtenidos con 100 mM, donde el número de células viables desciende a la tercera parte y el tiempo de generación se triplica respecto al control. Se puede deducir que son necesarios incrementos de 50 mM de NaCl para que se detecten variaciones entre ambos parámetros respecto a concentraciones inferiores.

**Tabla 2.2.** Características culturales, tiempo de generación en h y número máximo de células viables/ml, de la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* crecida en presencia distintas concentraciones de NaCl.

Concentración de NaCl (mM)	Tiempo de generación (h)	Población máxima (cels · ml <sup>-1</sup> · 10 <sup>9</sup> )
0	5.20	3.17
50	10.10	1.67
75	11.94	1.37
100	16.25	0.64

La cepa GRA19 presenta un alto porcentaje de crecimiento en vida libre a 75 mM de NaCl, esto junto a sus características de efectividad, infectividad y competitividad (Hervás, 1991), condicionó su elección para los estudios posteriores.

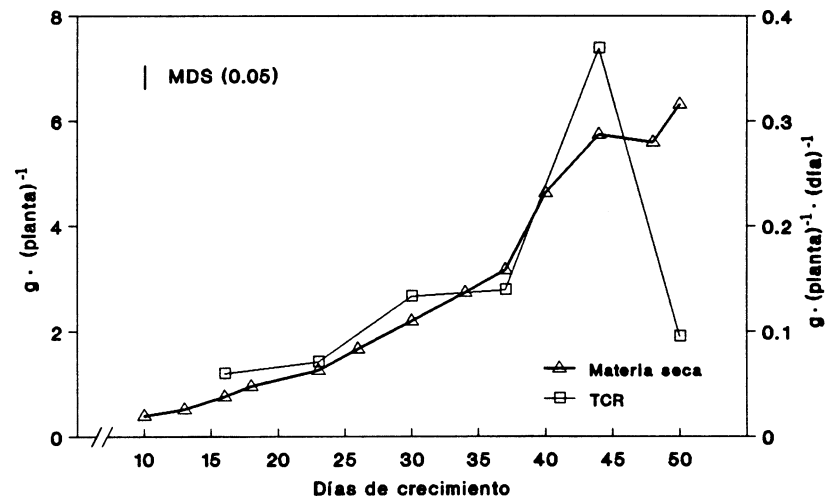
## CARÁCTERIZACIÓN DEL CICLO DE LA GLUTAMATO SINTASA EN NÓDULOS DE *V. faba*

### 3. DESARROLLO ONTOGENÉTICO DE LA ACTIVIDAD NITROGENASA Y DE LAS ACTIVIDADES DEL CICLO DE LA GLUTAMATO SINTASA EN NÓDULOS DE *V. faba*

Las plantas de *V. faba* cv. Alborea, entran en periodo reproductor a los 34 días de cultivo, momento en que empiezan a ser visibles los botones florales. A los 40 días, se inicia floración y a los 44 aparecen vainas, es decir, se inicia fructificación.

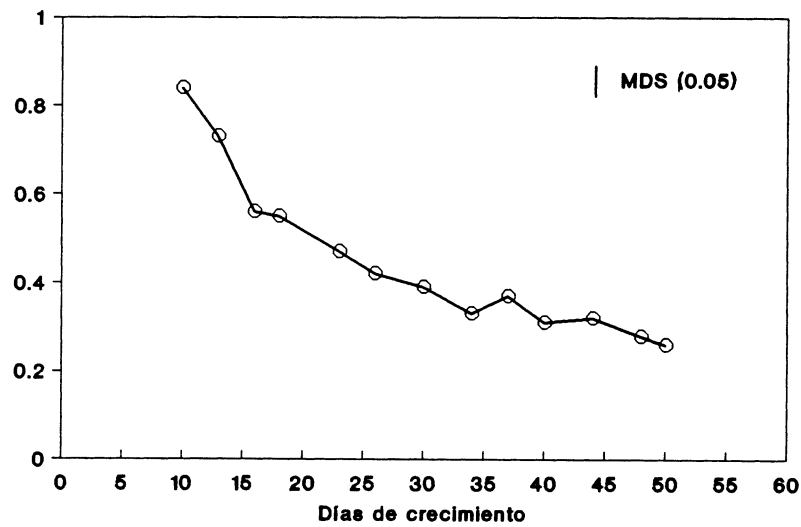
#### 3.1. Crecimiento y nodulación

El peso seco de la planta (Fig. 3.1), aumenta linealmente hasta el día 37 de cultivo, continúa con un fuerte incremento hasta el día 44 y a partir de este momento se estabiliza. La evolución del crecimiento relativo, representado en la misma figura, muestra que efectivamente entre los días 37 y 44 es cuando las plantas crecen más rápidamente y que existe otra etapa de características similares, menos acentuada, entre los días 23 y 30. A partir de los 44 días, la tasa de crecimiento relativo disminuye de forma drástica.



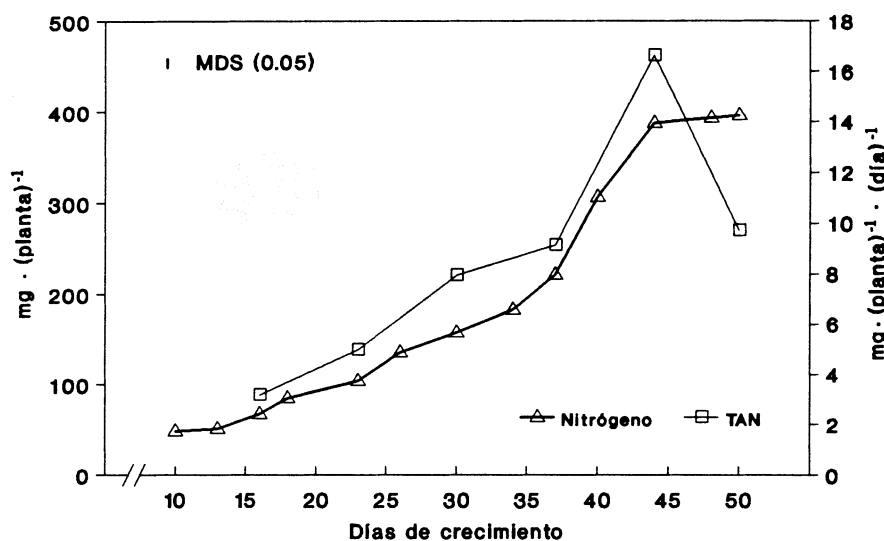
**Figura 3.1.** Evolución de la acumulación de materia seca, expresada en  $\text{g} \cdot (\text{planta})^{-1}$  y tasa de crecimiento relativo, expresada en  $\text{g} \cdot (\text{planta})^{-1} \cdot (\text{día})^{-1}$ , de plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, durante 50 días de cultivo.

La relación peso seco de raíz/parte aérea (R/PA) (Fig. 3.2) disminuye a lo largo del periodo de crecimiento considerado; sin embargo, se pueden distinguir tres etapas, una disminución inicial muy rápida hasta el día 16 de cultivo, una segunda etapa entre los días 16 y 34, que se caracteriza por una disminución continua menos acusada y por último, desde el día 34 hasta el final se puede hablar de una fase estabilizada.



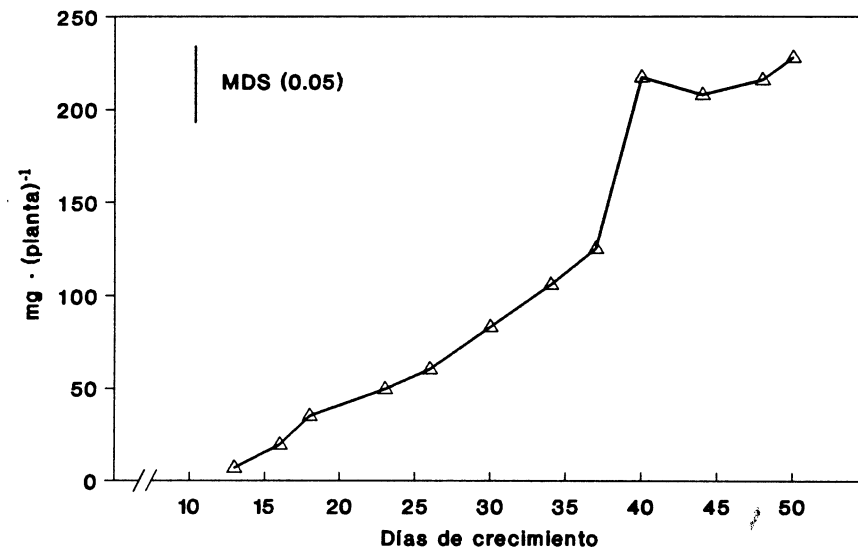
**Figura 3.2.** Evolución de la relación raíz/parte aérea de plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, durante 50 días de cultivo.

El contenido en nitrógeno reducido (Fig. 3.3) presenta una evolución parecida a la materia seca (Fig. 3.1), con tres etapas igualmente delimitadas; se detecta un incremento lineal hasta los 37 días, seguido de un fuerte estímulo hasta los 44 días y a partir de ahí, se mantiene constante. La tasa de adquisición de nitrógeno experimenta dos etapas de incremento, una durante los 30 días primeros de cultivo y otra entre los 37 y 44 días, separadas por una etapa de estabilización. A partir de los 44 días la tasa de adquisición de nitrógeno cae bruscamente a valores cercanos a 0.

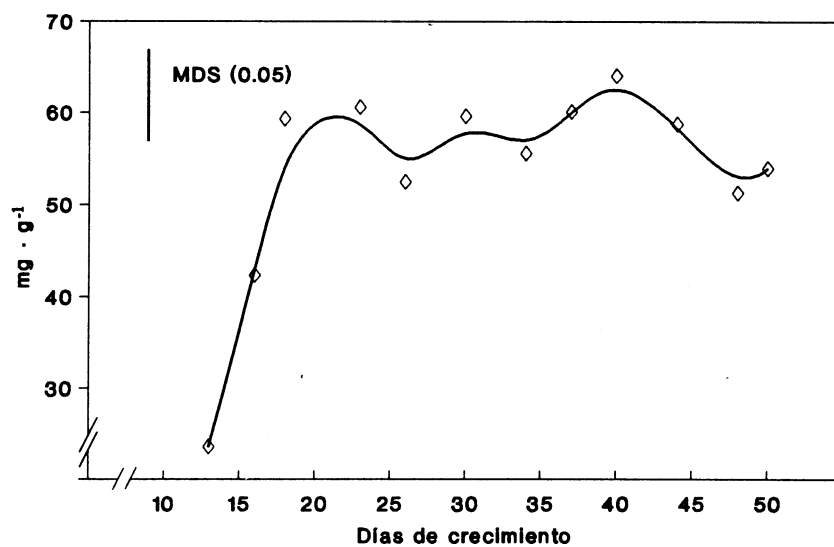


**Figura 3.3.** Evolución del contenido en nitrógeno reducido, expresado en  $\text{mg N} \cdot (\text{planta})^{-1}$  y tasa de adquisición de nitrógeno, expresada en  $\text{mg N} \cdot (\text{planta})^{-1} \cdot (\text{día})^{-1}$ , de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, durante 50 días de cultivo.

Los nódulos empezaron a ser visibles 10 días después de la inoculación, pero no pudieron ser aislados hasta los 13 días. A partir de este momento, la masa nodular experimentó un incremento constante llegando a alcanzar valores de  $125 \text{ mg} \cdot (\text{planta})^{-1}$  a los 37 días de cultivo (Fig. 3.4). Entre los días 37 y 40, el crecimiento de los nódulos resultó fuertemente estimulado ( $P \leq 0.05$ ), con niveles de  $217 \text{ mg} \cdot (\text{planta})^{-1}$ , es decir un incremento del 74% respecto al muestreo anterior. A partir del día 40 la masa nodular no experimentó cambios significativos ( $P \leq 0.05$ ). Por otra parte, el peso normalizado de nódulos (Fig. 3.5) que relaciona la masa nodular con el crecimiento de la parte aérea, aumenta durante los primeros 18 días, para mantenerse sin cambios significativos ( $P \leq 0.05$ ) hasta el final del cultivo.



**Figura 3.4.** Evolución del peso seco de nódulos, expresado en  $\text{mg} \cdot (\text{planta})^{-1}$ , de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, durante 50 días de cultivo. A los 10 días de crecimiento no se pueden aislar nódulos.

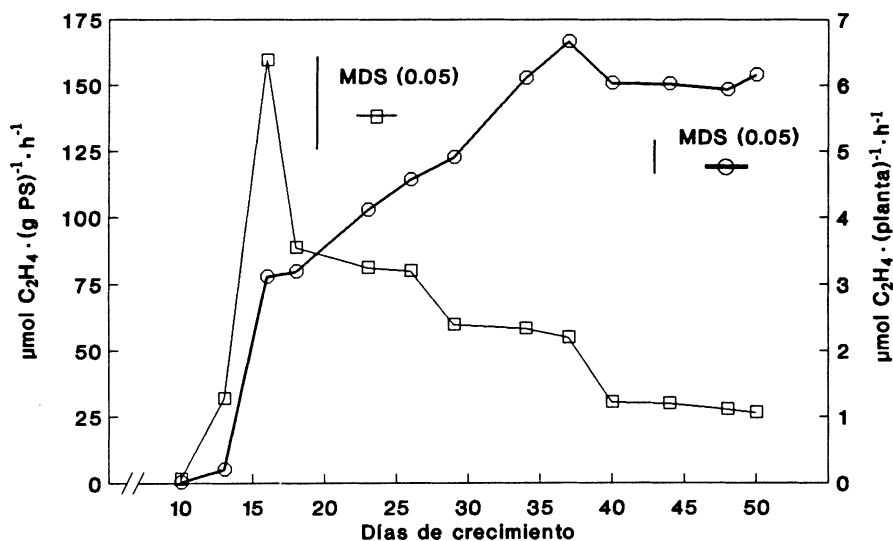


**Figura 3.5.** Evolución del peso normalizado de nódulos, expresado en  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , de plantas de *V. faba* L. cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, durante 50 días de cultivo.

### **3.2. Actividades de la nitrogenasa: Eficiencia relativa**

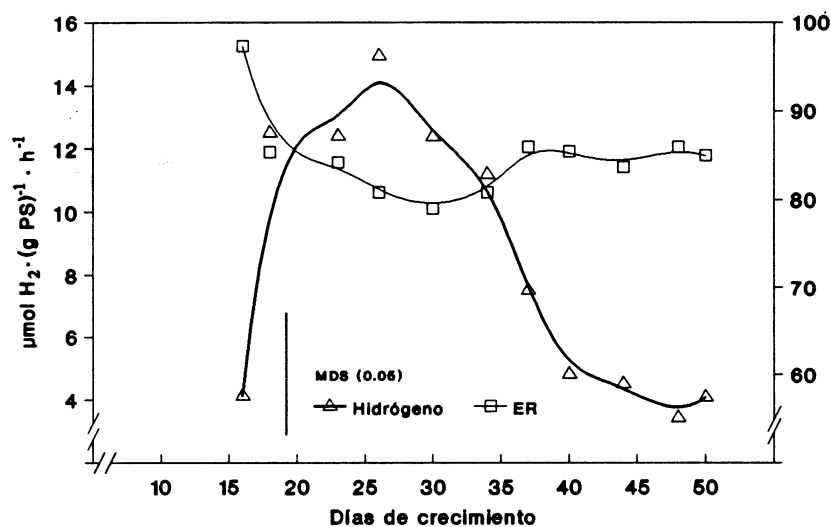
La evolución de la actividad nitrogenasa, valorada mediante el test de reducción de acetileno (ARA) y expresada en  $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot (\text{g PS})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (actividad específica), se representa en la figura 3.6. A los 16 días de cultivo alcanza el valor máximo,  $159 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot (\text{g PS})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  tras un brusco incremento desde el inicio, para disminuir después de forma escalonada, distinguiéndose tres mesetas o periodos en que la actividad específica se estabiliza después de un descenso (con actividades de 83, 58 y  $28 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot (\text{g PS})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  para cada una de las tres mesetas observadas). Esta disminución es lógica, puesto que, el fotosintato no sería suficiente para mantener elevada ARA específica con grandes masas nodulares.

Cuando la ARA se expresa en  $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot (\text{planta})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (Fig. 3.6) se observan tres fases bien diferenciadas en la curva. Después de un fuerte incremento entre los días 13 y 16 que coincide con el pico de ARA específica, la actividad aumenta progresivamente separándose cada vez más de la curva de ARA específica hasta el día 37 de cultivo, en que se obtiene la máxima actividad. Finalmente tras un leve descenso que coincide con inicio de floración (40 días) la actividad se estabiliza.



**Figura 3.6.** Evolución de la actividad reductora de acetileno, expresada en  $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot (\text{g PS})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  ( $\oplus$ ) y en  $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot (\text{planta})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  ( $\ominus$ ), en nódulos de plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, durante 50 días de cultivo.

En la figura 3.7 se muestra la producción de hidrógeno en aire por la nitrogenasa y la eficiencia relativa. Se puede observar que la producción de  $\text{H}_2$  incrementa fuertemente hasta el día 18 de cultivo, permaneciendo constante durante los 16 días siguientes. Entre los días 34 y 40 disminuye para estabilizarse a partir de ahí. Es decir, no existe correlación entre ARA y producción de  $\text{H}_2$  en plantas de *V. faba* noduladas por *R. leguminosarum* GRA19. En cuanto a la eficiencia relativa (ER) hay que destacar que en general fue bastante alta, con valores superiores al 80% durante todo el periodo de cultivo, detectándose el máximo valor en el punto de máxima actividad ARA específica.



**Figura 3.7.** Evolución de la producción de hidrógeno en aire por la nitrogenasa, expresada en  $\mu\text{mol H}_2 \cdot (\text{g PS})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  y de la eficiencia relativa de la fijación de nitrógeno, en nódulos de *V. faba* cv. Alborea inoculada con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, durante 50 días de cultivo.

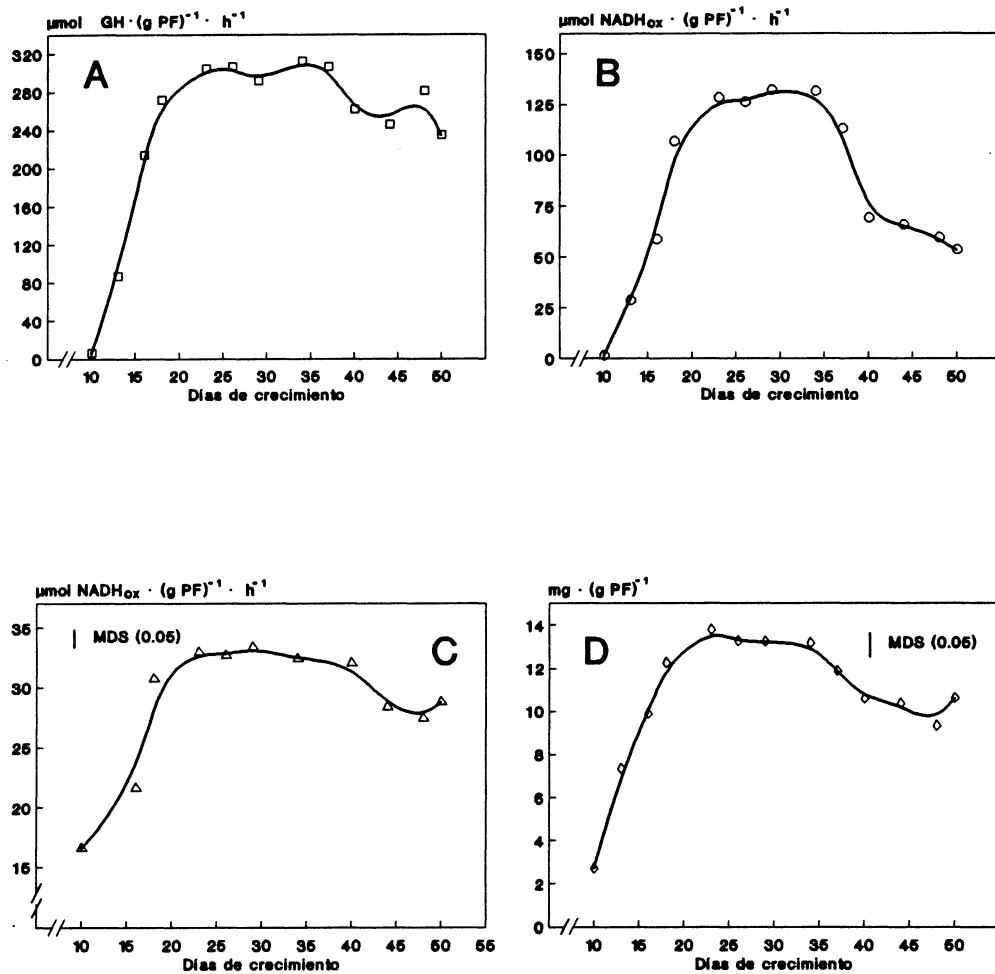
### 3.3. Actividades enzimáticas de la fracción vegetal de los nódulos

Como se puede observar los perfiles de las actividades GS y NADH-GOGAT (Fig. 3.8, A y B) incrementan rápidamente con el desarrollo de los nódulos de igual forma que la nitrogenasa de los mismos (Fig. 3.6), aunque su evolución muestra apreciables diferencias entre sí. A los 23 días de crecimiento las actividades GS/NADH-GOGAT han alcanzado su máximo valor mientras que la ARA específica lo alcanza 7 días antes, momento en que la GS es el 89% de su máximo y la NADH-GOGAT el 45.34%, indicando un retraso o un desfase en el desarrollo de estas actividades. La actividad GS se mantiene con valores muy altos durante todo el periodo del desarrollo considerado, mientras que la NADH-GOGAT, tras un periodo de máxima actividad en torno a  $129 \mu\text{mol NADH}_{\text{ox}} \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  entre los días 23 y 34, disminuye considerablemente (52%) hasta el final del cultivo. Por tanto, el retraso inicial junto con el descenso final de la actividad NADH-GOGAT respecto a la GS indica que en *V. faba* la

NADH-GOGAT sería la actividad limitante del proceso de asimilación de amonio. Las actividades GS y NADH-GOGAT de los nódulos de *V. faba* parecen estar más relacionadas con la capacidad de la planta para fijar el nitrógeno (ARA por planta) que con la actividad específica de los mismos como se refleja en la matriz de correlaciones (Tab. 3.1).

La actividad NADH-GDH puede suponer otra ruta de la asimilación del amonio. Esta actividad presenta valores máximos 9.5 y 4 veces inferiores que la GS y NADH-GOGAT respectivamente, con un perfil de evolución similar (Fig. 3.8, C). No obstante, resulta curioso que el valor inicial de esta actividad, cuando hay gran cantidad de tejido radical, es significativamente superior que las otras dos actividades; sin embargo, dicha actividad incrementa sólo 2 veces frente a las 54 y 101 veces que incrementaron la GS y la NADH-GOGAT respectivamente (Fig. 3.8, A y B).

El estudio del contenido en proteína soluble a lo largo del período de cultivo (Fig. 3.8, C) mostró un perfil que coincide con el encontrado para las actividades enzimáticas, con un incremento progresivo desde el inicio del cultivo hasta los 23 días, momento en que se estabiliza con valores máximos [ $\approx 13 \text{ mg} \cdot (\text{g PF})^{-1}$ ] hasta los 34 días, después de bajar hacia el día 37 se estabiliza con valores entorno a  $10 \text{ mg} \cdot (\text{g PF})^{-1}$  hasta el final del cultivo.



**Figura 3.8.** Evolución de las actividades enzimáticas, GS, expresada en  $\mu\text{mol } \gamma\text{GH} \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (A), NADH-GOGAT, expresada en  $\mu\text{mol NADH}_{\text{ox}} \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (B), NADH-GDH, expresada en  $\mu\text{mol NADH}_{\text{ox}} \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (C) y contenido en proteína soluble, expresado en  $\text{mg} \cdot (\text{g PF})^{-1}$  (D), de nódulos de plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, durante 50 días de cultivo. La muestra de material vegetal del día 10 estaba constituida por trozos de raíz en que eran visibles los nódulos. MDS (0.05): 2.36 (A); 7.75 (B)

**Tabla 3.1.** Matriz de correlación simple entre variables determinadas, en plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, durante 50 días de cultivo. Las variables son: PSP, peso seco por planta; RPA, relación raíz/parte aérea; PSN, peso seco de nódulos; PNN, peso normalizado de nódulos; ARA, actividad específica de la nitrogenasa; ARAP, ARA por planta; GS, glutamina sintetasa; GG, glutamato sintasa; GDH, glutamato deshidrogenasa; PRT, contenido en proteína soluble; NIT, contenido en nitrógeno orgánico.

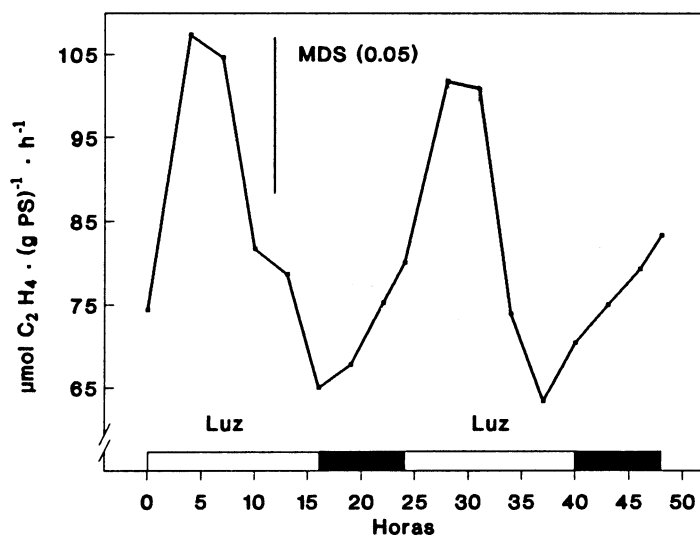
	PSP	RPA	PSN	PNN	ARA	ARAP	GS	GG	GDH	PRT	NIT
PSP	1.000										
RPA	-0.821	1.000									
PSN	0.987	-0.843	1.000								
PNN	0.484	-0.844	0.544	1.000							
ARA	-0.444	0.039	-0.429	0.284	1.000						
ARAP	0.770	-0.973	0.804	0.844	-0.108	1.000					
GS	0.366	-0.816	0.419	0.941	0.370	0.833	1.000				
GG	-0.054	-0.492	-0.002	0.749	0.422	0.541	0.866	1.000			
GDH	0.346	-0.763	0.414	0.906	0.152	0.770	0.921	0.878	1.000		
PRT	0.148	-0.657	0.194	0.893	0.469	0.658	0.936	0.934	0.912	1.000	
NIT	0.997	-0.819	0.985	0.485	-0.443	0.769	0.376	-0.500	0.346	0.145	1.000

#### 4. EVOLUCIÓN EN EL FOTOPERIODO DEL CICLO DE LA GLUTAMATO SINTASA EN NÓDULOS FIJADORES DE NITRÓGENO DE *Vicia faba*

##### 4.1. Actividad nitrogenasa

La ARA específica (Fig. 4.1) mostró un pico de actividad máxima [ $\approx 105 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot (\text{g PS})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ] en ambos periodos de luz. Al inicio del fotoperiodo, 0 h, la ARA presentó valores de  $74 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot (\text{g PS})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , 4 h después alcanza el máximo, que se mantienen hasta las 7 h. A partir de éste momento decae rápidamente y al inicio del nictiperiodo (16 h) alcanza niveles mínimos que suponen el 91% de los iniciales y el 64% de los máximos. Estos niveles se mantienen durante 3 h, para pasar a una fase de incremento, más suave que el producido durante el fotoperiodo, en la que se alcanza una actividad de  $80 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot (\text{g PS})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  exactamente al inicio del nuevo día. A partir de este momento hay un incremento brusco y sólo en 4 h se alcanza el máximo valor, siguiendo de esta forma unas pautas de comportamiento idénticas a las descritas para las primeras 24 h.

Dado que a lo largo de 48 h las diferencias en la masa nodular son mínimas, la actividad  $\text{ARA} \cdot (\text{planta})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , daría un perfil semejante al de la figura 4.1.



**Figura 4.1.** Evolución en el foto- y nictiperiodo de la actividad reductora de acetileno, expresada en  $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot (\text{g PS})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , de nódulos de plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*.

#### 4.2. Actividades enzimáticas de la fracción vegetal de los nódulos

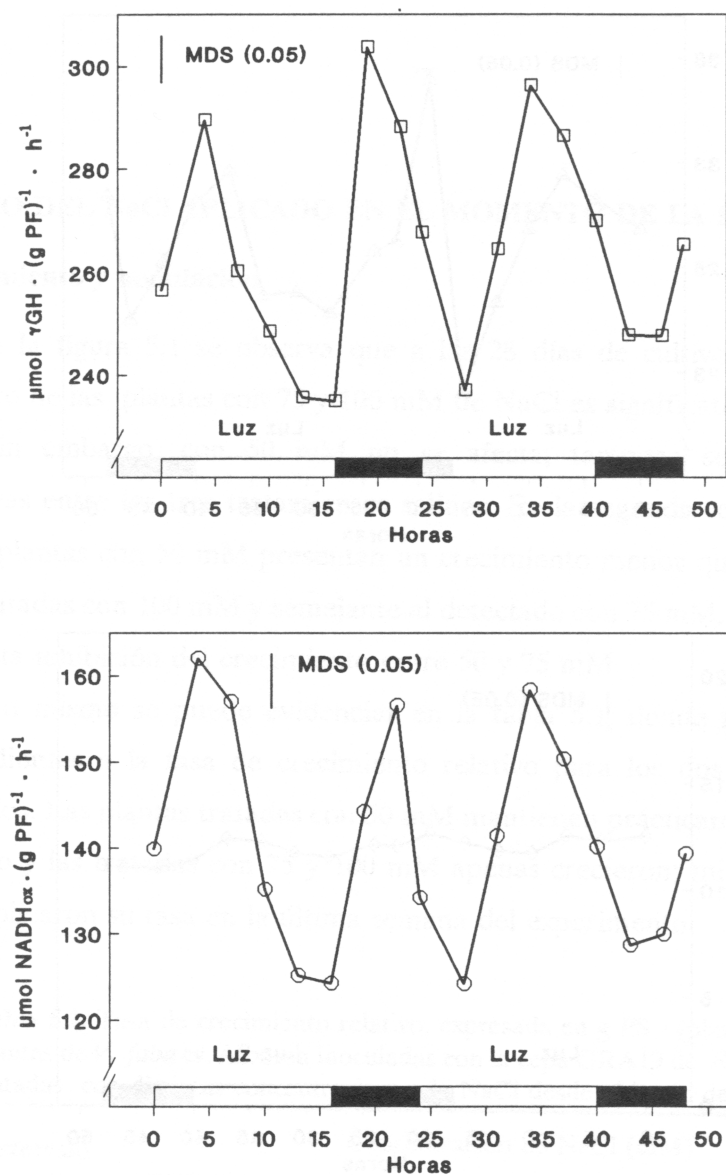
Las actividades del ciclo de la glutamato sintasa (Fig. 4.2) mostraron un comportamiento semejante a lo largo del periodo de ensayo. Al inicio del fotoperiodo, 0 h, las actividades son de  $256 \mu\text{mol } \gamma\text{GH} \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  para la GS y de  $140 \mu\text{mol NADH}_{\text{ox}} \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  para la NADH-GOGAT. A las 4 h, se produce un incremento del 13% en la actividad GS y del 16% en la NADH-GOGAT, iniciándose inmediatamente, una etapa de descenso que culmina 13 h después, con inhibiciones de actividad respecto a la inicial del 6% en GS y del 13% en NADH-GOGAT, inhibiciones que se mantienen hasta las 16 h, inicio del nictiperiodo. A partir de ese momento, se produce un incremento de actividad de igual magnitud que el detectado al inicio del fotoperiodo. Ese aumento, se produce entre 3 y 6 h después de entrar en periodo de oscuridad, para pasar a una etapa de descenso de ambas actividades con valores mínimos 4 h después del inicio del segundo fotoperiodo y con inhibiciones idénticas a las

mencionadas anteriormente para el primer descenso de actividad (6% y 13% respectivamente). Después de 6 h se produce, de nuevo, otro pico de actividad máxima, que empieza a caer hasta valores mínimos 9 h después ya en oscuridad, se mantiene en estos valores durante 3 h y de nuevo empieza a subir.

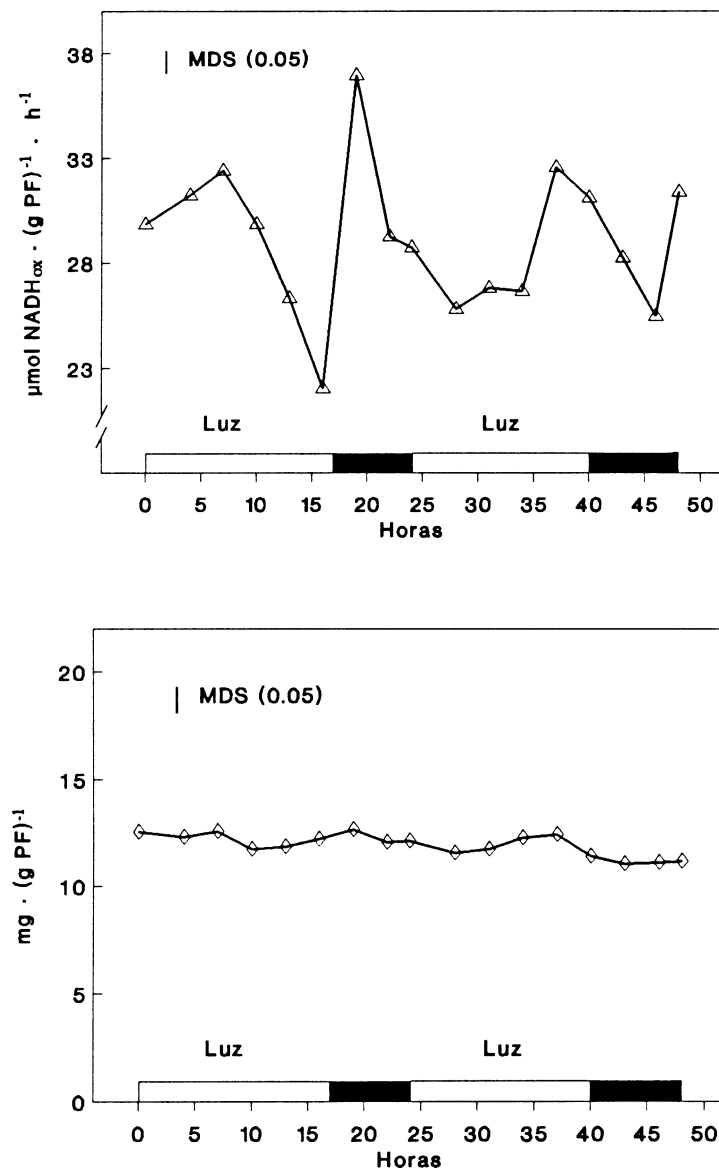
La aparición de tres picos de máxima actividad a lo largo de 48 h es un comportamiento cíclico para las enzimas del ciclo de la glutamato sintasa. El ciclo se repite cada 16 h. Es importante destacar que la amplitud de las oscilaciones en actividad a lo largo del ciclo es mucho más acentuada para la NADH-GOGAT que para la GS.

La actividad NADH-GDH (Fig. 4.3 A) presentó un comportamiento cíclico, pero con una evolución distinta respecto a las enzimas del ciclo de la glutamato sintasa. Entre picos de actividad máxima se suceden periodos alternativos de 12 y 18 h, sin embargo entre puntos de mínimo valor se suceden intervalos iguales de 12 h, debido a que hay un momento del ciclo en que la actividad se mantiene 6 h con valores mínimos. Los picos de actividad máxima no son siempre iguales, sino que se van alternando valores que se inhiben o estimulan un 12% respecto al máximo anterior.

La determinación de proteína (Fig. 4.3 B) no mostró oscilaciones significativas a lo largo de 48 h, pero hubo una tendencia a disminuir en el tiempo, con valores que varían de 12.5 a 11 mg · (g PF)<sup>-1</sup>.



**Figura 4.2.** Evolución en el foto- y nictiperiodo de las actividades enzimáticas, GS, expresada en  $\mu\text{mol } \gamma\text{GH} \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (A) y NADH-GOGAT, expresada en  $\mu\text{mol NADH}_{\text{ox}} \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (B), de nódulos de plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*.



**Figura 4.3.** Evolución en el foto- y nictiperiodo de la actividad enzimática NADH-GDH, expresada en  $\mu\text{mol NADH}_{\text{ox}} \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (A) y contenido en proteína soluble, expresada en  $\text{mg} \cdot (\text{g PF})^{-1}$  (B), de nódulos de plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*.

## **EFEECTO DEL ESTRÉS SALINO EN LA SIMBIOSIS DE *Vicia faba***

### **III**

### **5. EFECTO DEL NaCl APLICADO EN EL MOMENTO DE LA INOCULACIÓN**

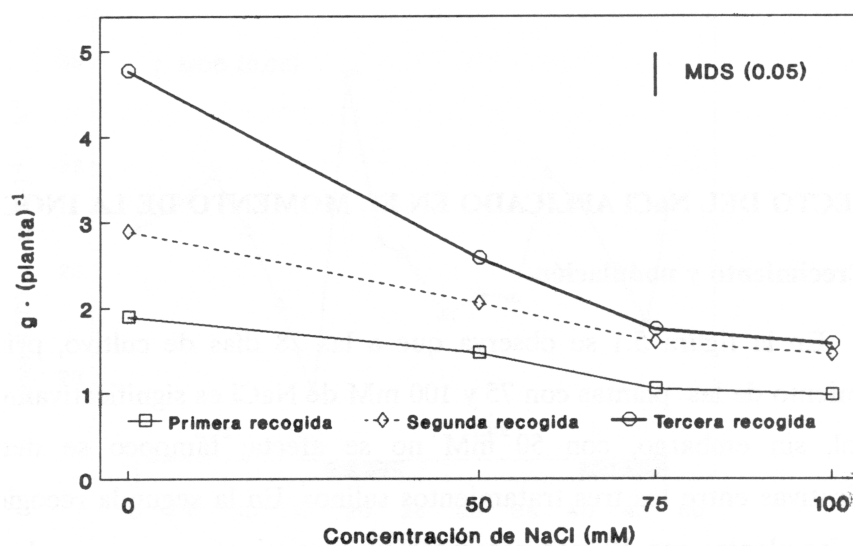
#### **5.1. Crecimiento y nodulación**

En la figura 5.1 se observa que a las 28 días de cultivo, primera recogida, el crecimiento de las plantas con 75 y 100 mM de NaCl es significativamente menor que el control, sin embargo, con 50 mM no se afecta; tampoco se detectan diferencias significativas entre los tres tratamientos salinos. En la segunda recogida, siete días más tarde, las plantas con 50 mM presentan un crecimiento menor que los controles, mayor que las tratadas con 100 mM y semejante al detectado con 75 mM. En la tercera recogida sí se detecta inhibición del crecimiento entre 50 y 75 mM.

Esto mismo se puede evidenciar en la tabla 5.1, donde se muestran los datos correspondientes a la tasa de crecimiento relativo para los dos intervalos de tiempo considerados. Las plantas tratadas con 50 mM mantienen prácticamente la misma tasa de crecimiento y las tratadas con 75 y 100 mM apenas crecieron; mientras que las plantas control duplicaron su tasa en la última semana del experimento.

**Tabla 5.1.** Tasa de crecimiento relativo, expresada en  $\text{g PS} \cdot (\text{planta})^{-1} \cdot (\text{día})^{-1}$ , de plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, tratadas con distintas concentraciones de NaCl desde el inicio del cultivo.

Intervalo (días)	Concentración de NaCl (mM)			
	0	50	75	100
28 - 35	0.143	0.083	0.076	0.070
35 - 42	0.269	0.072	0.021	0.016



**Figura 5.1.** Acumulación de materia seca, expresada en  $\text{g} \cdot (\text{planta})^{-1}$ , de plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, tratadas con distintas concentraciones de NaCl desde el inicio del cultivo.

Otro parámetro relacionado con el crecimiento vegetativo es la relación R/PA cuyos resultados se muestran en la tabla 5.2. Se puede observar que esta relación incrementa en plantas tratadas con NaCl, sin embargo no se aprecian diferencias entre concentraciones (test de Tuckey,  $P \leq 0.05$ ). El incremento en la relación R/PA indica que la sal afecta más al crecimiento de la parte aérea que al del sistema radical.

**Tabla 5.2.** Relación peso seco de raíz/parte aérea de plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, tratadas con distintas concentraciones de NaCl desde el inicio del cultivo.

Recogida	Concentración de NaCl (mM)			
	0	50	75	100
Primera	0.40	0.57	0.50	0.51
Segunda	0.38	0.52	0.43	0.52
Tercera	0.40	0.55	0.53	0.53
MDS (0.05)				0.08

La disminución del crecimiento de la planta se hace patente visualmente desde la primera recogida, por un acortamiento de los entrenudos, mucho más acentuado cuanto mayor es la concentración de NaCl y por una disminución en el tamaño de las hojas que además se tornan cloróticas (Fig. 5.2).



**Figura 5.2.** Aspecto de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, tratadas con distintas concentraciones de NaCl desde el inicio del cultivo.

El contenido en nitrógeno reducido por planta, que se determinó en la segunda recogida, tabla 5.3, resultó fuertemente afectado por el tratamiento salino, siendo este efecto mayor que el observado para el crecimiento. La disminución del contenido en nitrógeno reducido fue de un 35, 48 y 58% para las plantas tratadas con 50, 75 y 100 mM de NaCl, respectivamente.

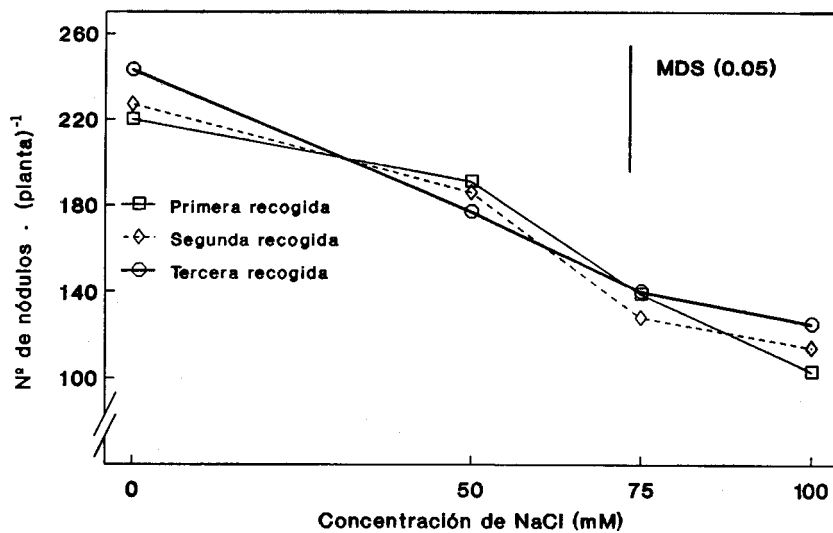
**Tabla 5.3.** Contenido en nitrógeno reducido, expresado en  $\text{mg N} \cdot (\text{planta})^{-1}$ , de plantas de *V. faba* de 35 días, inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, tratadas con distintas concentraciones de NaCl desde el inicio del cultivo.

Tiempo de cultivo (días)	Concentración de NaCl (mM)			
	0	50	75	100
35	238.70	156.67	125.37	99.99
MDS (0.05)			14.64	

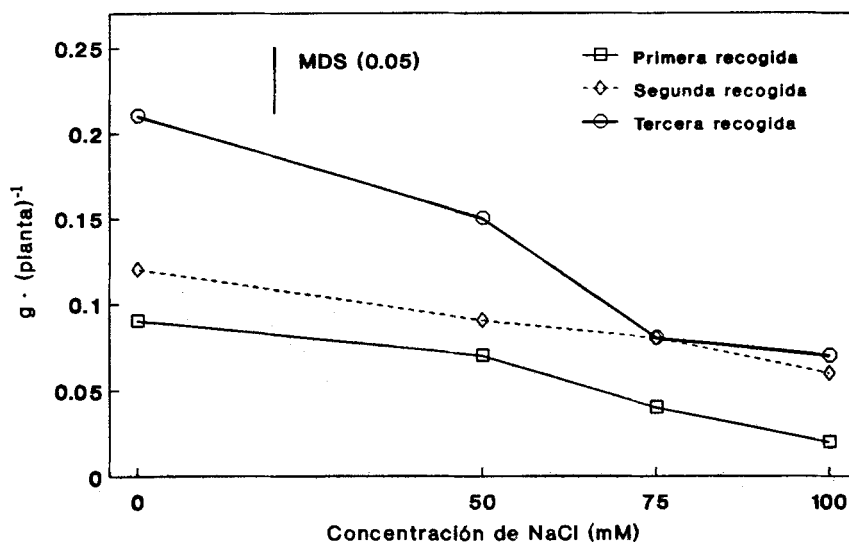
El número de nódulos por planta (Fig. 5.3) está condicionado por el tratamiento con NaCl, responsable del 93% ( $P \leq 0.001$ ) del efecto observado. A los 28 días de cultivo, la nodulación está prácticamente establecida en todos los tratamientos. El número de nódulos disminuye proporcionalmente al nivel de sal aplicado hasta 75 mM ( $P \leq 0.05$ ), con 100 mM sólo se observó un escaso efecto adicional no significativo. La inhibición de la nodulación fue del 20, 36 y 52% para los tratamientos de 50, 75 y 100 mM de NaCl, respectivamente. Es interesante indicar que esta disminución, en plantas con 50 mM de, sólo es significativa en la última recogida.

El peso seco de nódulos se expone en la figura 5.4. Con 50 mM de NaCl se afectó sólo al final del cultivo, sin embargo, con 75 y 100 mM se produjo una disminución significativa desde la primera recogida. Entre 50 y 75 mM

aparecieron diferencias en la última recogida, mientras que entre 75 y 100 mM no se observaron.



**Figura 5.3.** Número de nódulos de plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, tratadas con distintas concentraciones de NaCl desde el inicio del cultivo.



**Figura 5.4.** Peso seco de nódulos, expresado en  $\text{g} \cdot (\text{planta})^{-1}$ , de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, tratadas con distintas concentraciones de NaCl desde el inicio del cultivo.

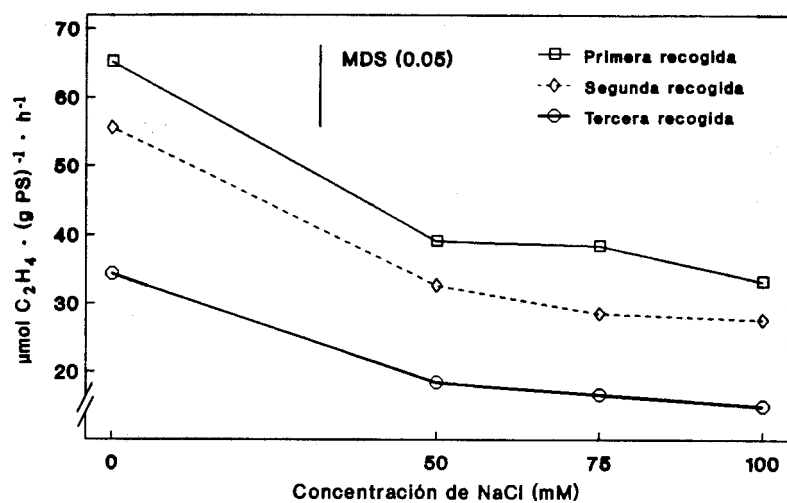
En el peso normalizado de nódulos, que relaciona el peso seco de los mismos con la parte aérea (Tab. 5.4), no se detectan diferencias entre las plantas tratadas con NaCl y las control, debido a que la sal afecta de igual forma al peso seco de la parte aérea y del nódulo.

**Tabla 5.4.** Peso normalizado de nódulos de plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, tratadas con distintas concentraciones de NaCl desde el inicio del cultivo.

Recogida	Concentración de NaCl (mM)			
	0	50	75	100
Primera	60.50	64.46	57.72	60.84
Segunda	68.32	63.88	59.00	68.33
Tercera	60.44	65.14	60.50	61.35
MDS (0.05)	14.07			

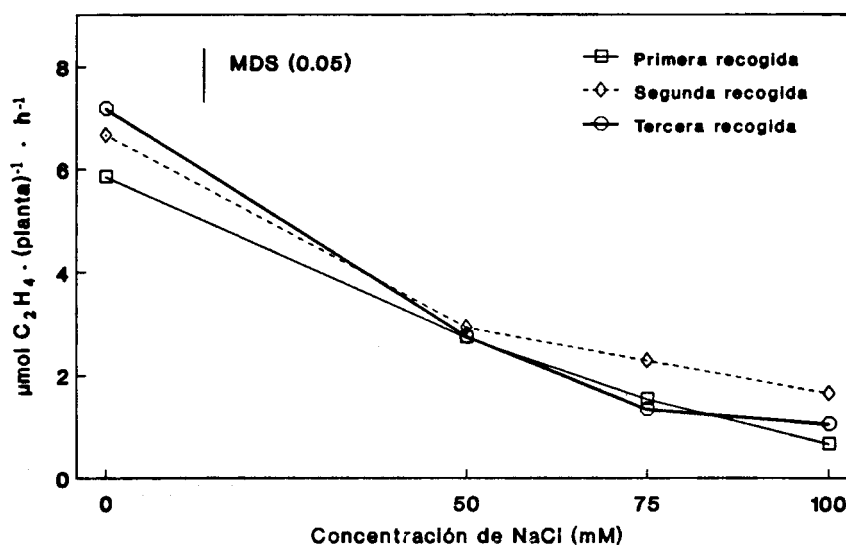
## 5.2. Actividad nitrogenasa

En la figura 5.5 se exponen los resultados de actividad nitrogenasa específica, valorada mediante el test de reducción de acetileno. La sal inhibió la actividad desde la primera recogida, sin que se detecten, en ningún momento, diferencias entre los tratamientos con 50, 75 y 100 mM de NaCl. A los 28 días de cultivo, todas las plantas tratadas presentaron una inhibición del 48%, obteniéndose valores de actividad que se mantienen estables 7 días después. Sin embargo, en la tercera recogida (42 días), la actividad se inhibió, de forma significativa, un 50% respecto a las determinaciones anteriores (test de Tuckey,  $P \leq 0.05$ ).



**Figura 5.5.** Actividad reductora de acetileno, expresada en  $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot (\text{g PS})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , de nódulos de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, tratadas con distintas concentraciones de NaCl desde el inicio del cultivo.

Cuando los resultados se expresan en ARA por planta (Fig. 5.6), la inhibición en los tratamientos salinos se hace significativa ( $P \leq 0.05$ ) desde la primera recogida, con valores que se mantienen hasta los muestreos finales. En todas las recogidas se aprecian diferencias ( $P \leq 0.05$ ) entre 50 mM y las concentraciones superiores, pero en ninguna entre 75 y 100 mM de NaCl.



**Figura 5.6.** Actividad reductora de acetileno, expresada en  $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot (\text{planta})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , en plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, tratadas con distintas concentraciones de NaCl desde el inicio del cultivo.

### 5.3. Actividades enzimáticas de la fracción vegetal de los nódulos

Las enzimas del ciclo de la glutamato sintasa fueron fuertemente inhibidas por la sal. La actividad GS presentó un 33% de inhibición en las plantas tratadas con 50 mM, un 58% con 75 mM y un 57% con 100 mM. La actividad NADH-GOGAT de los nódulos de *V. faba*, fue 2.5 veces inferior a la GS en los controles y presentó inhibiciones semejantes. La inhibición, altamente significativa, fue progresiva en todos los tratamientos. El contenido en proteína soluble de los nódulos también resultó significativamente afectado por la sal, especialmente con la mayor concentración ensayada, 100 mM. Sin embargo, no explica el efecto negativo sobre la actividad enzimática como se pone de manifiesto si se expresa esta actividad por unidad de proteína (Tab. 5.6), pudiéndose observar que se mantiene el efecto inhibitor sobre la actividad específica.

**Tabla 5.5.** Actividades GS, expresada en  $\mu\text{mol } \gamma\text{GH} \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  y NADH-GOGAT, expresada en  $\mu\text{mol NADH}_{\text{ox}} \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  y contenido en proteína soluble, expresado en  $\text{mg} \cdot (\text{g PF})^{-1}$ , de nódulos de plantas de *V. faba* de 35 días, inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, tratadas con distintas concentraciones de NaCl desde el inicio del cultivo.

Parámetro	Concentración de NaCl (mM)				MDS (0.05)
	0	50	75	100	
GS	306.42	250.00	246.14	135.58	5.27
GOGAT	124.35	84.52	64.92	36.13	3.57
Proteína	12.05	11.20	10.66	9.26	0.78

**Tabla 5.6.** Actividades GS, expresada en  $\mu\text{mol } \gamma\text{GH} \cdot (\text{min})^{-1} \cdot (\text{mg proteína})^{-1}$  y NADH-GOGAT, expresada en  $\mu\text{mol NADH}_{\text{ox}} \cdot (\text{min})^{-1} \cdot (\text{mg proteína})^{-1}$ , de nódulos de plantas de *V. faba* de 35 días, inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, tratadas con distintas concentraciones de NaCl desde el inicio del cultivo.

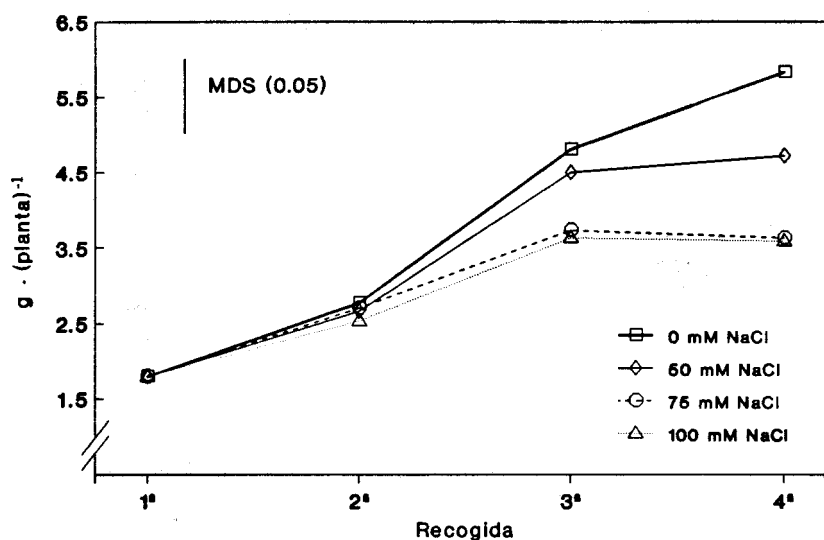
Parámetro	Concentración de NaCl (mM)			
	0	50	75	100
GS	0.424	0.372	0.380	0.240
GOGAT	0.172	0.126	0.108	0.065

## 6. EFECTO DEL NaCl APLICADO A SIMBIOSIS ESTABLECIDAS Y FIJADORAS DE NITRÓGENO

### 6.1. Crecimiento y nodulación

Siete días después de aplicar el NaCl a las plantas, la acumulación de materia seca no presentó diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) con ningún tratamiento salino (Fig. 6.1). A los 14 días, se detecta inhibición ( $P \leq 0.05$ ) con 75 y 100 mM de NaCl. En la última recogida, se obtienen disminuciones del 19% para 50 mM y del 38% para 75 y 100 mM.

Al comparar las figuras 5.1 y 6.1, se observa que el efecto de la sal sobre el crecimiento es más rápido cuando se aplica en pleno crecimiento vegetativo que cuando se aplica desde la siembra.



**Figura 6.1.** Acumulación de materia seca, expresada en  $\text{g} \cdot (\text{planta})^{-1}$ , de plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, tratadas con distintos niveles de NaCl tras 28 días de cultivo.

## Resultados

En la tabla 6.1 se expone la TCR, en la que se aprecia cómo en la segunda semana de tratamiento, 42 días, queda manifiesto una vez más el efecto del NaCl sobre el crecimiento de plantas de *V. faba*, llegando a detenerse prácticamente en la tercera semana.

**Tabla 6.1.** Tasa de crecimiento relativo, expresada en  $\text{g PS} \cdot (\text{planta})^{-1} \cdot (\text{día})^{-1}$ , de plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con al cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, tratadas con distintos niveles de NaCl tras 28 días de cultivo.

Intervalos (días)	Concentración de NaCl (mM)			
	0	50	75	100
28 - 35	0.148	0.123	0.129	0.104
35 - 42	0.291	0.263	0.147	0.157
42 - 50	0.146	0.031	0.014	0.006

La relación R/PA (Tab. 6.2), incrementa con la aplicación de sal, lo que implica un efecto negativo mayor en el desarrollo de la parte aérea que en el de la raíz.

**Tabla 6.2.** Relación peso seco de raíz/parte aérea de plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, tratadas con distintos niveles de NaCl tras 28 días de cultivo.

Días	Concentración de NaCl (mM)			
	0	50	75	100
0	0.44	-	-	-
7	0.39	0.48	0.46	0.49
14	0.37	0.49	0.44	0.49
21	0.30	0.39	0.50	0.43
MDS (0.05)		0.08		

El contenido en nitrógeno reducido en planta entera (Tab. 6.3) disminuyó significativamente desde el primer muestreo realizado, sin que se detecten diferencias entre las plantas tratadas con 50 y 75 mM hasta 7 días después. Tras 21 días de crecimiento en contacto con NaCl, se obtienen reducciones del 24% con 50 mM, del 40% con 75 mM y del 45% con 100 mM de NaCl.

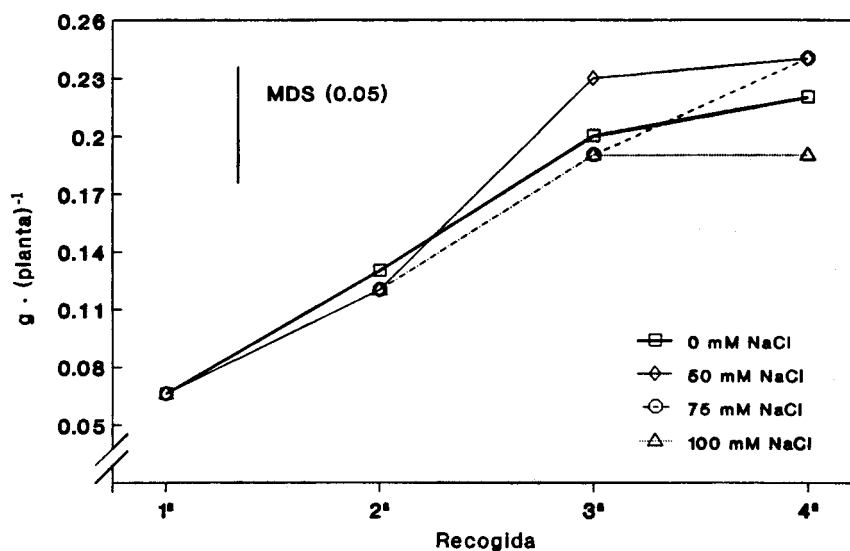
**Tabla 6.3.** Contenido en nitrógeno reducido, expresado en  $\text{mg} \cdot (\text{planta})^{-1}$ , de plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, tratadas con distintos niveles de NaCl tras 28 días de cultivo.

Días	Concentración de NaCl (mM)			
	0	50	75	100
0	158.20	-	-	-
7	228.19	216.48	216.09	170.31
14	348.61	279.37	249.65	194.26
21	415.47	315.36	249.80	229.98
MDS (0.05)		10.15		

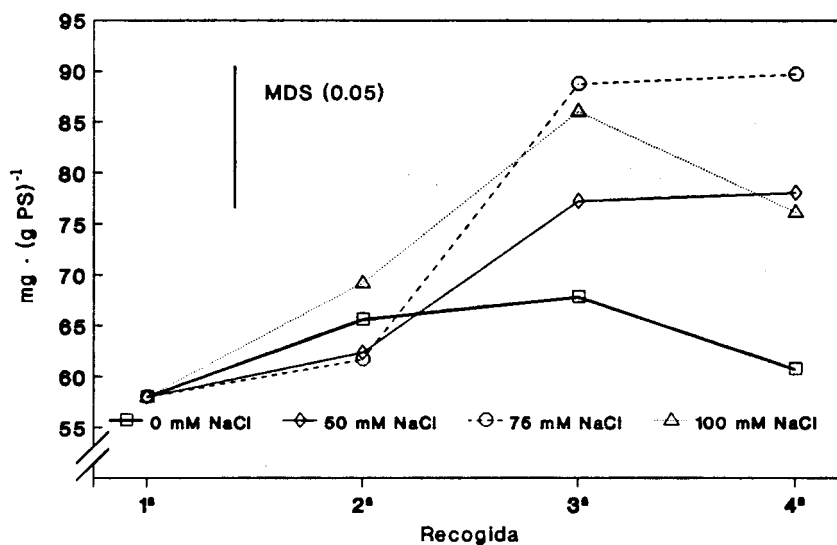
La aplicación de NaCl afectó poco el desarrollo nodular (Fig. 6.2), a diferencia de lo que ocurre con las plantas tratadas desde el inicio con NaCl (Fig. 5.4). Con 50 mM de NaCl se observó un incremento no significativo de la masa nodular dos semanas después del inicio del tratamiento, de forma que las plantas con 75 ó 100 mM, aunque no mostraban diferencias significativas respecto al control, sí las presentaron respecto a 50 mM.

Para estudiar la posible incidencia del NaCl sobre el crecimiento de los nódulos se calculó su peso normalizado (Fig. 6.3), detectándose un incremento significativo la segunda semana con 75 y 100 mM y sólo la última semana con 50 mM. No se aprecian diferencias entre tratamientos en ninguna recogida. El aumento del peso normalizado, teniendo en cuenta que el peso seco de nódulos

no ha disminuído respecto al control, refleja una mayor incidencia de la sal sobre el crecimiento de la parte aérea; esta respuesta es diferente en plantas que crecen desde el inicio con NaCl (Tab. 5.4), las cuales presentan una disminución idéntica en masa nodular y parte aérea.



**Figura 6.2.** Peso seco de nódulos, expresado en  $\text{g} \cdot (\text{planta})^{-1}$ , de plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, tratadas con distintos niveles de NaCl tras 28 días de cultivo.

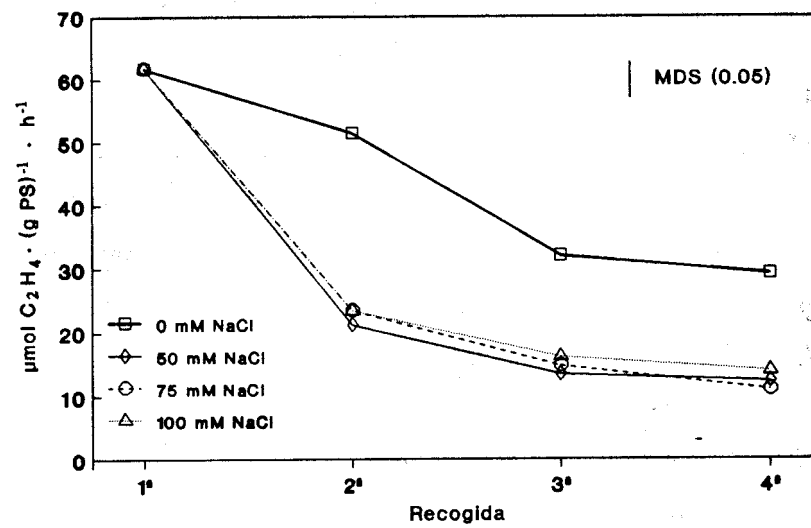


**Figura 6.3.** Peso normalizado de nódulos, expresado en  $\text{mg} \cdot (\text{g PS})^{-1}$ , de plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, tratadas con distintos niveles de NaCl tras 28 días de cultivo.

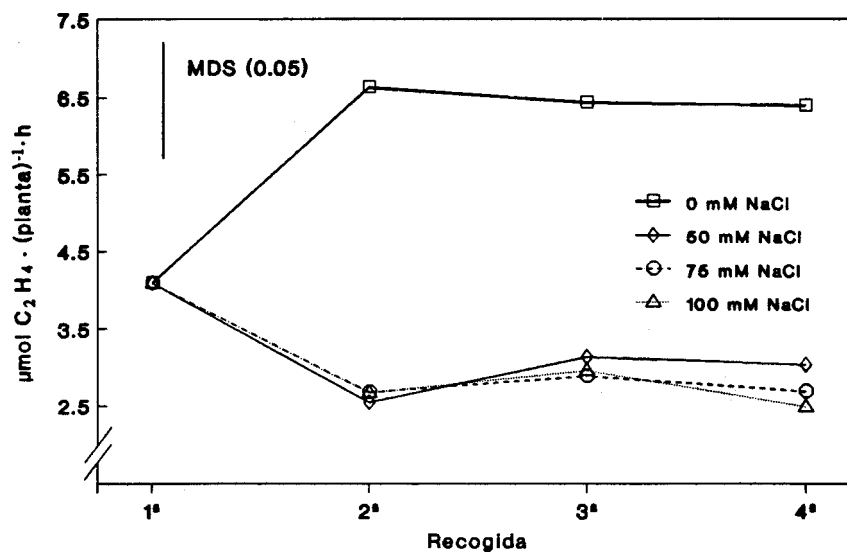
**6.2. Actividad nitrogenasa**

La actividad ARA específica (Fig. 6.4) se inhibió un 55% en la primera semana de contacto con la sal, sin que se aprecien diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre tratamientos salinos a lo largo del experimento. Esta inhibición se mantuvo en las sucesivas recogidas, aunque con valores absolutos de actividad significativamente inferiores ( $P \leq 0.05$ ).

Según el estudio estadístico de los datos de ARA por planta (Fig. 6.5), la principal fuente de variación fue el nivel de salinidad, con un efecto del 97% ( $P \leq 0.001$ ); al igual que en la actividad específica desde el primer momento se inhibe significativamente, pero con la diferencia de que los valores alcanzados se mantienen hasta el final. No se detectan variaciones entre tratamientos salinos (test de Tuckey,  $P \leq 0.05$ ), sino que se produce una inhibición, del 57%, para 50, 75 y 100 mM de NaCl, efecto en el que difiere de las plantas crecidas desde el inicio con NaCl (Fig. 5.6) en las que se aprecia una clara inhibición con 75 y 100 mM respecto a 50 mM.



**Figura 6.4.** Actividad reductora de acetileno, expresada en  $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot (\text{g PS})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , de nódulos de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, tratadas con distintos niveles de NaCl tras 28 días de cultivo.

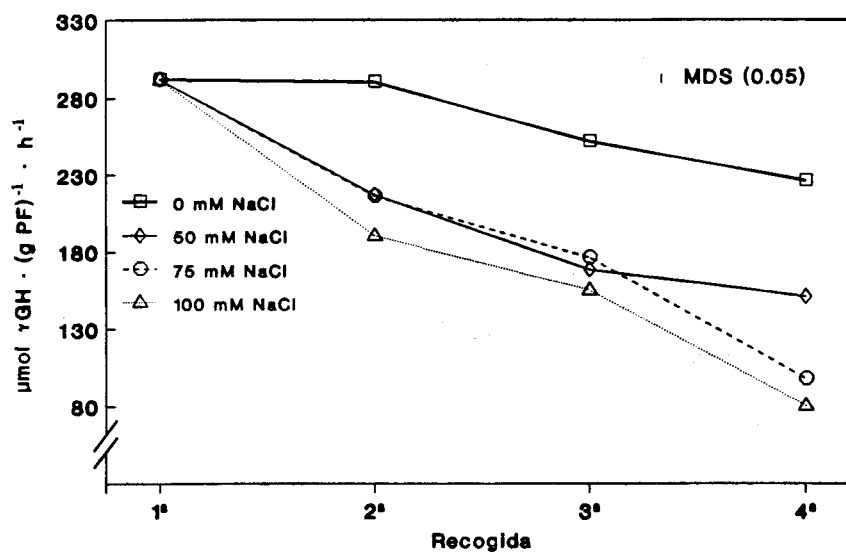


**Figura 6.5.** Actividad reductora de acetileno, expresada en  $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot (\text{planta})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , de nódulos de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, tratadas con distintos niveles de NaCl tras 28 días de cultivo.

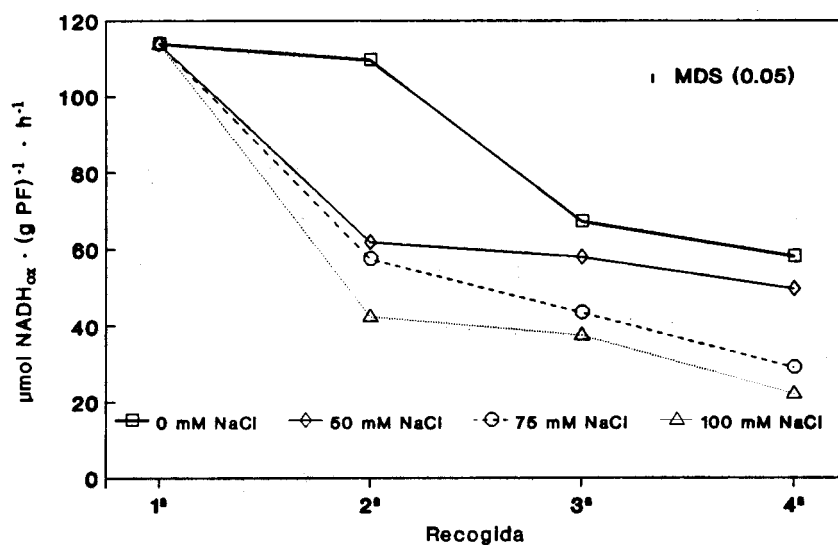
**6.3. Actividades enzimáticas de la fracción vegetal de los nódulos**

La actividad GS (Fig. 6.6) se inhibió fuertemente respecto al control desde el primer momento de aplicación del NaCl. A los 35 días de crecimiento, con 100 mM de NaCl se detecta una inhibición significativa respecto a concentraciones inferiores y a partir de los 42 días entre 50 y 75 mM. A los 50 días de cultivo se obtienen inhibiciones del 34, 38 y 65% para 50, 75 y 100 mM de NaCl respectivamente, que son superiores a las detectadas en plantas que crecen desde el inicio con NaCl (Tab. 5.5). También a nivel del metabolismo del amonio el efecto del estrés salino se aprecia antes cuando se aplica sobre plantas en avanzada etapa de desarrollo.

La actividad NADH-GOGAT (Fig. 6.7), se inhibió con la sal en un 44, 52 y 61% para 50, 75 y 100 mM de NaCl respectivamente, en la primera semana al igual que la GS, momento a partir de cual se detectan diferencias entre tratamientos salinos. Esta inhibición respecto al control disminuye en la segunda recogida, sin embargo en la tercera, con 50 mM se mantiene en un 15% y aumenta, hasta un 50% con 75 mM y hasta un 62% con 100 mM, a la vez que la actividad del tratamiento control decae en su evolución (Fig. 3.8). Esta inhibición final es parecida en plantas crecidas con 75 y 100 mM de NaCl desde el inicio (Tab. 5.5), pero un 50% inferior con 50 mM de NaCl.



**Figura 6.6.** Actividad GS, expresada en  $\mu\text{mol } \gamma\text{GH} \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, tratadas con distintos niveles de NaCl tras 28 días de cultivo.



**Figura 6.7.** Actividad NADH-GOGAT, expresada en  $\mu\text{mol NADH}_{\text{ox}} \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, tratadas con distintos niveles de NaCl tras 28 días de cultivo.

La cantidad de proteína soluble (Tab. 6.4), disminuye con la sal desde la primera recogida. Entre 75 y 100 mM no se detectaron diferencias a lo largo del

periodo de muestreo; en la última recogida, ambos niveles de NaCl presentaron una clara inhibición respecto a 0 y 50 mM.

**Tabla 6.4.** Contenido en proteína soluble, expresado en  $\text{mg} \cdot (\text{g PF})^{-1}$ , de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, tratadas con distintos niveles de NaCl tras 28 días de cultivo.

Recogida	Concentración de NaCl (mM)			
	0	50	75	100
Primera	12.88	-	-	-
Segunda	12.70	10.62	10.80	9.66
Tercera	10.85	9.14	10.36	10.14
Cuarta	10.65	9.00	6.20	6.88
MDS (0.05)		1.64		

**Tabla 6.5.** Actividad GS, expresada en  $\gamma\text{GH} \cdot (\text{min})^{-1} \cdot (\text{mg proteína})^{-1}$ , de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, tratadas con distintos niveles de NaCl tras 28 días de cultivo.

Recogida	Concentración de NaCl (mM)			
	0	50	75	100
Primera	0.278	-	-	-
Segunda	0.381	0.340	0.333	0.328
Tercera	0.387	0.307	0.283	0.254
Cuarta	0.354	0.279	0.263	0.194

Según los datos de actividad enzimática, en  $\text{U} \cdot (\text{mg proteína})^{-1}$  (Tabs 6.5 y 6.6), se detecta una inhibición mayor que en plantas crecidas desde el inicio con NaCl (Tab. 5.6), puesto que la disminución en proteína soluble es más acentuada.

**Tabla 6.6.** Actividad NADH-GOGAT, expresada en  $\mu\text{mol NADH}_{\text{ox}} \cdot (\text{min})^{-1} \cdot (\text{mg proteína})^{-1}$ , de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, tratadas con distintos niveles de NaCl tras 28 días de cultivo.

Recogida	Concentración de NaCl (mM)			
	0	50	75	100
Primera	0.147	-	-	-
Segunda	0.144	0.097	0.106	0.328
Tercera	0.103	0.089	0.062	0.254
Cuarta	0.091	0.078	0.054	0.194

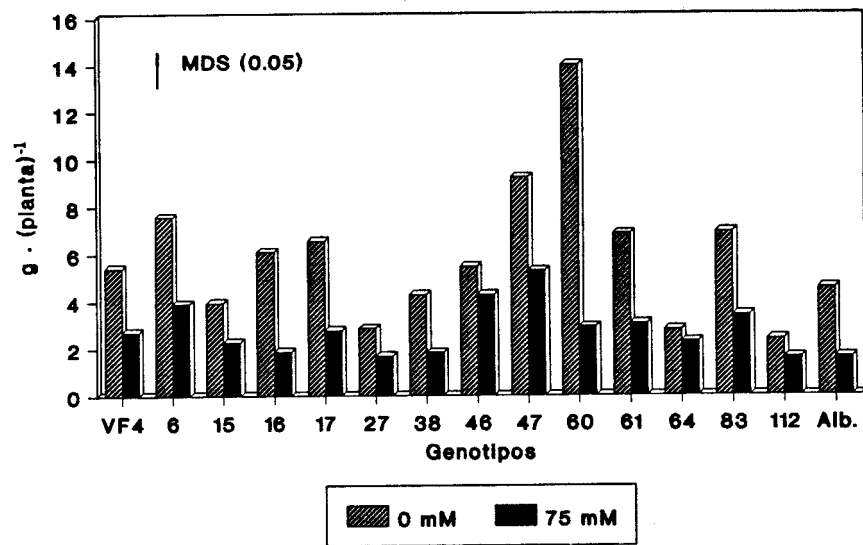
## **7. TOLERANCIA AL ESTRÉS SALINO EN *V. faba*: UTILIZACIÓN DE LÍNEAS PURAS**

### **7.1. Crecimiento y nodulación**

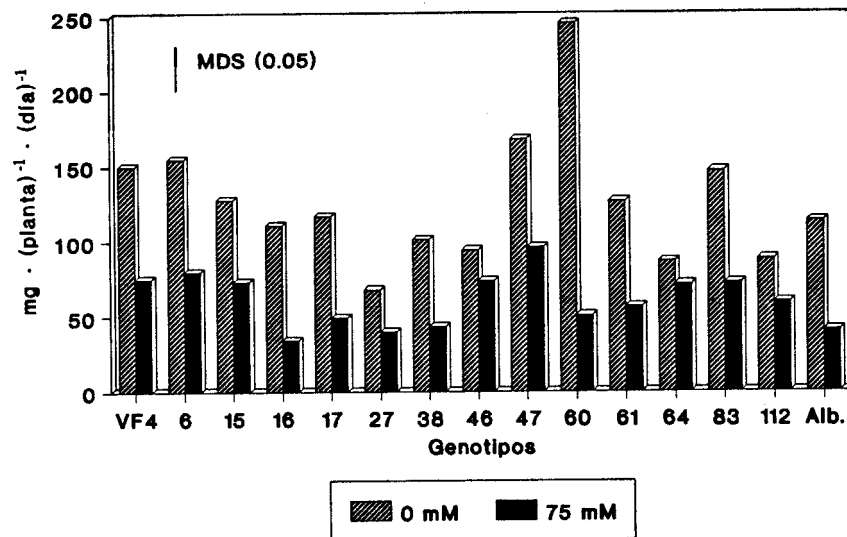
El NaCl inhibe fuertemente el crecimiento de todos los genotipos de *V. faba* ensayados, excepto en las líneas VF27, 46, 64 y 112 que presentaron una inhibición del 41, 22, 18 y 33% respectivamente; estas líneas se caracterizan por tener un escaso crecimiento. Como se puede apreciar el efecto del NaCl aparece estrechamente relacionado con la capacidad de crecimiento de la planta. Destacan las líneas VF16 y 60 con una inhibición aproximada del 75%; en el resto de las líneas la inhibición varió entre 43 y 79%.

La tasa de crecimiento absoluto (Fig. 7.2) se afectó en todas las líneas por la salinidad, con un efecto del 93.21% ( $P \leq 0.001$ ). Los resultados son semejantes a los del peso seco total, destacando VF16 y VF60 por su elevada inhibición. Las líneas VF27, 46, 64 y 112 no presentaron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) respecto al control, con porcentajes de inhibición idénticos a los de peso seco.

Otro parámetro relacionado con el crecimiento es la relación en peso seco de raíz y parte aérea, cuyos resultados se muestran en la tabla 7.1. El crecimiento en medio salino produjo un incremento de la relación R/PA en algunas líneas siendo significativo para VF4, 16, 17, 27 y 83 y el cv. Alborea, aumentando entre el 31 y el 69%, lo que implica un desequilibrio por el mayor desarrollo de la parte aérea respecto a la raíz. Sin embargo, en VF46 se detecta menor desarrollo radical ya que la relación R/PA disminuye con 75 mM de NaCl. En el resto de las líneas no varía esta relación, por tanto, se inhibe en la misma medida la parte aérea y la raíz.



**Figura 7.1.** Acumulación de materia seca, expresada en  $g \cdot (planta)^{-1}$ , de distintos genotipos de *V. faba* inoculados con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* y tratados con 0 y 75 mM de NaCl.



**Figura 7.2.** Tasa de crecimiento absoluto, expresada en  $g \text{ PS} \cdot (planta)^{-1} \cdot (día)^{-1}$ , de distintos genotipos de *V. faba* inoculados con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* y tratados con 0 y 75 mM de NaCl.

## Resultados

**Tabla 7.1.** Relación peso seco de raíz/parte aérea de distintos genotipos de *V. faba* inoculados con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* y tratados con 0 y 75 mM.

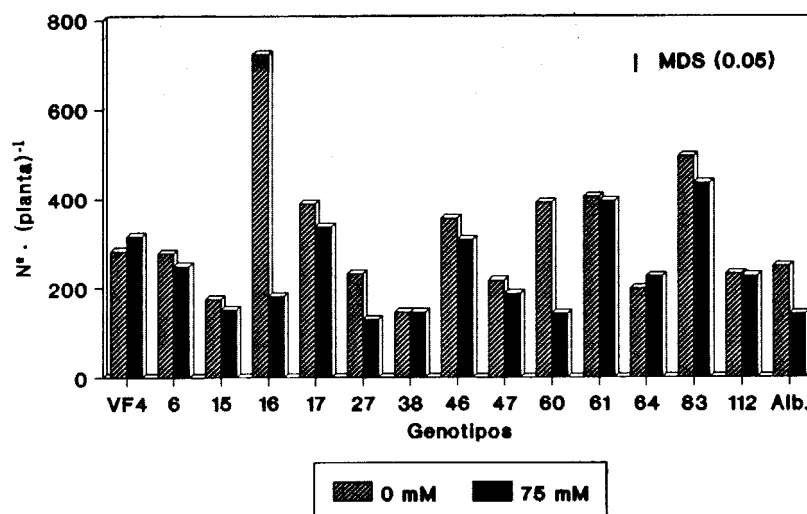
Genotipo	NaCl (mM)	R/PA	Genotipo	NaCl (mM)	R/PA
VF4	0	0.33	VF46	0	0.50
	75	0.43		75	0.42
VF6	0	0.41	VF47	0	0.34
	75	0.38		75	0.34
VF15	0	0.31	VF60	0	0.47
	75	0.31		75	0.43
VF16	0	0.38	VF61	0	0.40
	75	0.50		75	0.44
VF17	0	0.36	VF64	0	0.42
	75	0.43		75	0.40
VF27	0	0.30	VF83	0	0.47
	75	0.43		75	0.57
VF38	0	0.38	VF112	0	0.42
	75	0.40		75	0.41
			Alborea	0	0.30
				75	0.51
MDS (0.05)		0.07			



**Figura 7.3.** Aspecto de nódulos de plantas de *V. faba* VF47 inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* y tratadas con 0 y 75 mM de NaCl.

En las plantas crecidas con NaCl, los nódulos presentaban un aspecto blanquecino y áspero, eran redondeados y algunos de ellos adquirían un tamaño desproporcionado e informe (Fig. 7.3).

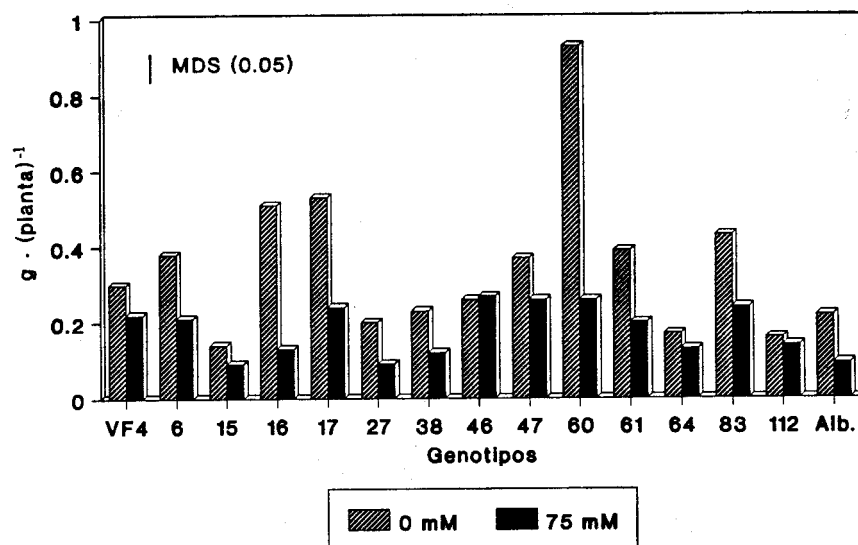
Como se aprecia en la figura 7.4, la nodulación desarrollada por los diferentes genotipos [ $n$  de nódulos  $\cdot$  (planta) $^{-1}$ ] varió considerablemente entre 723 nódulos para VF16 y 147 nódulos para VF38. El efecto del NaCl fue negativo en VF16, 27, 60 y cv. Alborea. La línea VF16 que desarrolló una nodulación muy abundante fue la que se afectó más, con una inhibición del 75%.



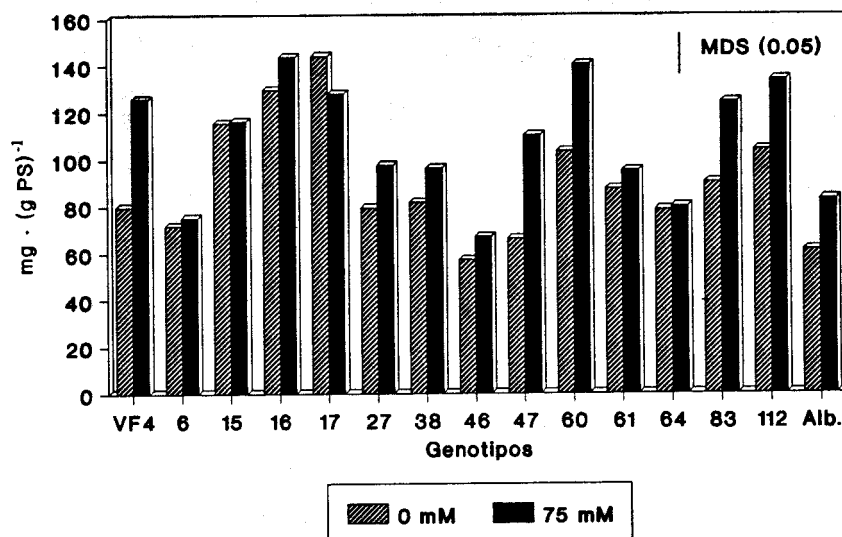
**Figura 7.4.** Número de nódulos por planta de distintos genotipos de *V. faba* inoculados con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* y tratados con 0 y 75 mM de NaCl.

El peso seco de los nódulos (Fig. 7.5) fue muy variable entre líneas y resultó más sensible al NaCl que la propia nodulación, observándose una inhibición altamente significativa en gran número de líneas, en algunas de las cuales no se inhibió la nodulación. Cabe destacar las líneas VF16, 17 y 60 que inhiben la nodulación y la masa nodular (75, 56 y 72%, respectivamente), frente a las líneas VF46, 64 y 112 que no se afectaron en ninguno de estos dos parámetros.

En la figura 7.6 se puede observar que el NaCl incrementa el peso normalizado de nódulos en todos los genotipos, excepto en VF17 que disminuye no significativamente; por lo que la mayoría de los genotipos mantienen una masa nodular desproporcionada para la superficie fotosintética disponible.



**Figura 7.5.** Peso seco de nódulos, expresado en  $\text{g} \cdot (\text{planta})^{-1}$ , de distintos genotipos de *V. faba* inoculados con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* y tratados con 0 y 75 mM de NaCl.

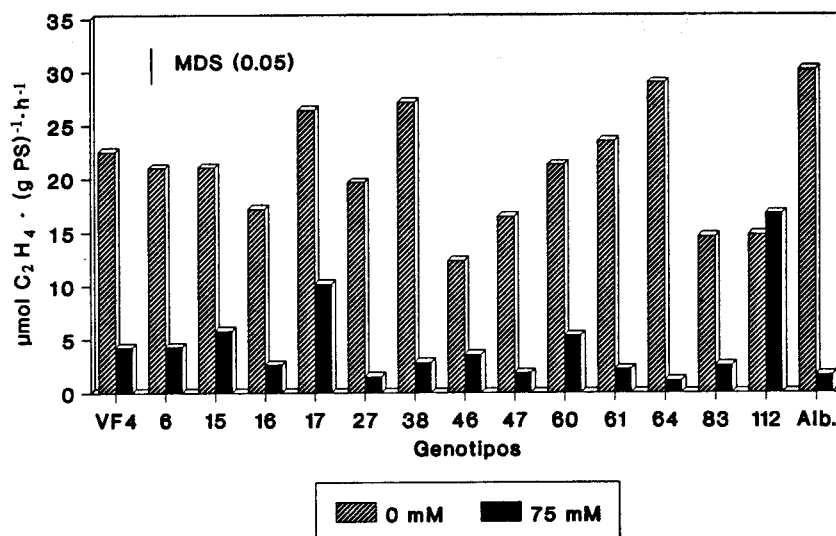


**Figura 7.6.** Peso normalizado de nódulos, expresado en  $\text{mg} \cdot (\text{g PS})^{-1}$  de distintos genotipos de *V. faba* inoculados con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* y tratados con 0 y 75 mM de NaCl.

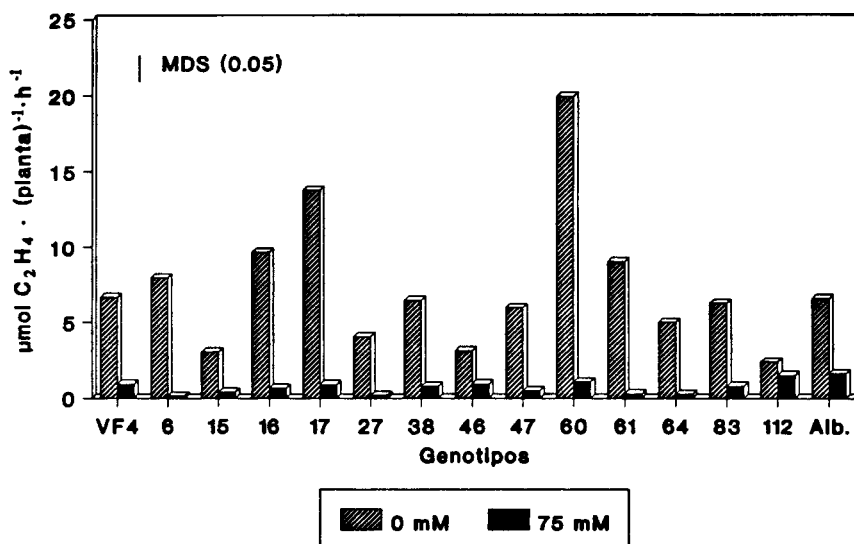
**7.2. Actividad nitrogenasa**

En la figura 7.7 se representan los datos de actividad nitrogenasa específica en los distintos genotipos. Entre las plantas crecidas en ausencia de sal cabe destacar VF16, 47, 83 y 112 que presentaron valores mínimos de actividad [ $\approx 15 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot (\text{g PS})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ], frente a VF17, 64 y 38 y el cv. Alborea con valores máximos [ $\approx 30 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot (\text{g PS})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ]. En plantas tratadas con NaCl esta actividad resultó fuertemente inhibida en todos los genotipos ensayados, a excepción de la línea VF112 que se estimuló de forma no significativa ( $P \leq 0.05$ ). En general, los genotipos con mayor ARA específica resultaron más drásticamente afectados por el NaCl, estos fueron VF17, 38 y 64 que mostraron una inhibición media del 95%. Sin embargo, el cv. Alborea con valores de ARA elevados presentó una inhibición menor.

La actividad nitrogenasa por planta (Fig. 7.8) mostró un comportamiento parecido a la nitrogenasa específica, obteniéndose valores mínimos inferiores a  $1 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot (\text{planta})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , como consecuencia de la inhibición de la nodulación y de la ARA específica. En el crecimiento control destaca la línea VF60 con valores de  $20 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot (\text{planta})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , seguida de las líneas VF17, 16 y 61.



**Figura 7.7.** Actividad reductora de acetileno, expresada en  $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot (\text{g PS})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , de nódulos de distintos genotipos de *V. faba* inoculados con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* y tratadas con 0 y 75 mM de NaCl.

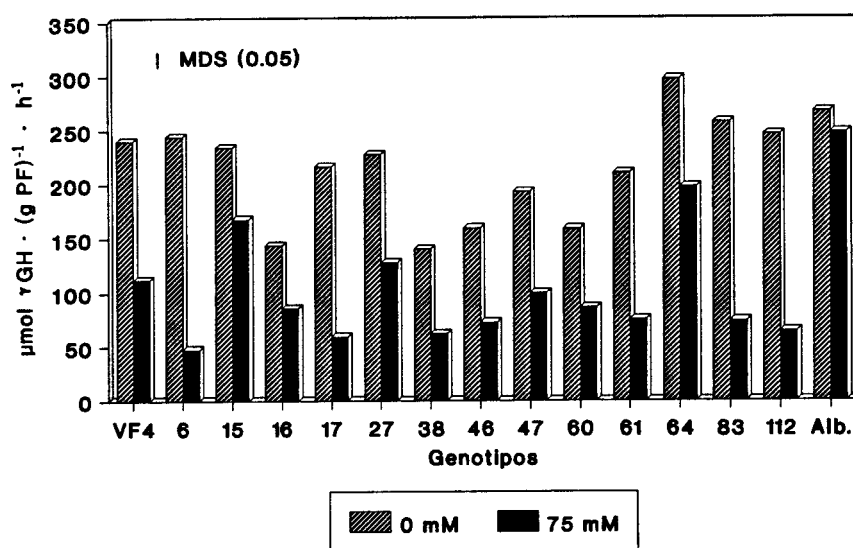


**Figura 7.8.** Actividad reductora de acetileno, expresada en  $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot (\text{planta})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , de nódulos de distintos genotipos de *V. faba* inoculados con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* y tratadas con 0 y 75 mM de NaCl.

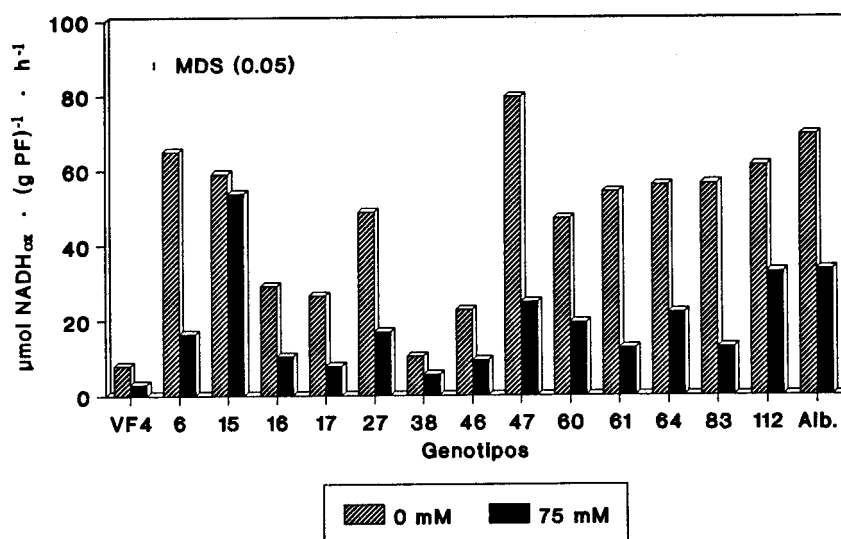
### 7.3. Actividades enzimáticas de la fracción vegetal de los nódulos

Todos los genotipos ensayados mostraron niveles altos de GS en la fracción vegetal de los nódulos (Fig. 7.9), que oscilaron entre  $140 \mu\text{mol } \gamma\text{GH} \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  para VF16 y  $38$  y  $297 \mu\text{mol } \gamma\text{GH} \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  para VF64. En todos los casos, el NaCl afectó significativamente la GS, aunque para el cv. Alborea la inhibición fue sólo del 7%. En las demás líneas el descenso fue mayor, oscilando entre el 81% y el 28%. Se observa fuerte variabilidad en el grado de respuesta al NaCl; VF6, 83 y 112 presentan gran inhibición, mientras que VF15, 27 y 64 se afectan en menor medida.

La NADH-GOGAT (Fig. 7.10) de los nódulos de *V. faba* mostró una variabilidad genotípica mayor que la GS y un patrón de actividad enzimática aparentemente diferente. La máxima actividad corresponde a VF47 y la mínima a VF4, dos líneas con elevada GS. La NADH-GOGAT, también resultó fuertemente inhibida por el NaCl en todos los genotipos estudiados y nuevamente el patrón de respuesta es diferente al observado para la GS, siendo VF15, con una alta actividad NADH-GOGAT, el menos afectado (9%) y VF6, 47 y 83 los que más se afectaron (74%).



**Figura 7.9.** Actividad GS, expresada en  $\mu\text{mol } \gamma\text{GH} \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , de distintos genotipos de *V. faba* inoculados con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* y tratados con 0 y 75 mM de NaCl.



**Figura 7.10.** Actividad NADH-GOGAT, expresada en  $\mu\text{mol NADH}_{\text{ox}} \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , de distintos genotipos de *V. faba* inoculados con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* y tratados con 0 y 75 mM de NaCl.

## Resultados

El contenido en proteína soluble (Tab. 7.2) exhibe poca variabilidad entre los genotipos estudiados; sin embargo, el NaCl disminuyó este contenido en todos ellos, excepto en VF15. La inhibición fue variable, alcanzando un 52% para VF6, mientras que para VF27 y 64 fue de un 16%.

**Tabla 7.2.** Contenido en proteína soluble, expresado en  $\text{mg} \cdot (\text{g PF})^{-1}$  de nódulos de distintos genotipos de *V. faba* inoculados con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* y tratadas con 0 y 75 mM de NaCl.

Genotipo	NaCl (mM)	$\text{mg} \cdot (\text{g PF})^{-1}$	Genotipo	NaCl (mM)	$\text{mg} \cdot (\text{g PF})^{-1}$
VF4	0	12.44	VF46	0	10.52
	75	7.60		75	8.94
VF6	0	13.23	VF47	0	12.32
	75	6.32		75	8.32
VF15	0	10.15	VF60	0	10.58
	75	10.89		75	7.29
VF16	0	10.08	VF61	0	10.36
	75	8.30		75	6.93
VF17	0	11.33	VF64	0	12.48
	75	7.26		75	10.45
VF27	0	12.22	VF83	0	11.83
	75	10.24		75	7.42
VF38	0	11.82	VF112	0	10.24
	75	9.26		75	7.36
			Alborea	0	10.89
				75	8.90
MDS (0.05)		1.39			

Las actividades específicas, por mg de proteína, de las enzimas del ciclo de la glutamato sintasa (Tabs 7.3 y 7.4), se inhibieron en todos los genotipos estudiados, destacándose la línea VF112 y el cv. Alborea con una inhibición aproximada del 18% para la GS. La NADH-GOGAT presentó mayor inhibición en todos los genotipos.

## Resultados

**Tabla 7.3.** Actividad GS, expresada en  $\mu\text{mol } \gamma\text{GH} \cdot (\text{min})^{-1} \cdot (\text{mg proteína})^{-1}$ , de distintos genotipos de *V. faba* inoculados con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* y tratados con 0 y 75 mM de NaCl.

Genotipo	NaCl (mM)	U · (mg proteína) <sup>-1</sup>	Genotipo	NaCl (mM)	U · (mg proteína) <sup>-1</sup>
VF4	0	0.322	VF46	0	0.252
	75	0.246		75	0.135
VF6	0	0.308	VF47	0	0.261
	75	0.125		75	0.200
VF15	0	0.384	VF60	0	0.250
	75	0.256		75	0.197
VF16	0	0.237	VF61	0	0.339
	75	0.172		75	0.180
VF17	0	0.318	VF64	0	0.397
	75	0.136		75	0.315
VF27	0	0.310	VF83	0	0.363
	75	0.208		75	0.165
VF38	0	0.197	VF112	0	0.401
	75	0.111		75	0.271
			Alborea	0	0.409
				75	0.391

**Tabla 7.4.** Actividad NADH-GOGAT, expresada en  $\mu\text{mol NADH}_{\text{ox}} \cdot (\text{min})^{-1} \cdot (\text{mg proteína})^{-1}$ , de distintos genotipos de *V. faba* inoculados con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* y tratadas con 0 y 75 mM de NaCl.

Genotipo	NaCl (mM)	U · (mg proteína) <sup>-1</sup>	Genotipo	NaCl (mM)	U · (mg proteína) <sup>-1</sup>
VF4	0	0.011	VF46	0	0.036
	75	0.006		75	0.017
VF6	0	0.082	VF47	0	0.108
	75	0.043		75	0.050
VF15	0	0.097	VF60	0	0.074
	75	0.082		75	0.044
VF16	0	0.048	VF61	0	0.087
	75	0.021		75	0.030
VF17	0	0.039	VF64	0	0.075
	75	0.018		75	0.035
VF27	0	0.067	VF83	0	0.080
	75	0.028		75	0.029
VF38	0	0.015	VF112	0	0.100
	75	0.010		75	0.075
			Alborea	0	0.106
				75	0.063

En la tabla 7.5 se representa la matriz de correlaciones entre los distintos parámetros determinados. Es importante destacar que el crecimiento de la planta se correlacionó positiva y significativamente ( $P \leq 0.001$ ) con la ARA por planta, mientras que mostró una correlación negativa muy significativa con el peso normalizado de nódulos. La ARA específica se correlaciona positiva y significativamente con la tasa de crecimiento absoluto, las actividades GS y NADH-GOGAT y el contenido en proteína soluble; sin embargo, la ARA por planta sólo se correlacionó con la GS.

## Resultados

**Tabla 7.5.** Matriz de correlación simple entre variables determinadas, para distintos genotipos de *V. faba* inoculados con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, que crecieron con 0 y 75 mM de NaCl. Las variables son: PSP, peso seco por planta; TCA, tasa de crecimiento absoluto; RPA, relación raíz/parte aérea; NN, número de nódulos; PSN, peso seco de nódulos; PNN, peso normalizado de nódulos; ARA, actividad específica de la nitrogenasa; ARAP, ARA por planta; GS, glutamina sintetasa; GG, glutamato sintasa; PRT, contenido en proteína soluble.

	PSP	TCA	RPA	NN	PSN	PNN	ARA	ARAP	GS	GG	PRT
PSP	1.000										
TCA	-0.191	1.000									
RPA	0.985	-0.348	1.000								
NN	-0.288	0.436	-0.365	1.000							
PSN	0.986	-0.341	1.000	-0.360	1.000						
PNN	-0.595	-0.014	-0.571	0.303	-0.571	1.000					
ARA	-0.131	0.588	-0.205	0.156	-0.202	-0.176	1.000				
ARAP	0.995	-0.265	0.995	-0.320	0.995	-0.575	-0.132	1.000			
GS	-0.202	0.485	-0.243	0.072	-0.241	-0.135	0.829	-0.197	1.000		
GG	-0.112	0.545	-0.181	0.048	-0.179	-0.161	0.574	-0.141	0.760	1.000	
PRT	0.133	0.520	0.058	-0.009	0.061	-0.408	0.745	0.116	0.706	0.570	1.000

## 8. INTERACCIÓN DE LA FERTILIZACIÓN NITROGENADA Y LA SALINIDAD EN LA SIMBIOSIS *V. faba-R. leguminosarum*

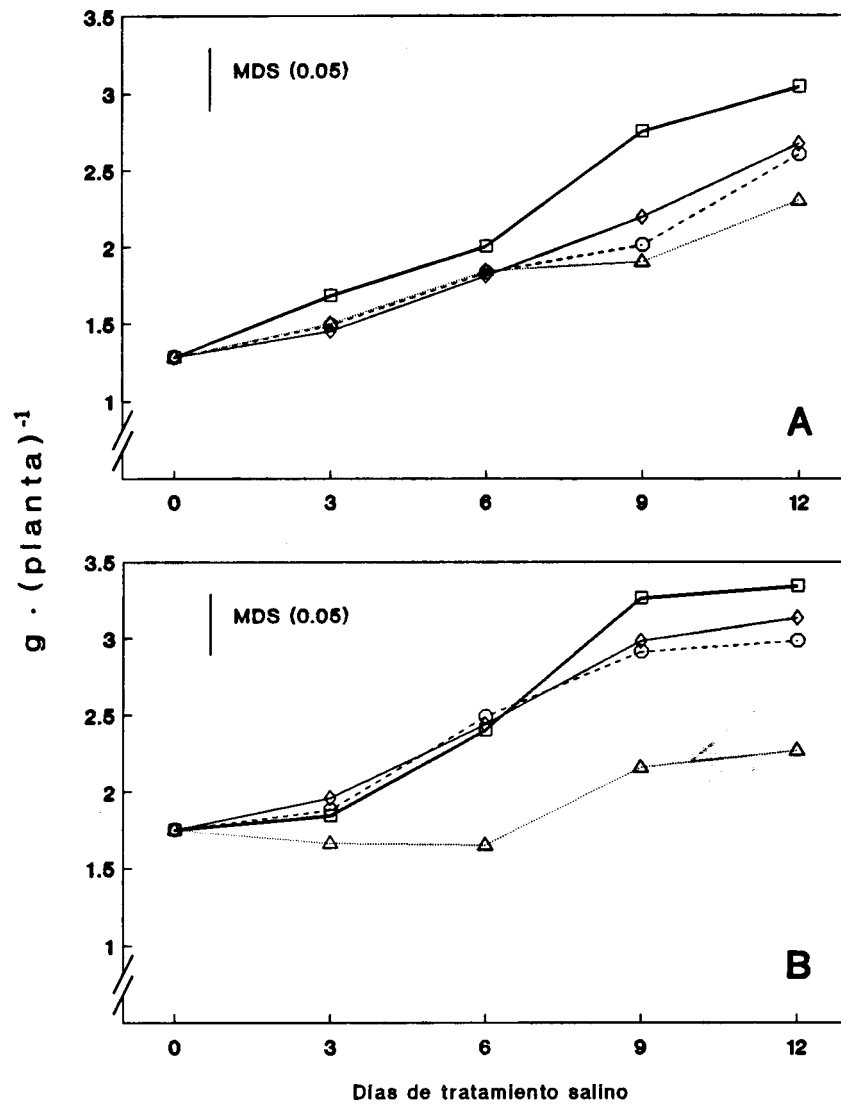
### 8.1. Crecimiento y nodulación

A los 24 días de cultivo, las plantas crecidas con 8 mM de  $\text{NO}_3^-$  presentaron un crecimiento significativamente ( $P \leq 0.05$ ) mayor que con 2 mM (Fig. 8.1). Tras 6 días de tratamiento salino, sólo se afectaron las plantas con 8 mM de  $\text{NO}_3^-$  y 200 mM de NaCl en medio. Entre los días 6 y 12, el crecimiento de las plantas con 2 mM de  $\text{NO}_3^-$ , se vio significativamente disminuido con todas las concentraciones de sal aplicadas, si bien, entre ellas no se aprecian diferencias. Concentraciones de 200 mM presentaron una inhibición semejante (75%) con los dos niveles de fertilización nitrogenada ensayados. En general, el crecimiento fue mayor con 8 mM de  $\text{NO}_3^-$  (test de Tuckey,  $P \leq 0.05$ ); se puede asumir que el aporte de nitrógeno combinado atenúa el efecto negativo de la sal.

La reducción del crecimiento se deja notar más en el desarrollo de la parte aérea que en el de la raíz, sobre todo en plantas con 2 mM de  $\text{NO}_3^-$ . Esto se manifiesta en un aumento de la relación R/PA, cuyos datos se exponen en la tabla 8.1.

**Tabla 8.1.** Relación raíz/parte aérea de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, fertilizadas con 2 y 8 mM de  $\text{NO}_3^-$  y tratadas con diferentes concentraciones de NaCl.

Días	Concentración de $\text{NO}_3^-$	Concentración de NaCl (mM)			
		0	50	100	200
0	2	0.44	-	-	-
	8	0.46	-	-	-
3	2	0.42	0.46	0.53	0.60
	8	0.44	0.50	0.49	0.59
6	2	0.41	0.44	0.53	0.60
	8	0.43	0.48	0.45	0.57
9	2	0.32	0.42	0.55	0.59
	8	0.40	0.49	0.47	0.54
12	2	0.37	0.40	0.61	0.61
	8	0.37	0.47	0.48	0.52
MDS (0.05)			0.086		



**Figura 8.1.** Acumulación de materia seca, expresada en  $\text{g} \cdot (\text{planta})^{-1}$ , de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, fertilizadas con 2 mM (A) y 8 mM (B) de  $\text{NO}_3^-$  y tratadas con diferentes concentraciones de NaCl, 0 (□), 50 (◊), 100 (⊖) y 200 (△) mM.

Respecto al contenido en nitrógeno reducido (Tab. 8.2), al inicio del tratamiento salino no hay diferencias entre las plantas con 2 y 8 mM de  $\text{NO}_3^-$ . Después de 3 días, con 2 mM de  $\text{NO}_3^-$ , el contenido en nitrógeno disminuye proporcionalmente a la concentración de NaCl; con 8 mM de  $\text{NO}_3^-$ , no se detecta reducción respecto al control, aunque si en las tratadas con 100 y 200 mM de

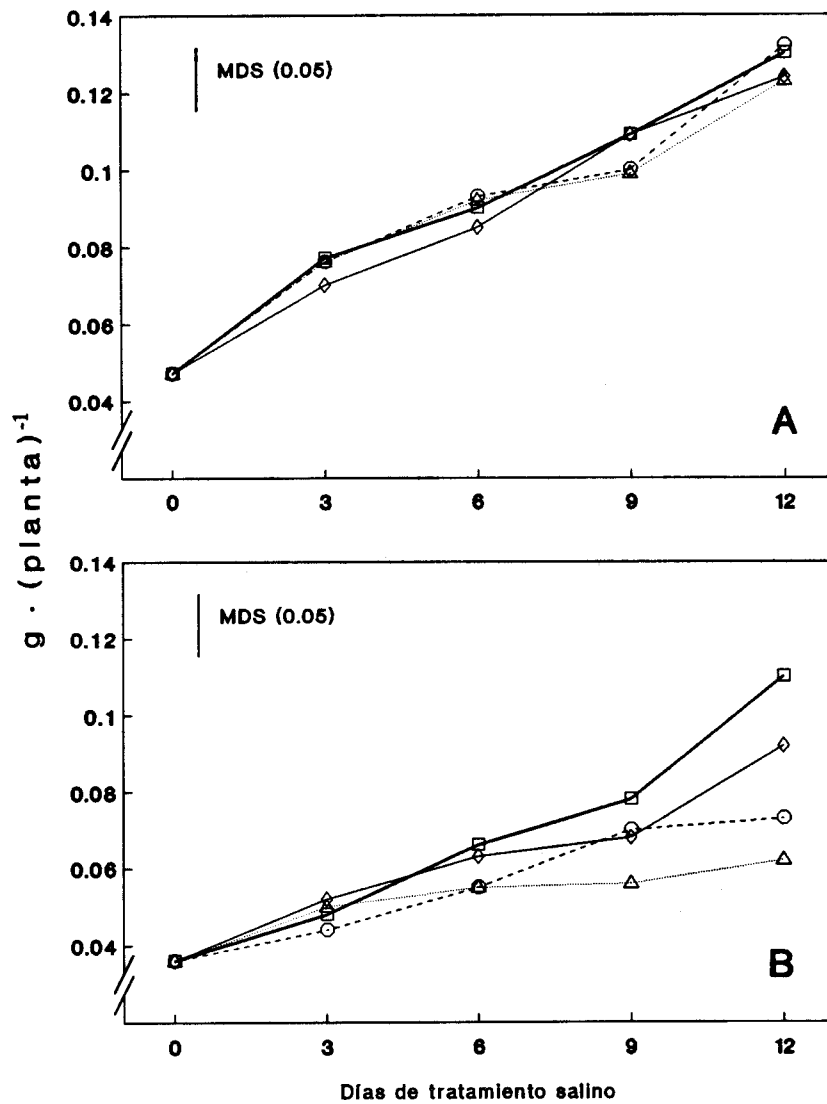
## Resultados

NaCl respecto a 50 mM. En las siguientes recogidas, no se aprecian diferencias entre ambos niveles de  $\text{NO}_3^-$  para las plantas tratadas con 100 ó 200 mM de NaCl; éstas presentan un contenido en nitrógeno menor que las tratadas con 50 mM. Las plantas con 50 mM de NaCl, alcanzan niveles de nitrógeno inferiores con 2 mM que con 8 mM de  $\text{NO}_3^-$ , aún cuando estas diferencias no se detectan en las control.

**Tabla 8.2.** Contenido en nitrógeno reducido, expresado en  $\text{mg} \cdot (\text{planta})^{-1}$ , de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, fertilizadas con 2 y 8 mM de  $\text{NO}_3^-$  y tratadas con diferentes concentraciones de NaCl.

Días	Concentración de $\text{NO}_3^-$	Concentración de NaCl (mM)			
		0	50	100	200
0	2	106.55	-	-	-
	8	112.65	-	-	-
3	2	139.17	120.60	92.92	85.09
	8	126.14	133.05	117.09	119.40
6	2	166.83	137.89	122.94	126.45
	8	163.07	168.42	116.88	121.61
9	2	182.95	160.23	150.39	129.46
	8	217.60	206.60	157.23	138.36
12	2	228.16	188.27	166.56	145.06
	8	231.60	241.06	171.21	147.67
MDS (0.05)		9.29			

El peso seco de nódulos (Fig. 8.2) es menor en las plantas que crecen con niveles elevados de  $\text{NO}_3^-$  en el medio (test de Tuckey,  $P \leq 0.05$ ). Con 2 mM de  $\text{NO}_3^-$ , no se aprecian diferencias significativas entre los diferentes tratamientos salinos. Con 8 mM de  $\text{NO}_3^-$ , las plantas tratadas con 50 y 100 mM de NaCl no mostraron diferencias con respecto al control; sin embargo, con 200 mM de NaCl el efecto negativo de la sal se hizo patente desde los 9 días de tratamiento.



**Figura 8.2.** Peso seco de nódulos, expresado en  $\text{g} \cdot (\text{planta})^{-1}$ , en plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, fertilizadas con 2 mM (A) y 8 mM (B) de  $\text{NO}_3^-$  y tratadas con diferentes concentraciones de NaCl, 0 (□), 50 (◇), 100 (○) y 200 (△) mM.

El peso normalizado de nódulos (Tab. 8.3) incrementa con la sal y con la edad de la planta, especialmente en las fertilizadas con 2 mM de  $\text{NO}_3^-$ , esto evidencia el efecto amortiguador del nitrógeno combinado ante niveles elevados de sal en el medio.

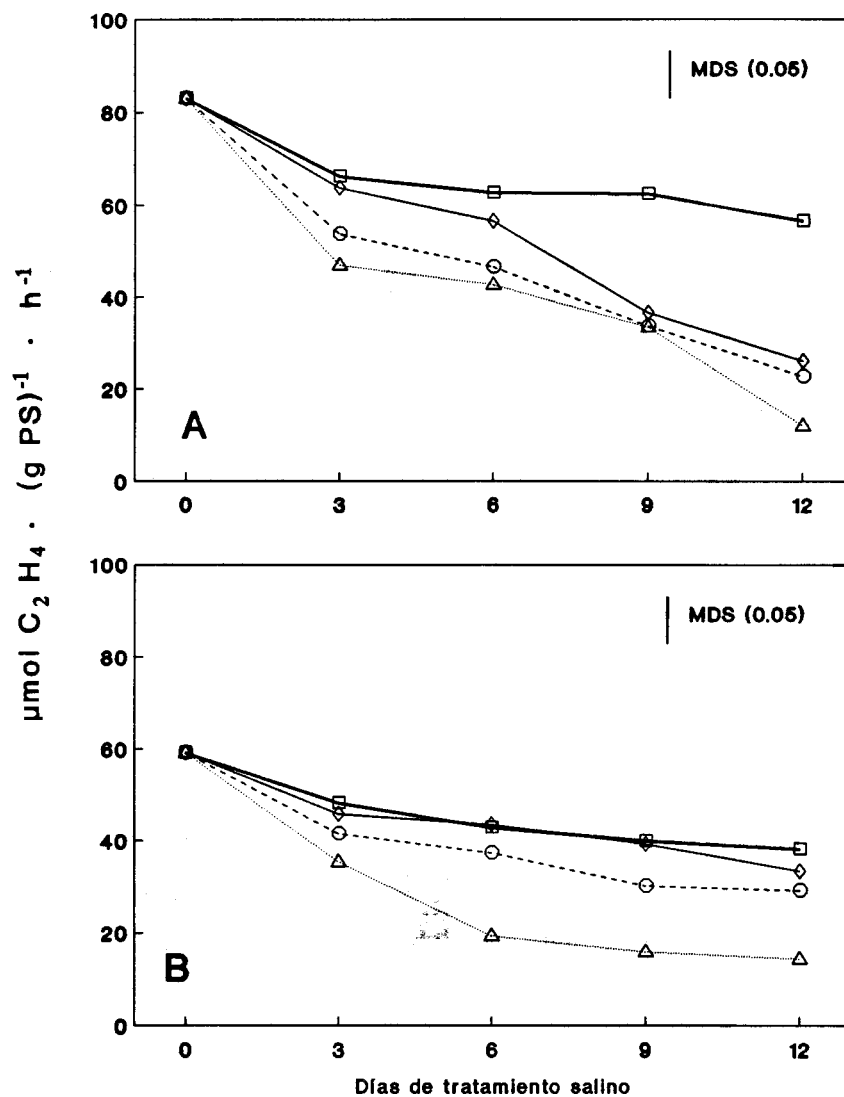
**Tabla 8.3.** Peso normalizado de nódulos, expresado en  $\text{mg} \cdot (\text{g PS})^{-1}$ , de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, fertilizadas con 2 y 8 mM de  $\text{NO}_3^-$  y tratadas con diferentes concentraciones de NaCl.

Días	Concentración de $\text{NO}_3^-$	Concentración de NaCl (mM)			
		0	50	100	200
0	2	51.54	-	-	-
	8	52.24	-	-	-
3	2	49.65	52.49	64.52	78.54
	8	42.75	58.83	42.79	65.39
6	2	52.16	55.97	69.26	81.96
	8	46.41	54.75	45.78	58.56
9	2	59.07	72.37	74.28	82.33
	8	45.77	48.21	50.10	52.44
12	2	55.54	62.83	78.34	85.36
	8	43.39	56.87	49.78	69.47
MDS (0.05)		10.68			

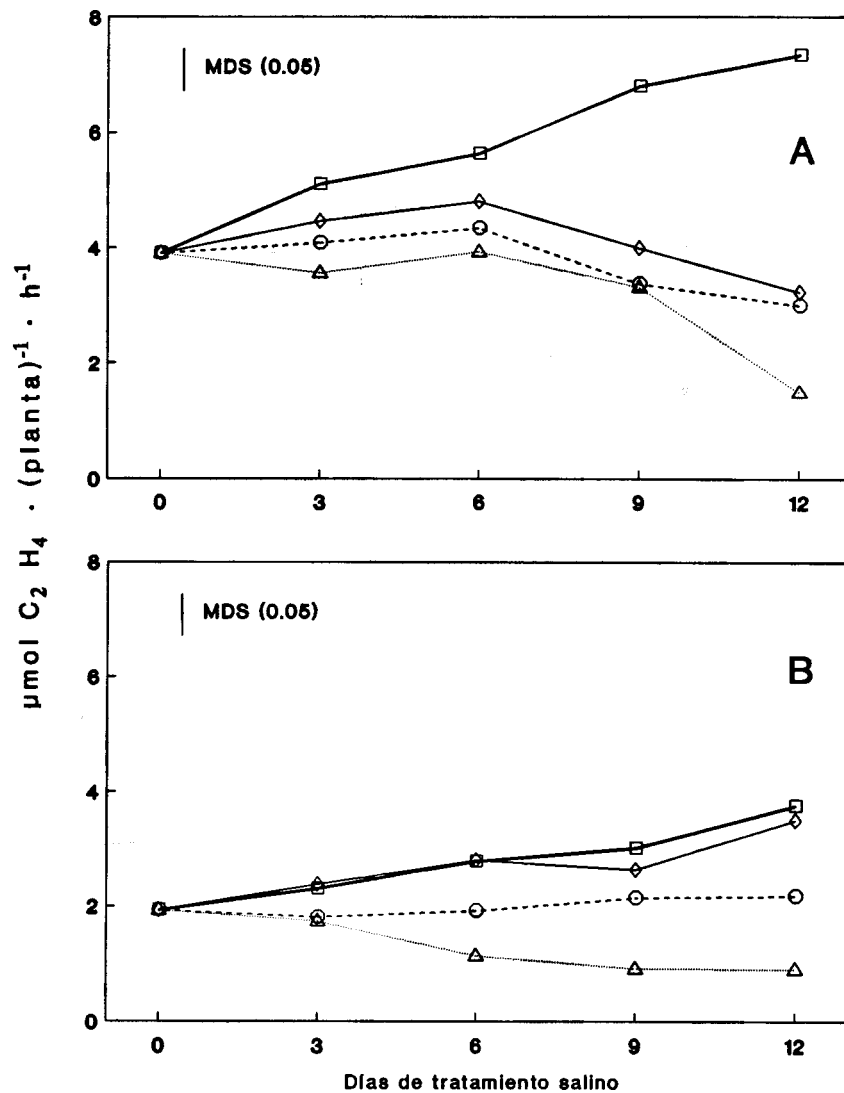
## 8.2. Actividades de la nitrogenasa

En la figura 8.3 se aprecia la actividad nitrogenasa específica, que fue significativamente menor con 8 mM que con 2 mM de  $\text{NO}_3^-$  (test de Tuckey,  $P \leq 0.05$ ), si bien, ante la interacción con el NaCl, las plantas con 2 mM de  $\text{NO}_3^-$  mostraron una inhibición mayor. Concretamente, 50 mM de NaCl y concentraciones superiores, inhibieron significativamente la ARA específica de nódulos de *V. faba* desde los 9 y 3 días de tratamiento, respectivamente, en plantas crecidas con 2 mM de  $\text{NO}_3^-$ , mientras que, con 8 mM, fue necesaria la aplicación de 200 mM de NaCl para inhibir de forma significativa ( $P \leq 0.05$ ) la nitrogenasa. Al final del periodo de tratamiento, la ARA específica, en plantas con 2 mM de  $\text{NO}_3^-$  se inhibió un 54, 60 y 79% con 50, 100 y 200 mM de NaCl,

respectivamente, mientras que, con 8 mM sólo se inhibió con 200 mM de NaCl un 62%.



**Figura 8.3.** Actividad reductora de acetileno, expresada en  $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot (\text{g PS})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, fertilizadas con 2 mM (A) y 8 mM (B) de  $\text{NO}_3^-$  y tratadas con diferentes concentraciones de NaCl, 0 (□), 50 (◇), 100 (○) y 200 (△) mM.



**Figura 8.4.** Actividad reductora de acetileno, expresada en  $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot (\text{planta})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, fertilizadas con 2 mM (A) y 8 mM (B) de  $\text{NO}_3^-$  y tratadas con diferentes concentraciones de NaCl, 0 ( $\square$ ), 50 ( $\diamond$ ), 100 ( $\circ$ ) y 200 ( $\triangle$ ) mM.

En la figura 8.4 se representa la ARA por planta. Según el estudio estadístico, la principal fuente de variación es la fertilización nitrogenada, con un efecto del 74% ( $P \leq 0.05$ ). La adición de 50 mM de NaCl, en las plantas con 8 mM de  $\text{NO}_3^-$ , no alteró la ARA por planta en todo el tiempo de cultivo, mientras que,

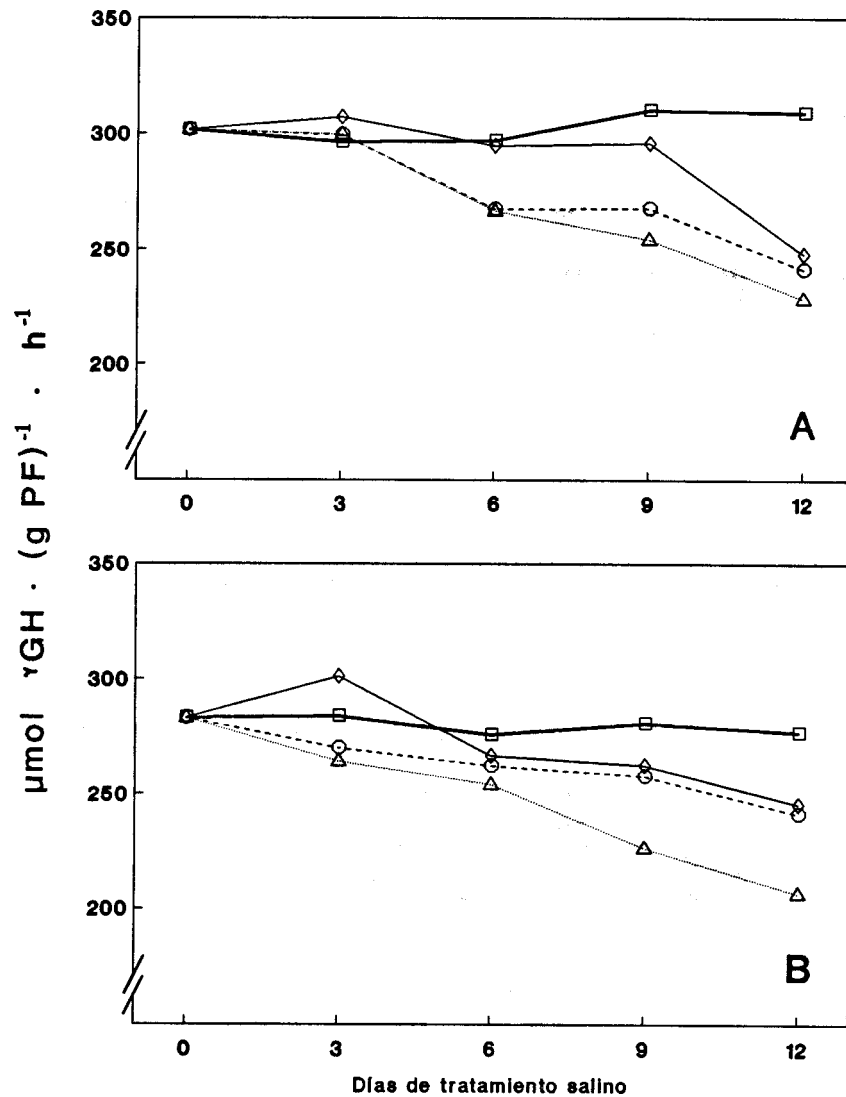
que, con 2 mM la inhibición se detectó desde los 6 días. Sin embargo, con 100 y 200 mM de NaCl desciende significativamente a los 3 días en plantas con 2 mM de  $\text{NO}_3^-$  y a los 6 días con 8 mM de  $\text{NO}_3^-$ . Al final del experimento se obtienen, con 2 mM de  $\text{NO}_3^-$  inhibiciones del 57% para 50 y 100 mM y 80% para 200 mM NaCl y, con 8 mM de  $\text{NO}_3^-$  inhibiciones del 42 y 76% para 100 y 200 mM de NaCl, respectivamente.

### 8.3. Actividades enzimáticas de la fracción vegetal de los nódulos

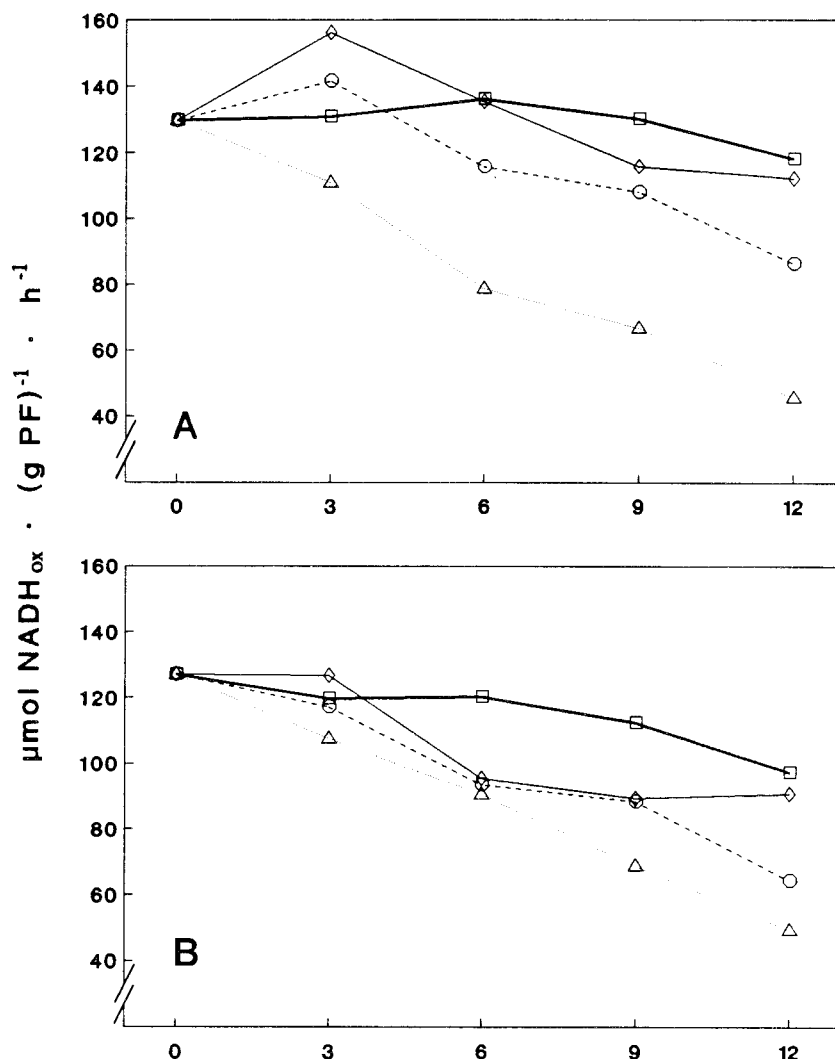
Las actividades del ciclo de la glutamato sintasa de nódulos de plantas control presentaron valores significativamente inferiores con 8 mM que con 2 mM de  $\text{NO}_3^-$  (Fig. 8.5). Con 50 mM de NaCl, tras 3 días de tratamiento salino, la actividad GS experimentó un estímulo del 4 y 6% para 2 y 8 mM de  $\text{NO}_3^-$ , respectivamente. A los 6 días, esta actividad empieza a inhibirse y al final del cultivo se obtienen inhibiciones del 20 y 13% para 2 y 8 mM de  $\text{NO}_3^-$  respectivamente. Con 100 y 200 mM de NaCl, la GS se inhibió significativamente a partir de los 6 días con 2 mM de  $\text{NO}_3^-$  y a partir de los 3 días con 8 mM de  $\text{NO}_3^-$ . En ambos niveles de  $\text{NO}_3^-$ , 50 y 100 mM afectan en la misma medida la actividad; sin embargo, 200 mM inhibe un 25% en los dos niveles de  $\text{NO}_3^-$ .

La actividad NADH-GOGAT de nódulos de plantas crecidas con 50 mM de NaCl (Fig. 8.6), al igual que la GS, experimentó un estímulo del 19 y 6% para 2 y 8 mM de  $\text{NO}_3^-$  respectivamente; este estímulo fue mayor con 2 mM que con 8 mM de  $\text{NO}_3^-$ ; posteriormente, la actividad empieza a disminuir, inhibiéndose el 6% para ambos niveles de NO en la última recogida. Con 100 mM de NaCl, experimentó un estímulo del 8% con niveles elevados de  $\text{NO}_3^-$ ; al final del periodo de tratamiento salino se inhibió un 23 y 34% con 2 y 8 mM de  $\text{NO}_3^-$  respectivamente. Con 200 mM de NaCl, desde el primer momento se inhibió en

los dos niveles de  $\text{NO}_3^-$ , hasta alcanzar inhibiciones del 59% con 2 mM y del 49% con 8 mM de  $\text{NO}_3^-$ .



**Figura 8.5.** Actividad GS, expresada en  $\mu\text{mol } \gamma\text{GH} \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , de nódulos de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, fertilizadas con 2 mM (A) y 8 mM (B) de  $\text{NO}_3^-$  y tratadas con diferentes concentraciones de NaCl, 0 (□), 50 (◇), 100 (⊖) y 200 (△) mM. MDS (0.05) = 6.84



**Figura 8.6.** Actividad NADH-GOGAT, expresada en  $\mu\text{mol NADH}_{\text{ox}} \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , de nódulos de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, fertilizadas con 2 mM (A) y 8 mM (B) de  $\text{NO}_3^-$  y tratadas con diferentes concentraciones de NaCl, 0 (□), 50 (◇), 100 (○) y 200 (△) mM. MDS (0.05) = 2.47

Los valores de actividad NADH-GDH (Fig. 8.7), fueron menores en el control con 8 mM de  $\text{NO}_3^-$ . Con 2 mM de  $\text{NO}_3^-$ , el comportamiento de esta enzima es semejante en plantas con 50 y 100 mM de NaCl, observándose un aumento significativo de actividad a los 3 días de tratamiento e inhibiéndose, a continuación, hasta el final del experimento (4%); sin embargo, con 200 mM de

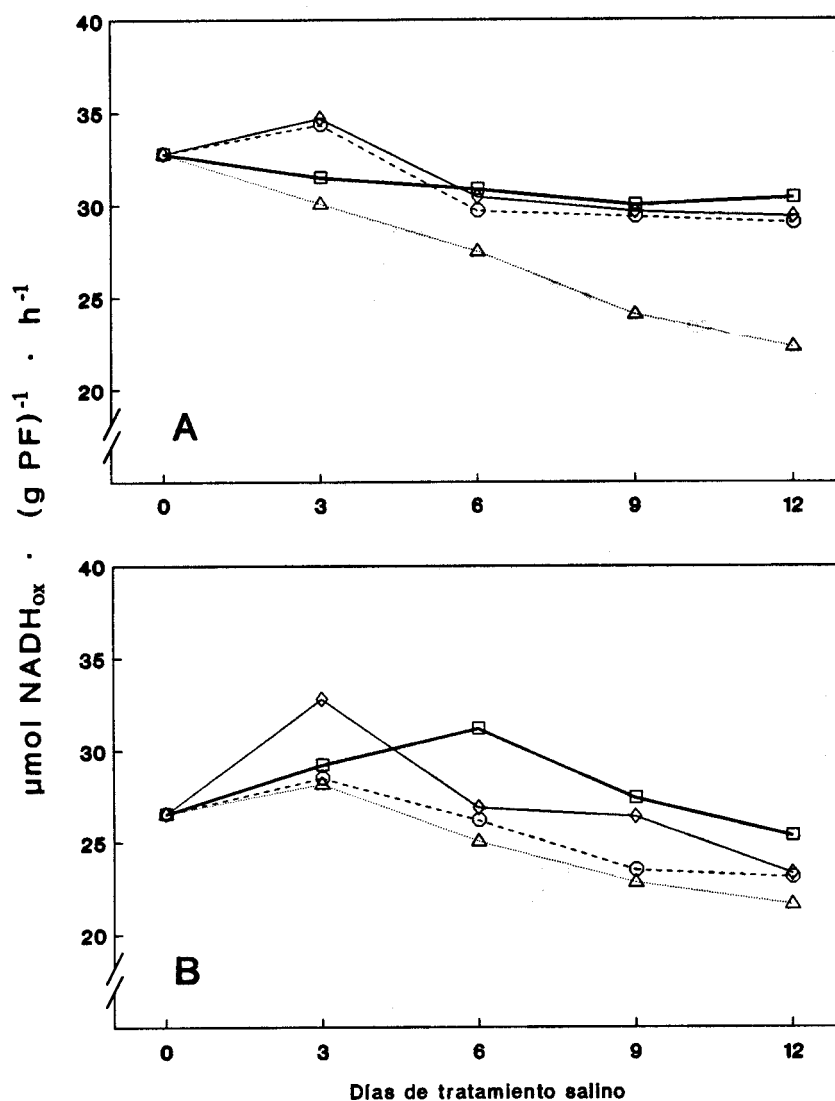
## Resultados

NaCl, se detecta inhibición desde el inicio, llegando a una inhibición final del 27%. Con 8 mM de  $\text{NO}_3^-$ , el efecto de la sal fue semejante; 50 mM de NaCl, estimuló esta actividad a los 3 días de tratamiento y disminuyó rápidamente hasta el final del cultivo (8%). Con 100 mM se alcanzó la misma inhibición final. Con 200 mM de NaCl, la inhibición se detecta desde el primer momento y llega a ser del 15% en la última recogida.

La cantidad de proteína soluble no varió en el control con ambos niveles de nitrato ensayados (Tab. 8.4). Con 50 mM de NaCl, se detecta una inhibición significativa a los 6 días en los dos niveles de  $\text{NO}_3^-$ . Con 100 y 200 mM, la caída de actividad se aprecia desde los 3 días de tratamiento. En la última recogida, con 2 mM de  $\text{NO}_3^-$  se obtienen inhibiciones del 11, 14 y 18% para 50, 100 y 200 mM de NaCl respectivamente y, con 8 mM de  $\text{NO}_3^-$  del 5% con 50 y 100 mM y del 10% con 200 mM de NaCl.

**Tabla 8.4.** Contenido en proteína soluble de nódulos de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, fertilizadas con 2 y 8 mM de  $\text{NO}_3^-$  y tratadas con diferentes concentraciones de NaCl.

Días	Concentración de $\text{NO}_3^-$	Concentración de NaCl (mM)			
		0	50	100	200
0	2	13.25	-	-	-
	8	13.14	-	-	-
3	2	13.25	13.18	12.39	12.70
	8	13.60	13.42	12.41	12.85
6	2	13.15	12.98	12.40	12.08
	8	13.34	12.68	12.13	12.27
9	2	13.68	11.84	11.71	11.10
	8	13.03	12.76	12.35	12.36
12	2	13.05	11.61	11.26	10.67
	8	13.16	12.52	12.53	11.85
MDS (0.05)			0.50		



**Figura 8.7.** Actividad NADH-GDH, expresado en  $\mu\text{mol NADH}_{\text{ox}} \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , de nódulos de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, fertilizadas con 2 mM (A) y 8 mM (B) de  $\text{NO}_3^-$  y tratadas con diferentes concentraciones de NaCl, 0 (□), 50 (◇), 100 (○) y 200 (△) mM. MDS (0.05) = 1.31

En todas las actividades enzimáticas, expresadas por mg proteína (Tabs 8.5, 8.6 y 8.7), se alcanzan valores inferiores en las plantas con 8 mM de  $\text{NO}_3^-$ . Se puede observar que a los 3 días de tratamiento con 50 y 100 mM de NaCl,

## Resultados

experimentan un incremento en ambos niveles de  $\text{NO}_3^-$ . En las sucesivas determinaciones estas actividades se inhibieron respecto del control; cabe destacar, que las inhibiciones fueron más acentuadas en plantas con 8 mM de  $\text{NO}_3^-$ . Entre las actividades del ciclo de la GOGAT, resultó más sensible a la sal la NADH-GOGAT que prácticamente duplicó su inhibición con respecto a la GS.

**Tabla 8.5.** Actividad GS, expresada en  $\mu\text{mol } \gamma\text{GH} \cdot (\text{min})^{-1} \cdot (\text{mg proteína})^{-1}$ , de nódulos de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, fertilizadas con 2 y 8 mM de  $\text{NO}_3^-$  y tratadas con diferentes concentraciones de NaCl.

Días	Concentración de $\text{NO}_3^-$	Concentración de NaCl (mM)			
		0	50	100	200
0	2	0.379	-	-	-
	8	0.359	-	-	-
3	2	0.373	0.388	0.403	0.393
	8	0.348	0.374	0.362	0.343
6	2	0.376	0.378	0.358	0.367
	8	0.345	0.345	0.367	0.345
9	2	0.378	0.375	0.352	0.351
	8	0.359	0.337	0.354	0.305
12	2	0.395	0.356	0.342	0.341
	8	0.351	0.321	0.327	0.276

El contenido en prolina soluble de la fracción citosólica de los nódulos (Tab. 8.8), mostró valores superiores en las plantas fertilizadas con 8 mM de  $\text{NO}_3^-$  y en todos los niveles de NaCl ensayados; en los controles, se detectaron valores 3 veces superiores tras 36 días de cultivo. Las plantas con 2 mM  $\text{NO}_3^-$ , aumentaron sus niveles de prolina cuando crecieron en presencia de NaCl; a los 3 días de tratamiento, el incremento se hace significativo sólo con 200 mM de

## Resultados

NaCl, a los 6 días para 100 mM y a los 9 días con 50 mM. En la última recogida, los niveles son 2 veces superiores al control con 50 mM, 15 veces con 100 mM y 17 veces con 200 mM de NaCl. Las plantas con 8 mM de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, mostraron incrementos significativos desde los 3 días de tratamiento con NaCl, con el tiempo incrementaron los valores hasta 7 veces con 50 mM, 11 veces con 100 mM y 13 veces con 200 mM de NaCl.

**Tabla 8.6.** Actividad NADH-GOGAT, expresada en  $\mu\text{mol NADH}_{\text{ox}} \cdot (\text{min})^{-1} \cdot (\text{mg proteína})^{-1}$ , de nódulos de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, fertilizadas con 2 y 8 mM de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y tratadas con diferentes concentraciones de NaCl.

Días	Concentración de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Concentración de NaCl (mM)			
		0	50	100	200
0	2	0.163	-	-	-
	8	0.161	-	-	-
3	2	0.165	0.198	0.190	0.146
	8	0.147	0.155	0.152	0.139
6	2	0.172	0.173	0.145	0.109
	8	0.150	0.126	0.129	0.122
9	2	0.159	0.156	0.165	0.100
	8	0.144	0.117	0.119	0.119
12	2	0.143	0.151	0.128	0.071
	8	0.123	0.121	0.085	0.069

**Tabla 8.7.** Actividad NADH-GDH, expresada en  $\mu\text{mol NADH}_{\text{ox}} \cdot (\text{min})^{-1} \cdot (\text{mg proteína})^{-1}$ , de nódulos de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, fertilizadas con 2 y 8 mM de  $\text{NO}_3^-$  y tratadas con diferentes concentraciones de NaCl.

Días	Concentración de $\text{NO}_3^-$	Concentración de NaCl (mM)			
		0	50	100	200
0	2	0.041	-	-	-
	8	0.034	-	-	-
3	2	0.040	0.041	0.046	0.039
	8	0.036	0.044	0.038	0.037
6	2	0.039	0.044	0.040	0.038
	8	0.039	0.035	0.036	0.034
9	2	0.037	0.039	0.042	0.036
	8	0.035	0.034	0.032	0.031
12	2	0.039	0.042	0.043	0.035
	8	0.032	0.031	0.031	0.030

**Tabla 8.8.** Contenido en prolina soluble, expresada en  $\mu\text{mol} \cdot (\text{g PF})^{-1}$ , de nódulos de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, fertilizadas con 2 y 8 mM de  $\text{NO}_3^-$  y tratadas con diferentes concentraciones de NaCl.

Días	Concentración de $\text{NO}_3^-$	Concentración de NaCl (mM)			
		0	50	100	200
3	2	0.162	0.171	0.170	0.311
	8	0.399	0.478	0.630	0.835
6	2	0.156	0.187	0.660	1.440
	8	0.521	0.956	1.491	2.165
9	2	0.175	0.231	2.325	3.090
	8	0.558	1.031	2.305	5.121
12	2	0.183	0.252	2.692	3.091
	8	0.554	4.310	6.303	8.033
MDS (0.05)		0.252			

**CARACTERIZACIÓN DE LA  
NADH-GLUTAMATO SINTASA DE  
NÓDULOS DE *Vicia faba***

**IV**

**9. PURIFICACION PARCIAL Y CARACTERIZACIÓN DE LA  
NADH-GOGAT DE LA FRACCIÓN VEGETAL DE NÓDULOS DE  
*V. faba***

**9.1. Purificación parcial de la NADH-GOGAT de nódulos de *V. faba***

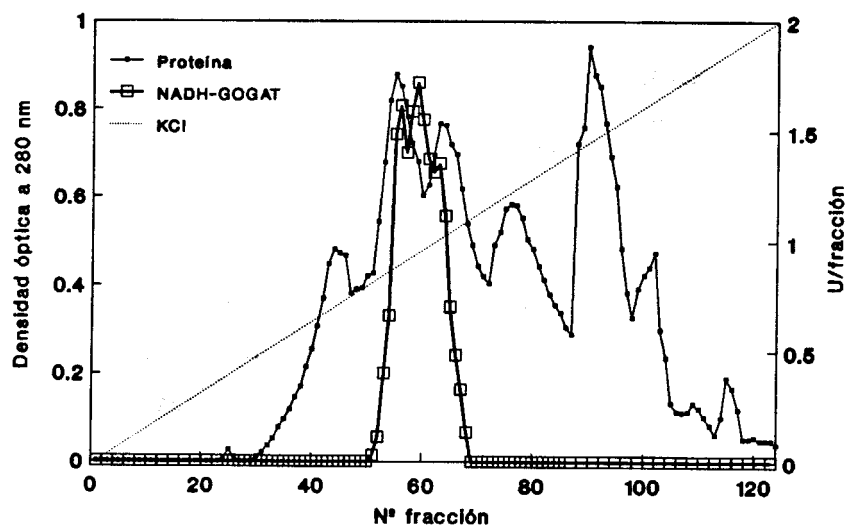
Utilizando procesos cromatográficos de intercambio iónico y filtración en gel, se ha conseguido purificar 74 veces la NADH-GOGAT de la fracción citosólica de nódulos de *V. faba*, obteniéndose una actividad específica final de  $3 \mu\text{mol} \cdot (\text{min})^{-1} \cdot (\text{mg de proteína})^{-1}$  y un rendimiento del 32% (Tab. 9.1). Es importante destacar, que al final del proceso de purificación se obtiene baja cantidad de proteína, 234 veces menor que la inicial, como consecuencia de la labilidad de la enzima estudiada la purificación fue sólo de 74 veces.

**Tabla 9.1.** Purificación parcial de la NADH-GOGAT de la fracción vegetal de nódulos de *V. faba* inoculada con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*. La tabla es media de 6 experimentos

Etapa de purificación	Actividad total	Proteína total	Actividad específica	Purificación	Rendimiento
	<i>unidades</i>	<i>mg</i>	<i>unidades · mg</i> <i>proteína<sup>-1</sup></i>	<i>veces</i>	<i>%</i>
Extracto crudo	25.01	694.93	0.036	1.0	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	22.95	249.24	0.092	2.6	92
DEAE-sephacel	15.65	7.87	1.989	55.2	63
Sephacril S-300	7.91	2.97	2.660	74.0	32

Una vez obtenido el extracto crudo, se procedió a concentrar la proteína mediante precipitación con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Al tratarse de una precipitación fraccionada se eliminó una gran cantidad de proteína sin que apenas se afectase la actividad NADH-GOGAT total, que se recuperó entre el 30 y 60% de saturación, consiguiéndose de esta forma una actividad específica 2.6 veces superior.

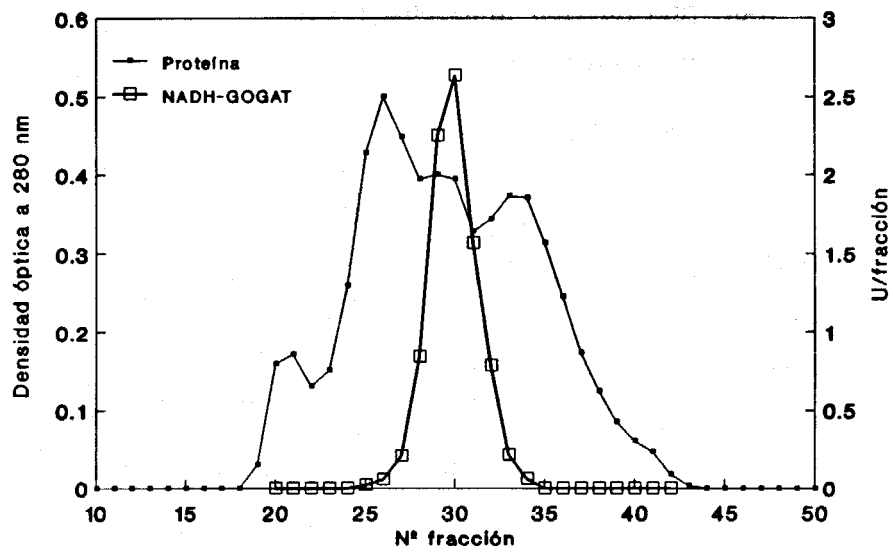
La disolución concentrada de proteínas se eluyó por una columna de DEAE-sephacel. En el perfil de elución (Fig. 9.1) se puede observar que el pico de mayor actividad eluye a 0.24 M de KCl. Entre las fracciones con actividad se seleccionaron aquellas que tenían menos proteína total, desde la 54 hasta la 65 y se obtuvo un rendimiento del 63%.



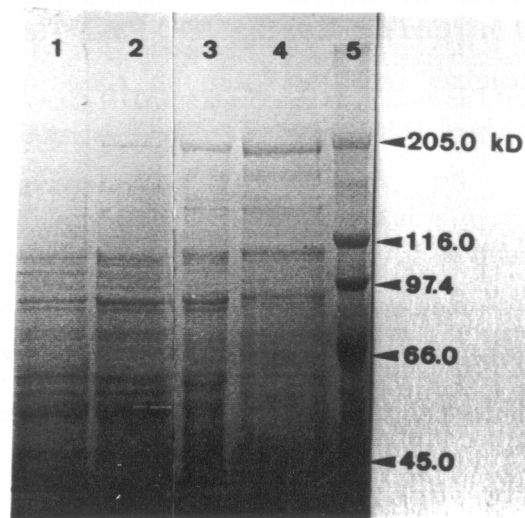
**Figura 9.1.** Perfil de elución de la actividad NADH-GOGAT, en gradiente de KCl (0.1-0.4 M), a través de una columna de DEAE-sephacel.

El concentrado del DEAE-sephacel se pasó por una columna de Sephacril S-300. Según el perfil de elución (Fig. 9.2), el pico de actividad aparece desplazado respecto al pico de proteína, de esta forma se eliminó gran cantidad de proteínas de elevado peso molecular que podrían interferir en la obtención de una banda de NADH-GOGAT separada del resto de la proteína en geles de poliacrilamida.

En la figura 9.3, se presenta la electroforesis en SDS de las etapas de purificación. Se observa claramente cómo la primera banda corresponde a la NADH-GOGAT y se encuentra totalmente separada del resto de las proteínas y por tanto, utilizada para la obtención de anticuerpos.



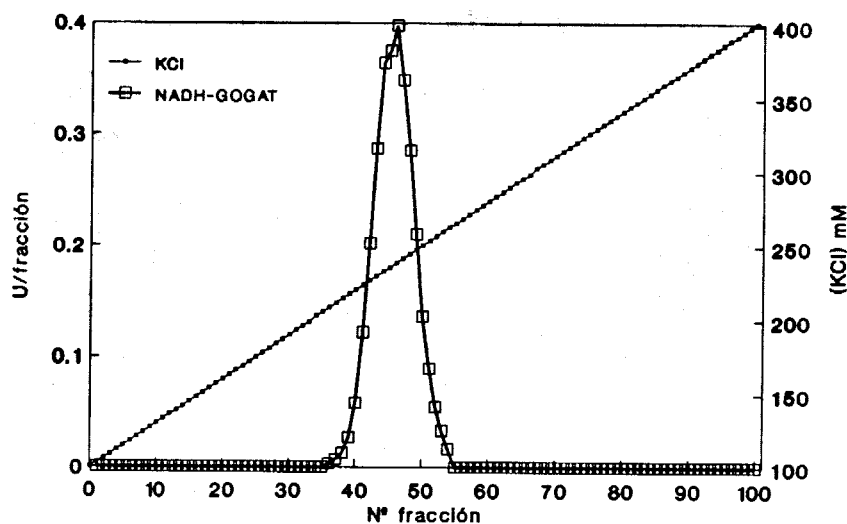
**Figura 9.2.** Perfil de elución de la actividad NADH-GOGAT cuando pasa por una columna de Sephacril S-300.



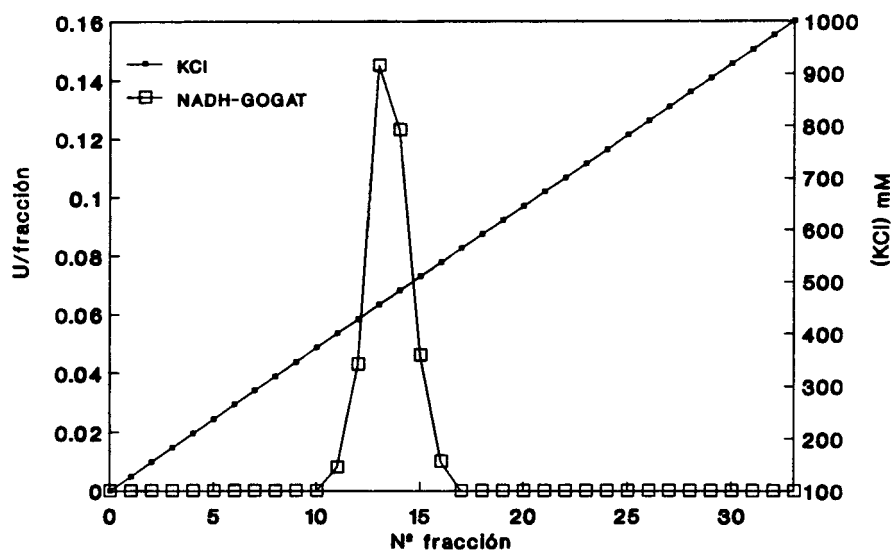
**Figura 9.3.** Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida de las distintas etapas de purificación; (1) extracto crudo, 23 µg de proteína; (2)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 25 µg de proteína; (3) DEAE-sephacell, 25 µg de proteína; (4) Sephacril S-300, 9.3 µg de proteína; (5) marcadores del peso molecular: miosina (205 kD),  $\beta$ -galactosidasa (116 kD), fosforilasa b (97.4 kD), seroalbúmina (66 kD) y ovoalbúmina (45 kD).

## 9.2. Determinación de posibles isoformas de la NADH-GOGAT

La elución por DEAE-sephacel (Fig. 9.1) cuestionó la posible existencia de dos isoenzimas de la NADH-GOGAT en nódulos de *V. faba*. El concentrado de proteínas obtenido por precipitación fraccionada con sulfato amónico, se sometió a dos cromatografías de intercambio iónico consecutivas en geles de DEAE-sepharosa y Q-sepharosa (Figs 9.4 y 9.5). En ambas eluciones se obtuvo un solo pico de actividad NADH-GOGAT, actividad que eluyó a 0.24 M de KCl en la DEAE-sepharosa y a 0.36 M de KCl en la Q-sepharosa.



**Figura 9.4.** Perfil de elución de la actividad NADH-GOGAT, con gradiente de KCl (0.1-0.4 M), a través de una columna de DEAE-sepharosa.

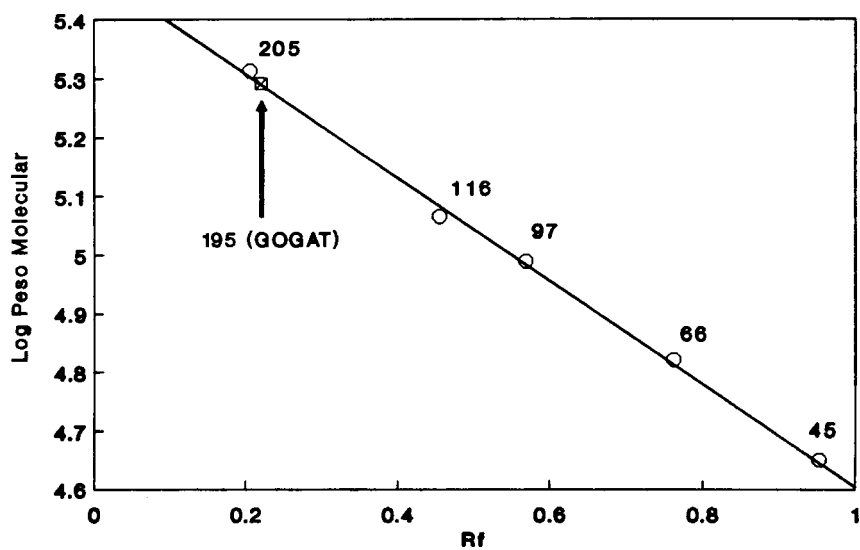


**Figura 9.5.** Perfil de elución de la actividad NADH-GOGAT, con gradiente de KCl (0.1-1 M), a través de una columna de Q-sepharosa.

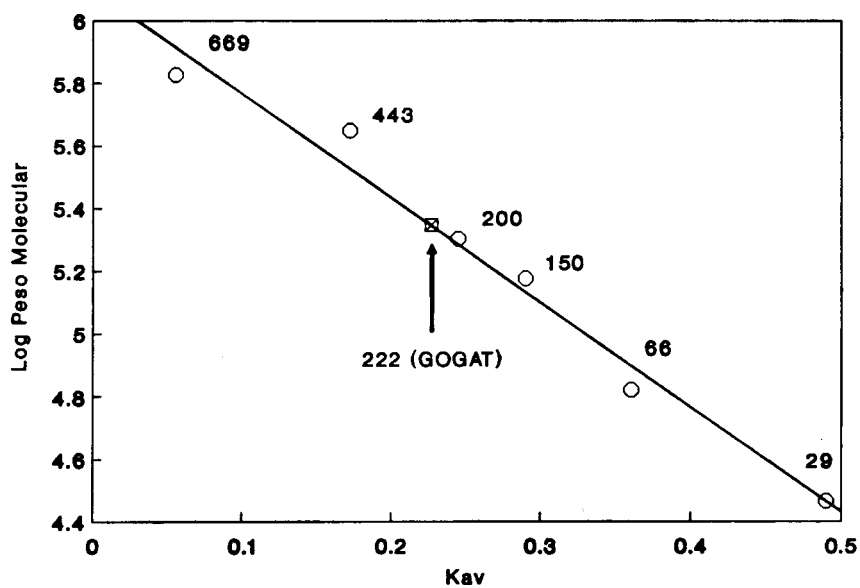
### 9.3. Determinación del peso molecular de la NADH-GOGAT

Según la electroforesis desnaturalizante en SDS-poliacrilamida de la preparación parcialmente purificada de NADH-GOGAT, se comprobó que la enzima migra como una banda mayoritaria de proteína de peso molecular estimado de aproximadamente  $195 \pm 2$  kD, según la recta de calibrado construida con los datos de movilidad electroforética de los marcadores (Fig. 9.6).

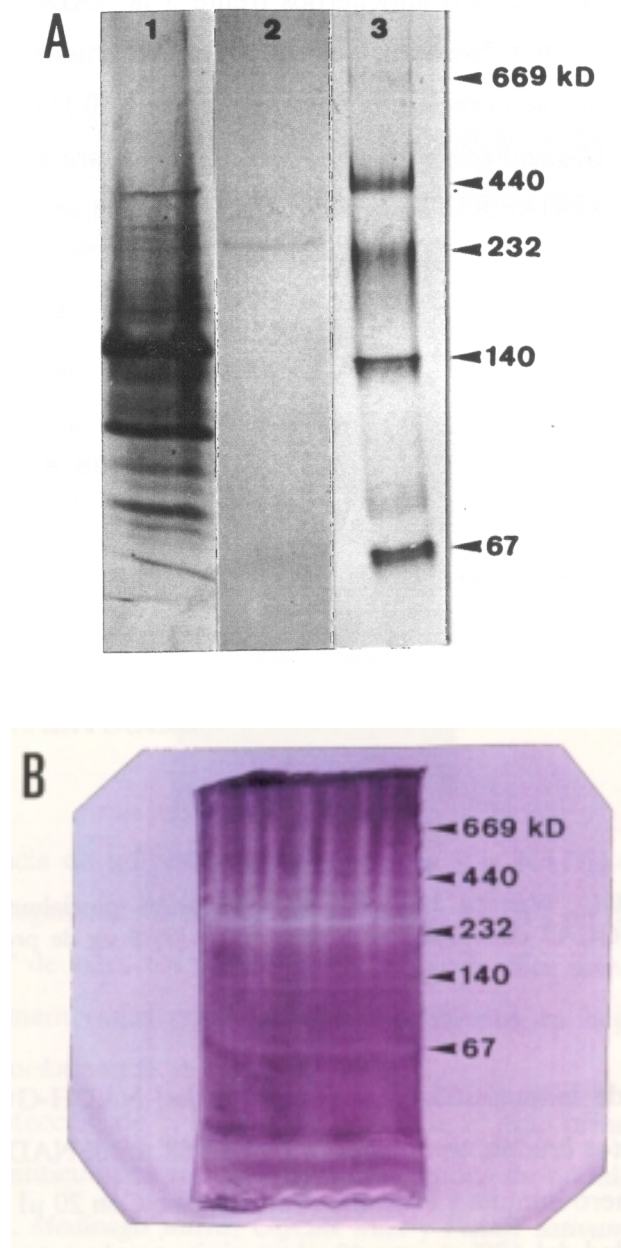
El peso molecular nativo de la NADH-GOGAT se determinó por cromatografía de exclusión molecular y por electroforesis nativa en gradiente de poliácridamida. Mediante filtración en Sephacril S-300, el peso molecular resultó en torno a  $222 \pm 5$  kD (Fig. 9.7). Al utilizar la electroforesis en gradiente de poliácridamida mediante tinciones de actividad, la estimación del peso molecular fue algo mayor,  $236 \pm 3$  kD (Fig. 9.8).



**Figura 9.6.** Determinación del peso molecular de la subunidad de la NADH-GOGAT mediante electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida con SDS. Marcadores: miosina (205 kD),  $\beta$ -galactosidasa (116 kD), fosforilasa b (97.4 kD), seroalbúmina (66 kD) y ovoalbúmina (45 kD).



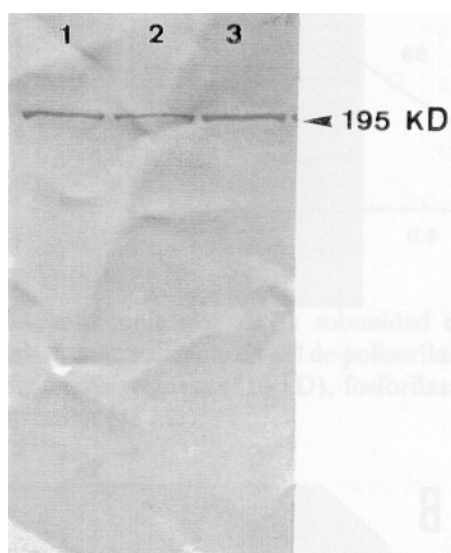
**Figura 9.7.** Determinación del peso molecular nativo de la NADH-GOGAT mediante filtración en Sephacril S-300. Marcadores: tiroglobulina (669 kD), apoferritina (443 kD),  $\beta$ -amilasa (200 kD), alcohol deshidrogenasa (150 kD), seroalbúmina bovina (66 kD) y anhidrasa carbónica (29 kD).



**Figura 9.8.** Electroforesis nativa de la NADH-GOGAT de nódulos de *V. faba* en gradiente de poliacrilamida (4.5-10%). A. (1) extracto crudo (11,4 µg de proteína), tinción por Coomassie; (2) preparación parcialmente purificada (25 µg de proteína), tinción positiva por actividad; (3) marcadores del peso molecular: tiroglobulina (669 kD), ferritina (440 kD), catalasa (232 kD), lactato deshidrogenasa (140 kD) y albúmina bovina (67 kD). B. Tinción negativa por actividad de un extracto crudo (100 µg de proteína/pocillo).

## 10. ESTUDIO REALIZADO CON SUERO ANTI-GOGAT

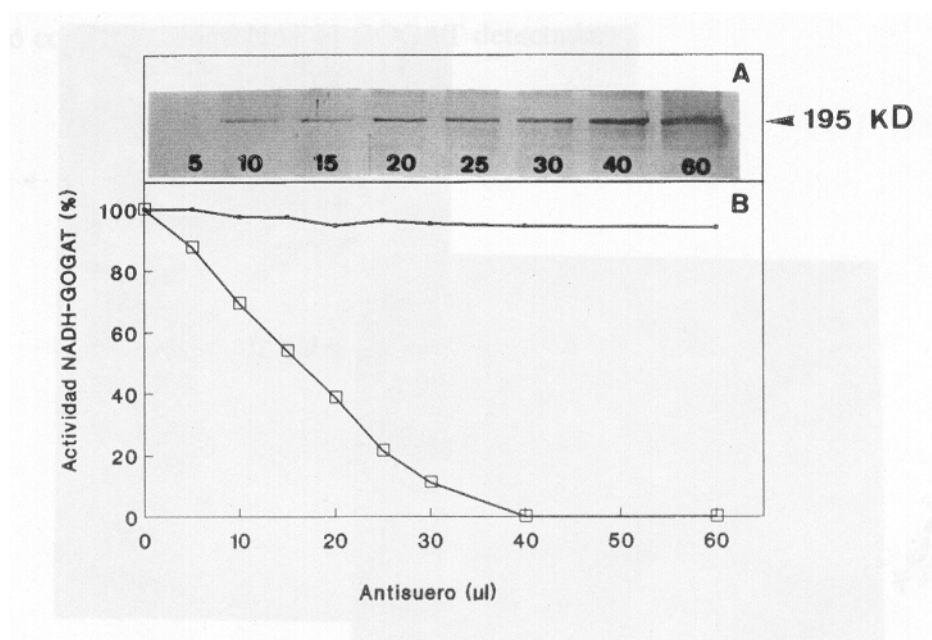
La especificidad de los anticuerpos frente a la NADH-GOGAT de nódulos de *V. faba* se comprobó por "western blot" de extractos crudos de nódulos sometidos a SDS-PAGE, en el que se aprecia una única banda (Fig. 10.1) correspondiente a un peso molecular de 195 kD, siendo coincidente con el calculado para la preparación parcialmente purificada de la NADH-GOGAT. Se utilizó suero inmune en dilución 1:100 con PBS.



**Figura 10.1.** "Western blot" de la preparación parcialmente purificada de NADH-GOGAT de nódulos de *V. faba*: (1) y (2) 5 µg de proteína; (3) 9 µg de proteína.

La curva de inmunotitulación de la actividad NADH-GOGAT (Fig. 10.2 B), se realizó con extractos crudos, con una actividad de  $68 \mu\text{mol NADH}_{\text{ox}} \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , a los que se adicionó suero inmune y Proteína A-sepharosa. Con 20 µl de suero se produce una pérdida de actividad del 60% y con 40 µl precipita totalmente. La electroforesis de los inmunoprecipitados y posterior "western blot"

con suero anti-GOGAT (Fig. 10.2 A) muestra un incremento de la banda correspondiente a 195 kD conforme aumenta el volumen de suero inmune adicionado.



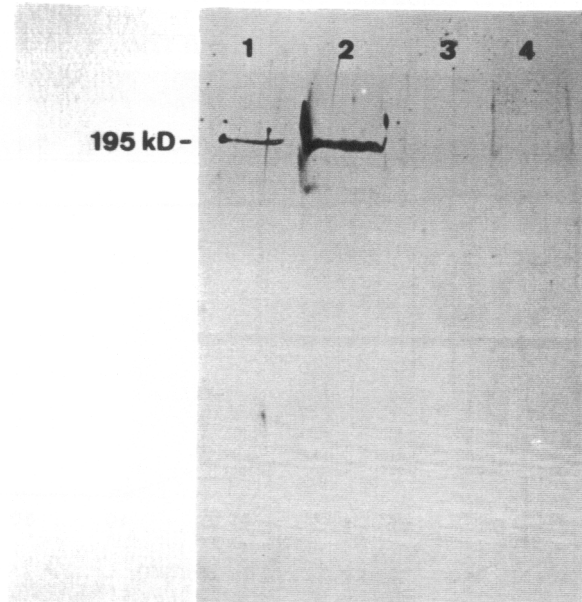
**Figura 10.2.** Inmunotitulación de la NADH-GOGAT de nódulos de *V. faba*. A. "Western blot" de los inmunocomplejos. B. Curva de la inmunotitulación de la actividad NADH-GOGAT.

La presencia de un polipéptido semejante a la NADH-GOGAT de nódulos de *V. faba* en otros órganos de la planta, como en raíz y hoja y en bacteroides, se comprobó por "western blot" de extractos crudos de cada uno de ellos sometidos a SDS-PAGE. El revelado de las membranas no mostró reconocimiento en hoja y bacteroide, pero sí apareció una pequeña banda en raíz (Fig. 10.3).

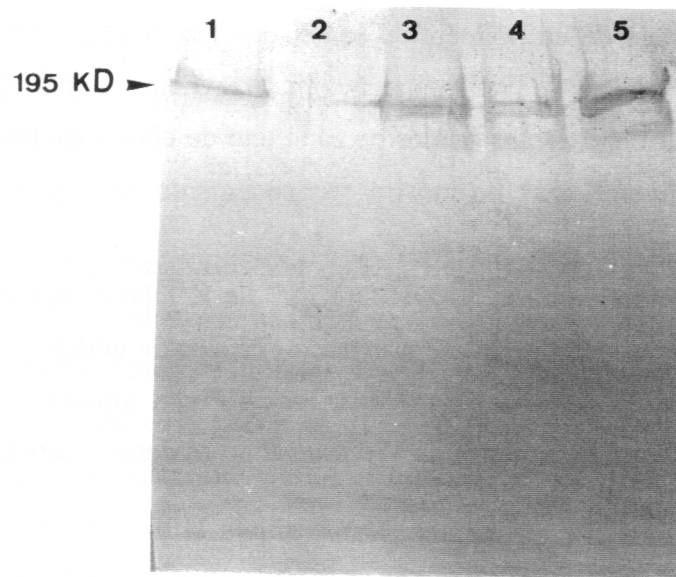
Tras la detección de la NADH-GOGAT de *V. faba* principalmente en nódulos, se ensayaron los anticuerpos frente a extractos crudos de nódulos de otras leguminosas como *Vicia sativa*, *Medicago sativa*, *Glycine max* y *Pisum*

## Resultados

*sativum*. En todas las especies hubo reconocimiento. En nódulos de *Vicia sativa* no se detectó actividad, siendo la banda de reconocimiento muy tenue.

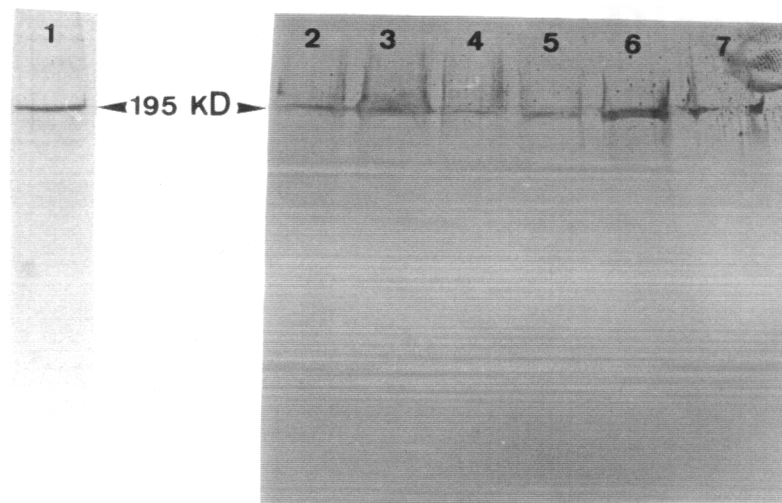


**Figura 10.3.** "Western blot" de proteínas solubles de *V. faba*: (1) raíz; (2) nódulos efectivos; (3) bacteroides y (4) hojas, revelado con suero anti-GOGAT de nódulos de *V. faba*. Se utilizaron 25  $\mu$ g de proteína en cada carril.



**Figura 10.4.** "Western blot" de proteínas solubles de nódulos de: (1) *Vicia faba*; (2) *Vicia sativa*; (3) *Medicago sativa*; (4) *Glycine max* y (5) *Pisum sativum*, revelado con suero anti-GOGAT de nódulos de *V. faba*. La actividad NADH-GOGAT fue de 50, 0, 78, 46 y 74  $\mu\text{mol} \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , respectivamente. En cada carril se cargaron 35  $\mu\text{g}$  de proteína.

Extractos crudos de nódulos de distintos genotipos de *V. faba* sometidos a SDS-PAGE, se ensayaron por "western blot" frente a los anticuerpos anti-GOGAT (Fig. 10.5); en todos ellos hubo reconocimiento, aunque la intensidad de tinción no se correspondió con la actividad NADH-GOGAT detectada.



**Figura 10.5.** "Western blot" de proteínas solubles de nódulos distintos genotipos de *V. faba*: (1) cv. Alborea; (2) VF51; (3) VF61; (4) VF52; (5) VF60; (6) VF184 y (7) VF6 (60, 6, 54, 17, 47, 50 y 65  $\mu\text{mol} \cdot \text{NADH}_{\text{ox}} \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , respectivamente) revelado con suero anti-GOGAT de nódulos de *V. faba*.

PARTE 5

## **Discusión**

---



## Efecto del NaCl sobre el crecimiento de *R. leguminosarum* biovar. *viceae*

Al estudiar el efecto de la salinidad en la simbiosis *V. faba*-*R. leguminosarum*, es interesante considerar la tolerancia del microsimbionte en vida libre, puesto que la inhibición de la nodulación en leguminosas bajo estrés salino, puede deberse en gran parte, a la incapacidad de *Rhizobium* para sobrevivir en el medio (Singleton y Bohlool, 1984; Zahrah y Sprent, 1986).

La tolerancia a la salinidad se ha descrito en distintas cepas de *Rhizobium* (Botsford, 1984; Mohammad *et al.*, 1991) y *Bradyrhizobium* (Velagaleti y Marsh, 1989). Las cepas de *R. leguminosarum* biovar. *viceae* ensayadas en este trabajo (Fig. 1.1), mostraron gran variabilidad en su respuesta al estrés salino, esto sería consecuencia de su variación genética (Mohammad *et al.*, 1991) que es consistente con la existencia de una información primaria (Filippova, 1959). Entre las cepas de *R. leguminosarum* biovar. *viceae* crecidas con 75 mM de NaCl, destacan tres cepas de crecimiento rápido (Fig. 1.1), GRI32, GRA19 y GRL8, con bajos porcentajes de inhibición en D.O. (Tab. 1.1) y que permiten considerarlas como tolerantes (Velagaleti *et al.*, 1989; Mohammad *et al.*, 1991).

Niveles de 50 mM de NaCl modifican la viabilidad celular de *R. leguminosarum* GRA19, sin que cambie la turbidez del cultivo (Fig. 2.1), al igual que ocurre con cepas de *R. meliloti* crecidas con NaCl (Mohammad *et al.*, 1991). Las concentraciones superiores condicionaron un retraso de la entrada a fase logarítmica en función de la viabilidad celular. Esta respuesta ha sido descrita por Graig *et al.* (1991) en cepas de *Rhizobium* que infectan a acacias. El crecimiento de la cepa GRA19 a dosis de NaCl elevadas (100 mM) confirma la tolerancia y resistencia de *Rhizobium* en vida libre. Lauter *et al.* (1981) encontraron cepas de *Rhizobium* que infectan a garbanzo, capaces de crecer con 250 mM de NaCl, Hua

*et al.* (1982) hallaron rhizobios que sobreviven con 500 mM y Kassem *et al.* (1985) describen 3 cepas de *R. meliloti* que crecen con 600 mM de NaCl.

Con 75 y 100 mM (Fig. 2B), no se detecta efecto del NaCl en la primera generación, continúa un periodo de inhibición máxima seguido de un aumento del crecimiento, constituyendo de esta forma una inhibición trifásica dependiente de la concentración de NaCl, como se ha descrito para cepas de *R. japonicum* cuando crecen con factores inhibidores del crecimiento (Jones *et al.*, 1985).

### **Caracterización del ciclo de la glutamato sintasa en nódulos de *V. faba***

Las leguminosas requieren la utilización complementaria de N<sub>2</sub> atmosférico y nitrógeno combinado del suelo para conseguir el máximo crecimiento (Streeter, 1988), así la aplicación de bajos niveles de nitrógeno combinado suplementa la fijación de N<sub>2</sub>, obteniéndose una mejor expresión de la capacidad de crecimiento y de la productividad de la planta (Eaglesham *et al.*, 1983). En estas condiciones de nutrición nitrogenada (2 mM de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) se ha estudiado la evolución del metabolismo simbiótico durante la ontogenia de la planta y a lo largo del fotoperiodo.

En estudios similares llevados a cabo con otras leguminosas (Buttery y Gibson, 1990), el contenido en nitrógeno y el peso seco de la planta presentó coeficientes de correlación elevados con la masa nodular y la ARA por planta. En este trabajo se evidencian resultados semejantes con *V. faba* cv. Alborea (Tab. 3.1). Es interesante resaltar la evolución paralela que siguen el peso seco total y el contenido en nitrógeno (Fig. 3.1). El nivel de nitrógeno combinado presente en el medio de crecimiento es bajo, por lo que la mayor parte del nitrógeno que

incorpora la planta procede de la fijación simbiótica como se ha puesto de manifiesto en otros trabajos (Hervás *et al.*, 1991).

El estudio de la capacidad fijadora de  $N_2$  en la simbiosis, medida por ARA, mostró un pico de actividad 16 días después de la inoculación; este pico de actividad se ha detectado en distintos momentos del desarrollo de la planta en otras leguminosas como soja (Graham y Rosas, 1977), judía (Franco *et al.*, 1979) y alfalfa (Ligero *et al.*, 1986). La masa nodular y la ARA por planta, se estabilizan a inicio de floración (40 días), manteniéndose estable hasta inicio de fructificación. Igual se ha demostrado en otros genotipos de *V. faba* (Dean y Clark, 1980). Sin embargo, en trebol (Vessey y Patriquin, 1984), alfalfa (Wery, 1986) y guisante (Bethlenfalvay *et al.*, 1978; LaRue y Kurtz, 1973), la ARA por planta disminuye después del inicio de la floración.

La canalización de los electrones por la nitrogenasa hacia la reducción de  $N_2$  ó  $H^+$  viene determinada por la eficiencia relativa (Evans *et al.*, 1981; Simpson y Burris, 1984), con valores máximos cercanos a 0.75. En *V. faba* cv. Alborea, nodulada con *R. leguminosarum* GRA19, los valores se mueven en torno a 0.85, por lo que no se descarta la presencia de una hidrogenasa como se ha descrito para otras cepas de *R. leguminosarum* biovar. *viciae* (Truetsen y Wyndade, 1984), *R. meliloti* (Ruiz-Argüeso *et al.*, 1979), *Bradyrhizobium japonicum* (Evans *et al.*, 1981; Brewin, 1984; Evans *et al.*, 1987) y *Azorhizobium caulinodans* (Stam *et al.*, 1984).

El amonio, primer producto estable de la fijación de  $N_2$  en bacteroides (Bergersen y Turner, 1967), se excreta al citosol del nódulo donde es asimilado en compuestos orgánicos (Givan, 1979; Rawsthorne *et al.*, 1980; Mifflin y Lea, 1982). La vía principal de asimilación la constituye el ciclo de la glutamato sintasa (Lea *et al.*, 1990). Las enzimas GS y NADH-GOGAT, siguen pautas de

comportamiento muy parecidas que se manifiestan por una correlación positiva y significativa entre ellas (0.866) (Tab. 3.1). Alcanzan el máximo inmediatamente después del pico de ARA específica y se mantienen estables hasta la aparición de los botones florales, coincidiendo con el máximo valor de ARA por planta, después la GS cae suavemente y la NADH-GOGAT lo hace de forma brusca. En estudios realizados con nódulos de alfalfa (Egli *et al.*, 1989) las enzimas del ciclo de la glutamato sintasa mostraron un comportamiento similar al mencionado con *V. faba*, las actividades máximas se alcanzan tras el disparo de la ARA específica y el descenso de la NADH-GOGAT es más acentuado que el de la GS.

La actividad GS no se correlaciona con el crecimiento y la cantidad de nitrógeno fijado, se podría pensar que se encuentra en exceso para asimilar todo el amonio que los nódulos son capaces de producir (Groat *et al.*, 1984). No obstante, resultados recientes obtenidos con otros genotipos y otras cepas de *R. leguminosarum* (Caba *et al.*, 1993) indican que esto puede depender del genotipo de la planta y la cepa de *Rhizobium*. Sin embargo, en *Phaseolus vulgaris*, se ha sugerido que la GS puede constituir un paso limitante en la fijación de nitrógeno (Pacovsky y Fuller, 1991). De hecho, *V. faba* cv. Alborea muestra un patrón de expresión paralelo al de la fijación de nitrógeno como describen otros autores (Lara *et al.*, 1984; Egli *et al.*, 1989). En algunas leguminosas ambas enzimas se han descrito como nodulinas (Verma *et al.*, 1986; Cullimore y Bennet, 1988).

La actividad NADH-GDH, incrementó ligeramente con el desarrollo del nódulo, sus valores iniciales sólo se duplicaron, mientras que las actividades GS y NADH-GOGAT aumentaron unas 90 veces. Sobre la base de proteína soluble, la actividad NADH-GDH disminuye en el desarrollo del nódulo, se puede pensar que esta enzima no se asocia a la fijación de nitrógeno. Estos resultados son similares a los obtenidos con otros genotipos de *V. faba* (Caba *et al.* 1992). Groat y Vance (1981), observaron que en *Medicago sativa*, la actividad NADH-GDH

tampoco se asocia con la fijación de nitrógeno y está más relacionada con procesos de senescencia del nódulo.

La proteína soluble del nódulo mostró un perfil de evolución semejante al de las enzimas de la asimilación del amonio y similar al descrito para nódulos de alfalfa (Egli *et al.*, 1989).

En diversas simbiosis de leguminosas de zonas tropicales, se han observado pronunciadas fluctuaciones diurnas en la actividad nitrogenasa medida como ARA (Minchin y Pate, 1974; Rainbird *et al.*, 1983). Estas fluctuaciones también se han descrito por Roskoski y van Kessel (1985). Estos autores indican que se muestra un pico de ARA a mitad del fotoperiodo. En el estudio de la ARA en nódulos de *V. faba* cv. Alborea durante 48 h, se detectó un pico de actividad entre las 4 y 7 h de luz y rápidamente decae hasta llegar a valores mínimos en oscuridad. Sin embargo, en soja, la ARA se mantiene constante las 24 h del día (Patterson y LaRue, 1983). En especies tropicales y subtropicales, tampoco se detecta pico de ARA, sino que incrementa a lo largo del periodo de luz (Sellstedt *et al.* (1989).

Las enzimas del ciclo de la glutamato sintasa muestran un comportamiento rítmico con independencia de la alternancia de los ciclos luz-oscuridad, observándose máximos y mínimos de actividad tanto en el fotoperiodo como en el nictiperiodo, si bien las oscilaciones entre valores máximos y mínimos fueron mayores para la NADH-GOGAT. Fernández-Conde *et al.* (1992) en un estudio realizado con hojas de girasol describen, un comportamiento rítmico de la Fd-GOGAT no controlado por las condiciones ambientales luz-oscuridad que atribuyen a un reloj biológico de mecanismo poco conocido y, una evolución de la GS totalmente dependiente de la luz, con valores máximos durante el fotoperiodo y con valores mínimos durante el nictiperiodo. Es interesante

destacar que se ha descrito una ritmicidad distinta de la misma enzima en parte aérea y en raíz (Rufty *et al.* 1992), además no se puede olvidar que el nódulo es un órgano que posee enzimas (nodulinas) que no se expresan en la planta; por tanto la GS puede mostrar un comportamiento distinto a los descritos en otros órganos.

### **Efecto del estrés salino en la simbiosis de *V. faba***

La fase de la ontogenia en que las plantas se someten a estrés salino puede ser determinante en las consecuencias observadas en la simbiosis de *V. faba*. Durante el crecimiento y desarrollo de plantas de *V. faba* cv. Alborea, se detectan dos etapas de crecimiento activo (Fig. 3.1), una durante el crecimiento vegetativo y otra en el reproductor.

Cuando las plantas crecen en presencia de NaCl desde el inicio, la inhibición del peso seco se detecta en las etapas de crecimiento activo. Dosis elevadas de sal (75 y 100 mM de NaCl) manifiestan sus efectos durante el crecimiento vegetativo mientras que dosis menores (50 mM) afectan durante el crecimiento reproductor. Sin embargo, cuando el NaCl se aplica al final de la primera etapa de crecimiento activo, los efectos sobre el crecimiento se observan en la mitad de tiempo (Fig. 6.1).

Esta inhibición del crecimiento, es más acentuada en la parte aérea que en el sistema radical. En estudios realizados por Wignarajah (1990) con *Phaseolus vulgaris*, se obtienen respuestas similares que explica por la hipótesis del "equilibrio funcional" (Brouwer, 1963), según la cual, la inhibición de la actividad fisiológica de las hojas en las plantas crecidas bajo estrés salino y el incremento en los requerimientos de la raíz para buscar el agua y minerales que

necesita la planta, daría lugar a un desplazamiento de los nutrientes hacia la raíz. Esta hipótesis se sustenta en *V. faba* cv. Alborea, al observar las características morfológicas de las plantas crecidas en estrés salino, con hojas pequeñas con necrosis y tallos con entrenudos cortos (Fig. 5.2).

Sin embargo, el incremento en la relación R/PA no es extensible a todos los genotipos (Tab. 7.1) de *V. faba*. En trabajos llevados a cabo por Seeman y Critchley (1985) en *Phaseolus vulgaris* obtienen incrementos del 50% en plantas crecidas con 75 mM de NaCl. En oposición a esto, Elsheikh y Wood (1990) detectaron que la sal afecta más al crecimiento de la raíz que al de la parte aérea en *Cicer arietinum*.

El aumento de la concentración de sal condiciona la disminución del contenido en nitrógeno orgánico reducido en *V. faba*, al igual que se ha descrito para algodón y cacahuete (Leidi *et al.*, 1992). Las plantas crecidas con sal desde el inicio, presentaron una disminución mayor que la detectada en el crecimiento. Sin embargo, en las que se someten al estrés en crecimiento avanzado se observa que la disminución del contenido en nitrógeno es menor que la encontrada en el crecimiento, como ocurre en soja (Wahab y Zahram, 1981). En estudios realizados por otros autores (Bernstein y Ogata, 1966; Singleton, 1983; Weil y Khalil, 1986) no detectan reducción del contenido en nitrógeno.

El número de nódulos se encuentra totalmente establecido en plantas de 28 días, con valores que no varían en sucesivas recogidas. Sin embargo, en experimentos realizados con *Cicer arietinum* (Elsheikh y Wood, 1990), el número de nódulos incrementó con el tiempo. En las plantas de *V. faba* cv. Alborea que crecen desde el inicio en presencia de NaCl, el número de nódulos se inhibió con el aumento de sal en el medio llegando a una disminución del 52% con 100 mM de NaCl. En estudios realizados por Zahran y Sprent (1986) con

*V. faba*, la nodulación se inhibió un 50% con 100 mM de NaCl. Esta inhibición es menor que la encontrada para soja, que se inhibe un 80% con 80 mM de NaCl (Singleton y Bohlool, 1984).

Generalmente *Rhizobium* es más resistente a la salinidad que sus plantas hospedadoras (Sprent, 1984), hecho que también se pone de manifiesto en este trabajo. Al comparar el efecto de la sal en el crecimiento de *R. leguminosarum* GRA19 y la nodulación, se comprueba que el número de células viables se inhibe un 30% menos que el número de nódulos. A esa mayor inhibición de la nodulación puede contribuir una reducción en el número de pelos radicales y/o en el encurvamiento de estos así como en la plasmolisis observada en células de la rizodermis (Zharan y Sprent, 1986).

El efecto negativo que el estrés salino ejerce en la masa nodular sólo se manifestó en las plantas tratadas con sal desde el inicio del cultivo (Figs 5.4 y 6.2). La disminución de la masa nodular es menor que la del número de nódulos, resultados que difieren de los encontrados por otros autores (Elsheikh y Wood, 1990). De hecho, plantas de *V. faba* con concentraciones elevadas de NaCl desde el inicio, presentaban nódulos de tamaño desproporcionado y blanquecinos (Fig. 7.3) como consecuencia de la disminución del contenido en leghemoglobina (Garrido, 1992). Nódulos de características parecidas han sido descritos por Yousef y Sprent (1983) en *V. faba*.

La inhibición de la actividad nitrogenasa específica en medios salinos se ha estudiado en *Glycine max* (Weil y Khalil, 1986) y *Vigna radiata* (Hafeez *et al.*, 1988). La ARA específica de plantas de *V. faba* se inhibió en todas las concentraciones de NaCl ensayadas, con efectos inmediatos tras su aplicación (Fig. 6.4). La inhibición puede haber sido causada de forma directa o indirecta a través de un efecto del NaCl sobre el crecimiento y metabolismo de la planta. En

*Vigna radiata* resultó más afectado el crecimiento de los nódulos que la actividad nitrogenasa específica en plantas que se someten al NaCl después de la nodulación (Hafeez *et al.*, 1987), al contrario de lo que se ha detectado en este trabajo con *V. faba*.

En relación con las enzimas del ciclo de la glutamato sintasa, la inhibición se intensificó con la concentración de sal. En las plantas que crecen desde el inicio con NaCl se inhibió más la NADH-GOGAT que la GS (Tab. 5.3), mientras que en aquellas que se someten a estrés en periodo avanzado de crecimiento, ambas enzimas presentan inhibiciones semejantes (Figs 6.6 y 6.7).

La disminución en el contenido en proteína soluble es una respuesta típica al estrés salino, demostrada en leguminosas (Bourgeais-Choillou *et al.*, 1992) y en otras especies vegetales (Barnett y Naylor, 1966; Abdul-Kadir y Paulsen, 1982). La reducción de proteína del nódulo fue mayor en plantas que crecen desde el inicio con sal que en aquellas que se someten a estrés cuando los nódulos están perfectamente formados (Tabs 5.5 y 6.4).

La utilización de distintos genotipos de *V. faba* mostró que, no solamente diferentes cultivos varían con respecto a su tolerancia a la sal sino que, también dentro de la misma especie hay gran variedad de respuestas. El crecimiento (Fig. 7.1), número de nódulos (Fig. 7.4) y masa nodular (Fig. 7.5) de plantas en presencia de 75 mM de NaCl, no se inhibió en los genotipos VF46, 64 y 112 de *V. faba*, que por otra parte son los que presentan un crecimiento menor (Fig. 7.2). El crecimiento de *Phaseolus vulgaris* se inhibe un 77% con 50 mM de NaCl y un 91% con 150 mM (Seeman y Critcheley, 1985). Las inhibiciones para el crecimiento de los genotipos VF46, 64 y 112 fueron del 22, 18 y 33% respectivamente. El algodón se considera como planta tolerante no halofita (Greenway y Munns, 1980); con 50 mM de NaCl inhibe el crecimiento un 27% y

con 250 mM un 58% (Brugnoli y Lauter, 1991). Si se comparan estas inhibiciones con las observadas para las líneas VF46, VF64 y VF112, se pueden considerar tolerantes al menos para 75 mM de NaCl.

En la línea VF112 de *V. faba*, la ARA específica no se inhibe al igual que han descrito Hafeez *et al.* (1988) en *Vigna radiata*. Con plantas de garbanzo, Elsheik y Wood (1990) comprueban que la fijación de nitrógeno en los nódulos es mas sensible a la salinidad que el crecimiento de las plantas, tal como ocurre en *V. faba* según los resultados presentados en este trabajo (Fig. 7.7).

En la bibliografía se ha descrito la existencia de una correlación entre la inhibición de la fijación de nitrógeno y el contenido en leghemoglobina durante situaciones de estrés (Guerin *et al.*, 1990; Becana *et al.*, 1986). De hecho, en todos los genotipos ensayados, se aprecian con frecuencia variable, nódulos blanquecinos con formas anormales (Fig. 7.3). En estas situaciones se produce una reducción sustancial de los niveles de proteína (Helal *et al.*, 1979; Saad, 1979; Abdul-Kadir y Paulsen, 1982; Pessarakli *et al.*, 1985; ), como se ha observado en todos los genotipos ensayados. Esta disminución puede deberse a proteolisis (Mothes, 1956) o inhibición de la síntesis (Kahane y Poljakoff-Mayber, 1968).

También se ha estudiado el efecto de la sal en plantas de *V. faba* crecidas con elevada fertilización nitrogenada (8 mM de  $\text{NO}_3^-$ ). La presencia de niveles elevados de  $\text{NO}_3^-$  provocó que el crecimiento de la planta se estabilizara antes, al igual que el contenido en nitrógeno reducido. El peso seco total con 8 mM de  $\text{NO}_3^-$  disminuyó en concentraciones extremas de sal (200 mM de NaCl). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Yousef y Sprent (1983), Alston y Graham (1982) y Lauter *et al.* (1981) quienes encontraron que el efecto de la salinidad en el crecimiento de la planta fue más pronunciado en plantas que

dependen exclusivamente de la fijación de nitrógeno que en plantas fertilizadas con  $\text{NO}_3^-$ , sugiriendo que la salinidad afecta más a la nodulación y fijación de nitrógeno que a la planta huésped.

El efecto del NaCl sobre el crecimiento estará directamente relacionado con la etapa de desarrollo de la planta y la respuesta de las plantas y, consecuentemente su tolerancia estará influenciada por el desarrollo ontogenético. Esto es debido a que durante el crecimiento, hay un cambio cualitativo y cuantitativo en la forma y función de los órganos (Maas, 1985).

La sal aplicada al inicio de la primera etapa de crecimiento activo (24 días), inhibe el crecimiento con la misma intensidad en todas las concentraciones ensayadas; estos efectos son más inmediatos que cuando el NaCl se adiciona al final del crecimiento activo (28 días). En estudios llevados a cabo por Yousef y Sprent (1983) con *V. faba* fertilizada con nitrógeno combinado ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), se detectó una clara inhibición cuando los cultivos en crecimiento avanzado, se someten a concentraciones de 50 mM de NaCl.

Torres y Bingham (1973) sugieren que la deficiencia de  $\text{NO}_3^-$  inducida por el  $\text{Cl}^-$ , a consecuencia del antagonismo entre iones, es responsable del retardo del crecimiento en las plantas de trigo que se exponen a altos niveles de NaCl. Es previsible que la adición de  $\text{NO}_3^-$  induzca un descenso del nivel de  $\text{Cl}^-$  en los tejidos vegetales (Feigin *et al.*, 1984). Silberbush y Lips (1988) y Martínez y Cerdá (1989) demostraron que el  $\text{NO}_3^-$  en solución disminuye la acumulación de  $\text{Cl}^-$ , pero no afecta el contenido en  $\text{Na}^+$ . Esto podría apoyar la escasa inhibición del crecimiento para concentraciones de 100 mM de NaCl en plantas de *V. faba* crecidas con niveles elevados de nitrato.

En *V. faba*, el desequilibrio en el crecimiento se detecta de forma inmediata

con el incremento de la relación R/PA, principalmente con niveles elevados de sal. Este desequilibrio se presenta más tardíamente en *Cicer arietinum* (Elsheikh y Wood, 1990). En las plantas con fertilización nitrogenada alta, el incremento en la relación R/PA es menos acentuado. Esto se puede explicar por el antagonismo entre iones mencionado con anterioridad.

Con dosis de  $\text{NO}_3^-$  mayores, la sal produce menor inhibición en el contenido en nitrógeno reducido en plantas de *V. faba*, datos que coinciden con los estudios llevados a cabo por Yousef y Sprent (1983) con la misma leguminosa fertilizada con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

La fijación de nitrógeno se modifica cuando a un medio salino se le adiciona nitrógeno combinado (Pate y Dart, 1961). De hecho, la efectividad de la nodulación y la nitrogenasa están negativamente correlacionada con la concentración de nitrógeno inorgánico del suelo (Alston y Graham, 1982). Sin embargo, la ausencia del efecto inhibitor del  $\text{NO}_3^-$  sobre la nodulación final en *V. faba*, se relaciona con una mayor tolerancia del proceso de fijación al  $\text{NO}_3^-$  respecto a otras leguminosas (Olson *et al.*, 1989). Afirmación que es compatible con los resultados obtenidos en este trabajo para el cv. Alborea (Fig. 8.2). En experimentos de campo con *V. faba* se ha descrito que estas plantas pueden preferir el  $\text{N}_2$ , con una aparente tolerancia al nitrato (Hardanson *et al.*, 1991).

La masa nodular y la efectividad de la misma es un método válido para estimar la capacidad fijadora de  $\text{N}_2$  en la simbiosis (Buttery y Dirks, 1987). El estrés salino (100 y 200 mM de NaCl), junto con los niveles elevados de  $\text{NO}_3^-$ , provocan una disminución en la masa nodular, no detectada en plantas crecidas con 2 mM de  $\text{NO}_3^-$  (Fig. 8.2). La ARA resultó afectada en el control por concentraciones elevadas de  $\text{NO}_3^-$  (33%) (Fig. 8.3) pero en presencia de NaCl sólo se afectó para concentraciones de 200 mM de NaCl.

Es interesante destacar que en los 3 primeros días de tratamiento salino (solo en determinadas concentraciones de NaCl), se produce un incremento de actividad de las enzimas implicadas en el metabolismo del amonio, independientemente del nivel de nitrato en el medio. Este estímulo de actividad puede deberse al acumulo de  $\text{NH}_4^+$  y amidas inducida por el estrés (Hatata, 1982). Ahora bien, la GS y NADH-GOGAT del nódulo resultaron afectadas por el  $\text{NO}_3^-$  (Figs 8.5, 8.6), como ya se ha puesto de manifiesto en otros trabajos (Caba *et al.*, 1992).

El efecto de la sal sobre la proteína soluble del nódulo, es menor cuando las plantas crecen con altas concentraciones de nitrato. La sal altera el metabolismo a través de la modificación de diversas actividades enzimáticas (Dubey y Rani, 1987; 1989) y del metabolismo fotosintético del carbono (Hanson y Hitz, 1982; Sing y Abrol, 1985; Gill, 1987; Singh *et al.*, 1990; Brugnoli y Lauteri, 1991).

Las plantas en condiciones de estrés acumulan amonio, nitrato y aminoácidos libres y reducen la síntesis de proteínas (Pessaraki *et al.*, 1985). Udovenko *et al.* (1970) afirma que en estrés salino disminuye la incorporación en aminoácidos en proteínas para *V. faba* y *P. sativum*.

En leguminosas el estrés salino de 50 a 200 mM de NaCl provoca un efecto adverso en el crecimiento de los nódulos, en el desarrollo simbiótico y en la capacidad fijadora de  $\text{N}_2$  (Bekki *et al.*, 1987; Zahran y Sprent, 1986), como se ha demostrado en el presente trabajo realizado con *V. faba*.

La acumulación de prolina en situaciones de estrés se ha observado en numerosos organismos, bacterias, algas y plantas superiores (Aspinall y Paleg, 1981; Irigoyen *et al.*, 1992). Se han detectado incrementos de 10 a 100 veces en

tejidos foliales de plantas (Aspinall y Paleg, 1981). El incremento del contenido en prolina en el citosol del nódulo (Kohl *et al.*, 1991), bajo estrés salino, puede deberse a una hidrólisis de proteínas ricas en prolina y/o a la síntesis de "novo". Hay gran controversia en lo que se refiere a este acúmulo, parece ser que la acumulación de prolina es más un síntoma de susceptibilidad al estrés (Hanson y Hitz, 1982) que una posible respuesta de adaptación. Las plantas crecidas con 8 mM de  $\text{NO}_3^-$  alcanzan niveles de prolina más elevados que con 2 mM de  $\text{NO}_3^-$ ; sin embargo, en estas últimas los niveles finales de prolina fueron resultado de incrementos mayores. Por tanto, en *V. faba* la prolina puede ser usada como indicador de la tolerancia a la sal hasta concentraciones de 100 mM de NaCl, al igual que en soja (Moftah y Michel, 1987), sin embargo, Ashraf (1989) no recomienda la utilización como tal en *Vigna*.

### **Caracterización de la NADH-glutamato sintasa de nódulos de *V. faba***

Como base de posteriores estudios fisiológicos e inmunológicos, se ha llevado a cabo la caracterización bioquímica de la NADH-GOGAT de nódulos de *V. faba* y la obtención de anticuerpos específicos.

La NADH-GOGAT de los nódulos se reveló como una enzima muy inestable, lo que dificultó su purificación como se puede deducir de los resultados obtenidos (Tab. 9.1). La inclusión de una cromatografía de afinidad sobre Blue sepharosa, incrementó el factor de purificación pero se perdió más del 80% de la actividad, por tanto, este paso fue eliminado. Similares problemas de inestabilidad se han descrito para la enzima de nódulos de alfalfa (Anderson *et al.*, 1989); en cambio, la NADH-GOGAT de nódulos de *Lupinus* (Benny y Boland, 1977) es más estable.

La electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida, de muestras de la preparación enzimática, después de cada paso de purificación (Fig. 9.3), reveló la existencia de un polipéptido de 195 kD que se va enriqueciendo con el proceso de purificación. Este hecho y su parecido tamaño con el de la proteína de otras leguminosas llevó a identificarla como la subunidad de la NADH-GOGAT de nódulos de *V. faba*. Después de la exclusión molecular, el revelado por actividad de electroforesis nativas en gradiente de poliacrilamida (Fig. 9.8), mostró una única banda de 236 kD que se tomó como la forma nativa del enzima. Idéntico resultado se obtuvo cuando se cargó el extracto crudo en el gel. Muy similar fue el peso molecular nativo obtenido mediante filtración en columna de Sephacril S-300 FF (Fig. 9.2). Se puede deducir que la NADH-GOGAT de nódulos de *V. faba* es una proteína monomérica con una subunidad de  $195\pm 2$  kD de peso molecular y un peso molecular nativo comprendido entre  $236\pm 3$  kD (electroforesis) y  $222\pm 5$  kD (filtración), indicando que se trata de una proteína similar a la de nódulos de altramuz (Benny y Boland, 1977) y alfalfa (Anderson *et al.*, 1989), aunque de mayor peso molecular a la encontrada en nódulos de soja (Susuki *et al.*, 1986) y judía (Chen y Cullimore, 1988). En este sentido se ha descrito que la NADH-GOGAT también es mayor que la Fd-GOGAT de tejidos fotosintéticos (Tamura *et al.*, 1980; Avila *et al.*, 1987; Susuki *et al.*, 1984).

El perfil de elución obtenido por DEAE-sephacel (Fig. 9.1), propició que se cuestionara la existencia de distintas isoformas de la NADH-GOGAT en nódulos de *V. faba*, como se ha descrito para nódulos de *Phaseolus vulgaris* (Chen y Cullimore, 1988). Buscando la respuesta, se diseñó un protocolo de purificación con dos pasos consecutivos de intercambio iónico sobre DEAE-sepharosa y Q-sepharosa respectivamente. Los perfiles de elución (Figs 9.4 y 9.5) mostraron un único pico de actividad NADH-GOGAT, por lo que se acepta que en *V. faba* al igual que en otras leguminosas, la NADH-GOGAT se manifiesta bajo una única

forma. Esto sería consistente con la existencia de diferencias entre leguminosas de zonas templadas y de origen tropical en cuanto a variabilidad genética en la expresión de esta enzima en nódulos. Las primeras presentarían una única forma de la enzima mientras que en las de origen tropical se ha detectado Fd-GOGAT en niveles apreciables e incluso más de una forma de NADH-GOGAT.

Aunque la proteína no fue purificada a homogeneidad la banda correspondiente a la NADH-GOGAT en geles desnaturalizantes, aparece lo suficientemente separada, especialmente en geles de 16.5x14.4 cm, para su posterior uso en la inmunización de los conejos. De esta forma se obtuvo un antisuero frente a la NADH-GOGAT de nódulos de *V. faba* con un alto título de anticuerpos policlonales y monoespecíficos. Como muestra el "western blot" (Figs 10.1 y 10.3) en un extracto crudo de nódulos o de la proteína parcialmente purificada sometidos a SDS-PAGE, los anticuerpos sólo reconocieron con una única proteína de 195 kD, coincidente con la NADH-GOGAT de estos nódulos.

Igualmente, se detectó un polipéptido de idéntico peso molecular en raíz, aunque en proporciones menores (Fig. 10.3). En los ensayos realizados con extractos crudos de hoja y con bacteroides de nódulos de *V. faba* (Fig. 10.3) no se detectó ningún polipéptido de características semejantes. Esto evidencia que la actividad glutamato sintasa de la fracción vegetal del nódulo y del bacteroide son enzimas con propiedades antigénicas distintas, al igual que se ha descrito para la glutamato sintasa de nódulos (dependiente de NADH) y la de hojas (dependiente de Fd) (Suzuki *et al.*, 1982; 1986).

La especificidad de los anticuerpos y el título del antisuero se estudiaron también por inmunotitulación de la actividad NADH-GOGAT en extractos crudos de nódulos de *V. faba* usando suero anti-GOGAT. Solo fueron necesarios 40 µl de antisuero para inhibir totalmente la actividad de un extracto crudo de

nódulos de *V. faba* (Fig. 10.2). El inmunoblot de los complejos Ag-Ac precipitados, mostró el consiguiente incremento del polipéptido de 195 kD, como la única banda detectada por los anticuerpos.

Los anticuerpos anti-GOGAT de nódulos de *V. faba* mostraron reacción cruzada con un polipéptido de 195 kD en nódulos de otras leguminosas (Fig. 10.4), entre las que se incluyen especies de zonas templadas que transportan amidas y especies de zonas tropicales que transportan ureidos (Sprent, 1987). La actividad NADH-GOGAT de nódulos de *V. faba* presenta similitud antigénica con la enzima de otras leguminosas, como se ha publicado para alfalfa (Anderson *et al.*, 1989). Aunque no se detectó actividad NADH-GOGAT en nódulos de *V. sativa*, sí apareció una débil banda de reacción cruzada con los anticuerpos, lo que indicaría la presencia del polipéptido también en estos nódulos. La inestabilidad de la actividad y de la proteína durante el proceso de extracción y electroforesis, junto con la pequeña cantidad de proteína adicionada al gel pudieron ser la causa responsable de este resultado, aunque no se descarta la posibilidad de que se trate de una forma alternativa de glutamato sintasa. Por otra parte y aunque los resultados no son concluyentes, no se ha observado reacción cruzada de los anticuerpos anti-Fd-GOGAT de hoja de tomate con el extracto crudo de nódulos de *V. faba*, lo que podría indicar que estos no expresan la actividad Fd-GOGAT, al contrario de lo que se ha descrito para otras especies (Chen y Cullimore, 1989; Suzuki *et al.*, 1986). Actualmente este tema continúa en estudio. La reacción cruzada de los anticuerpos de la NADH-GOGAT de nódulos de *V. faba* con un polipéptido de igual peso molecular en nódulos de otras leguminosas, es consistente con lo observado en otras enzimas nodulares como la GS (Cullimore y Bennett, 1988) y la PEPC (Millerd *et al.*, 1987).

También se ha visto por "western blot" (Fig. 10.5) que la intensidad de tinción no refleja directamente la actividad NADH-GOGAT de distintos

genotipos de *V. faba*, lo que indica que la regulaci3n y/o expresi3n de la enzima est3 sujeta al genotipo de la planta.

PARTE 6

## **Conclusiones**

---



**Primera.** Las cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viceae* utilizadas en este estudio, muestran variabilidad en la velocidad de crecimiento y en la tolerancia a la sal. Las cepas seleccionadas como tolerantes a 75 mM de NaCl son GRI32, GRA19 y GRL8, que alcanzan su máximo crecimiento antes de 24 h.

**Segunda.** Las enzimas responsables de la asimilación del amonio, GS y NADH-GOGAT, presentan mayores incrementos tras el máximo de actividad nitrogenasa, sin embargo, a lo largo del foto- y nictiperiodo, estas actividades mostraron un comportamiento cíclico de 16 h, independiente del detectado para la nitrogenasa.

**Tercera.** Los efectos adversos del NaCl sobre la simbiosis *V. faba*-*R. leguminosarum* están condicionados por el crecimiento de la planta. Así en la ontogenia de la planta, son más inmediatos cuando el estrés salino se aplica en periodo de crecimiento activo. Esto se manifiesta igualmente, cuando se estudian distintos genotipos de *V. faba*, siendo tolerantes de los que presentaron menor crecimiento, VF46, VF64 y VF119.

**Cuarta.** La fertilización nitrogenada atenúa los efectos negativos de la salinidad en el crecimiento de plantas de *V. faba*. Una dosis de nitrógeno combinado alta favorece la tolerancia a concentraciones de 100 mM de NaCl, en plantas que sin este aporte nitrogenado sólo toleran hasta 50 mM de NaCl. Sin embargo, la nitrogenasa y las enzimas de la asimilación del amonio en nódulos de *V. faba*, se inhibieron por el estrés salino, independientemente de los niveles de fertilización nitrogenada del medio.

**Quinta.** La NADH-GOGAT de nódulos de *V. faba*, se ha identificado como un monómero de 195 kD y un peso molecular aproximado de 222 kD por filtración en gel y 236 kD por electroforesis en gradiente de poliacrilamida. Al igual que en otras leguminosas de ambiente templado se ha detectado una única forma de la enzima.

**Sexta.** Los anticuerpos anti-GOGAT de nódulos de *V. faba* no reconocieron un polipéptido semejante en extractos de hoja y de bacteroides, indicando que no existen determinantes antigénicos comunes entre la NADH-GOGAT, Fd-GOGAT y la NADPH-GOGAT. Estos anticuerpos sí reconocieron un polipéptido de igual peso molecular en extractos crudos de raíz, cuya intensidad de tinción fue proporcional a la actividad de ese tejido, por tanto, en nódulos de *V. faba*, la NADH-GOGAT no puede ser considerada nodulina como se ha descrito para la NADH-GOGAT de otras leguminosas.

**Séptima.** Los anticuerpos anti-GOGAT de nódulos de *V. faba* muestran reacción cruzada con extractos crudos de nódulos de otras leguminosas de ambiente tropical y templado, así pues, la NADH-GOGAT de la fracción vegetal de nódulos presentan determinantes antigénicos comunes.

PARTE 7

# **Estadística**

---



**1. DESARROLLO ONTOGÉNICO DE LA ACTIVIDAD NITROGENASA Y DE LAS ACTIVIDADES DEL CICLO DE LA GLUTAMATO SINTASA EN NÓDULOS DE *Vicia faba***

Acumulación de materia seca (PSP), relación peso seco de raíz/parte aérea (RPA), peso seco de nódulos (PSN), peso normalizado de nódulos (PNN), actividad reductora de acetileno (ARA), actividad reductora de acetileno por planta (ARAP), contenido en nitrógeno reducido (NIT), producción de hidrógeno por la nitrogenasa (H<sub>2</sub>), actividad glutamina sintetasa (GS), actividad glutamato sintasa (GG), actividad glutamato deshidrogenasa (GDH) y contenido en proteína soluble (PRT). La variable de control es la edad de la planta (T).

**Tabla 1.1. Resumen de los análisis de la varianza**

Fuente de variación	Grados de libertad	Media de cuadrados						
		PSP <sup>c</sup>	RPA <sup>c</sup>	PSN <sup>a</sup>	PNN <sup>a</sup>	ARA <sup>b</sup>	ARAP <sup>b</sup>	NIT <sup>c</sup>
T	11 <sup>a</sup> -12 <sup>bc</sup>	27.39**	0.190**	42334.09**	727.02**	9963.37**	28.05**	107219.06**
Error	60 <sup>a</sup> -63 <sup>b</sup> -65 <sup>c</sup>	0.60	0.004	1295.67**	74.89	106.32	1.41	90.27

Fuente de variación	Grados de libertad	Media de cuadrados				
		H <sub>2</sub> <sup>a</sup>	GS <sup>c</sup>	GG <sup>c</sup>	GDH <sup>b</sup>	PRT <sup>c</sup>
T	10 <sup>a</sup> -11 <sup>b</sup> -12 <sup>c</sup>	90.09**	34254.37**	7393.92**	104.34**	36.91**
Error	36 <sup>b</sup> -39 <sup>c</sup> -44 <sup>a</sup>	10.18	27.11	2.71	0.98	0.61

\* P≤0.05, \*\* P≤0.001

a,b,c, grados de libertad para la fuente de variación y el error de cada variable

## 2. EVOLUCIÓN EN EL FOTOPERIODO DEL CICLO DE LA GLUTAMATO SINTASA EN NÓDULOS FIJADORES DE NITRÓGENO DE *Vicia faba*

Actividad reductora de acetileno (ARA), actividad glutamina sintetasa (GS), actividad glutamato sintasa (GG), actividad glutamato deshidrogenasa (GDH) y contenido en proteína soluble (PRT). La variable de control es el tiempo (T).

**Tabla 1.1. Resumen de los análisis de la varianza**

Fuente de variación	Grados de libertad	Media de cuadrados				
		ARA <sup>b</sup>	GS <sup>a</sup>	GG <sup>a</sup>	GDH <sup>a</sup>	PRT <sup>a</sup>
T	16 <sup>ab</sup>	1122.70**	1912.59**	594.36**	47.90**	1.12
Error	51 <sup>a</sup> -81 <sup>b</sup>	269.35	43.53	19.18	0.56	0.64

a,b,c, grados de libertad para la fuente de variación y el error de cada variable

### 3. EFECTO DEL NaCl APLICADO EN EL MOMENTO DE LA INOCULACIÓN

Acumulación de materia seca (PSP), relación peso seco de raíz/parte aérea (RPA), número de nódulos (NN), peso seco de nódulos (PSN), peso normalizado de nódulos (PNN), actividad reductora de acetileno (ARA), actividad reductora de acetileno por planta (ARAP), contenido en nitrógeno reducido (NIT), actividad glutamina sintetasa (GS), actividad glutamato sintasa (GG) y contenido en proteína soluble (PRT). Las variables de control son nivel de salinidad (S) y edad de la planta (T).

**Tabla 3.1. Resumen de los análisis de la varianza**

Fuente de variación	Grados de libertad	Media de cuadrados						
		PSP	RPA	NN	PSN	PNN	ARA	ARAP
S	3	11.72**	0.071**	47110.71**	0.025**	104.77	2366.09**	93.52**
T	2	9.12**	0.012	486.03	0.032**	100.91	3074.26**	4.02*
SxT	6	1.68**	0.004	564.41	0.003*	42.30	74.60	1.02
Error	59	0.18	0.005	2408.27	0.001	148.06	101.55	0.82

Fuente de variación	Grados de libertad	Media de cuadrados			
		NIT <sup>b</sup>	GS <sup>a</sup>	GG <sup>a</sup>	PRT <sup>a</sup>
S	3 <sup>ab</sup>	21825.12**	22462.30**	5485.10**	10.41**
Error	12 <sup>a</sup> -20 <sup>b</sup>	147.83	11.75	5.41	0.25

\* P≤0.05, \*\* P≤0.001

a,b, grados de libertad para las fuentes de variación, las interacciones y el error de cada variable

**Tabla 3.2. Resumen de los tests de Tuckey ( $P \leq 0.05$ )**

Variable	Nivel de salinidad (mM)							
	0		50		75		100	
	x	Grupo	x	Grupo	x	Grupo	x	Grupo
PSP	3.14	c	2.03	b	1.46	a	1.33	a
RPA	0.39	a	0.49	b	0.52	b	0.54	b
NN	230.07	c	184.78	b	135.44	a	113.83	a
PSN	0.14	c	0.10	b	0.07	a	0.05	a
PNN	63.41	a	64.49	a	59.07	a	63.51	a
ARA	51.65	b	29.76	a	31.05	a	25.22	a
ARAP	6.42	d	2.72	c	1.93	ab	1.11	a

Variable	Edad de la planta (días)					
	28		35		42	
	x	Grupo	x	Grupo	x	Grupo
PSP	1.35	a	2.04	b	2.59	c
RPA	0.50	a	0.46	a	0.50	a
NN	163.08	a	163.71	a	171.30	a
PSN	0.05	a	0.09	b	0.13	c
PNN	60.88	a	64.88	a	62.10	a
ARA	43.54	b	38.69	b	21.04	a
ARAP	2.62	a	3.45	b	3.07	ab

#### 4. EFECTO DEL NaCl APLICADO A SIMBIOSIS ESTABLECIDAS Y FIJADORAS DE NITRÓGENO

Acumulación de materia seca (PSP), relación peso seco de raíz/parte aérea (RPA), peso seco de nódulos (PSN), peso normalizado de nódulos (PNN), actividad reductora de acetileno (ARA), actividad reductora de acetileno por planta (ARAP), contenido en nitrógeno reducido (NIT), actividad glutamina sintetasa (GS), actividad glutamato sintasa (GG) y contenido en proteína soluble (PRT). Las variables de control son nivel de salinidad (S) y edad de la planta (T).

**Tabla 4.1. Resumen de los análisis de la varianza**

Fuente de variación	Grados de libertad	Media de cuadrados						
		PSP <sup>b</sup>	RPA <sup>b</sup>	PSN <sup>b</sup>	PNN <sup>b</sup>	ARA <sup>a</sup>	ARAP <sup>a</sup>	NIT <sup>b</sup>
S	3	5.74**	0.057**	0.004	803.03*	1919.38**	61.55**	56380.33**
T	2	22.17**	0.018*	0.069**	1511.32**	1063.70**	0.25	55328.50**
SxT	6	1.47*	0.008	0.001	327.07	79.35*	0.25	7141.23**
Error	58 <sup>a</sup> -60 <sup>b</sup>	0.48	0.005	0.002	138.60	25.26	1.65	77.26

a,b, grados de libertad para las fuentes de variación, las interacciones y el error de cada variable

Fuente de variación	Grados de libertad			
		GS	GG	PRT
S	3	7728.09**	4086.37**	15.52**
T	2	29565.48**	2214.99**	32.19**
SxT	6	2808.62**	910.90**	4.78*
Error	36	48.80	1.83	1.32

\* P≤0.05, \*\* P≤0.001

**Tabla 4.2. Resumen de los tests de Tuckey ( $P \leq 0.05$ )**

Variable	Nivel de salinidad (mM)							
	0		50		75		100	
	x	Grupo	x	Grupo	x	Grupo	x	Grupo
PSP	4.47	c	3.96	bc	3.37	ab	3.25	a
RPA	0.35	a	0.45	b	0.46	b	0.47	b
PSN	0.18	a	0.20	a	0.18	a	0.16	a
PNN	64.70	a	72.56	ab	77.14	b	80.01	b
ARA	37.57	b	17.86	a	16.41	a	16.24	a
ARAP	6.49	b	2.91	a	2.70	a	2.71	a
NIT	330.76	d	270.40	c	238.51	b	198.18	a
GS	210.54	c	169.72	b	157.66	a	156.32	a
GG	78.31	c	50.33	b	49.43	b	33.99	a
PRT	11.40	b	9.59	a	9.12	a	8.89	a

Variable	Edad de la planta (días)					
	28		35		42	
	x	Grupo	x	Grupo	x	Grupo
PSP	2.67	a	4.17	b	4.46	b
RPA	0.46	b	0.45	ab	0.40	a
PSN	0.12	a	0.20	b	0.22	b
PNN	64.70	a	76.15	b	79.95	b
ARA	29.86	b	19.13	a	17.07	a
ARAP	3.63	a	3.82	a	3.65	a
NIT	207.76	a	267.97	b	302.66	c
GS	215.94	c	174.76	b	129.99	a
GG	62.01	c	57.34	b	39.70	a
PRT	10.94	b	10.12	b	8.18	a

## 5. TOLERANCIA AL ESTRÉS SALINO EN *V. faba*: UTILIZACIÓN DE LÍNEAS PURAS

Acumulación de materia seca (PSP), tasa de crecimiento absoluto (TCA), relación peso seco de raíz/parte aérea (RPA), número de nódulos (NN), peso seco de nódulos (PSN), peso normalizado de nódulos (PNN), actividad reductora de acetileno (ARA), actividad reductora de acetileno por planta (ARAP), actividad glutamina sintetasa (GS), actividad glutamato sintasa (GG) y contenido en proteína soluble (PRT). Las variables de control son nivel de salinidad (S) y genotipo (G).

**Tabla 5.1. Resumen de los análisis de la varianza**

Fuente de variación	Grados de libertad	Media de cuadrados					
		PSP <sup>b</sup>	TCA <sup>b</sup>	RPA <sup>b</sup>	NN <sup>b</sup>	PSN <sup>a</sup>	PNN <sup>c</sup>
S	1	292.36**	126037.70**	0.054**	186173.22**	0.816**	9413.02**
G	14	26.61**	5258.53**	0.019**	84629.96**	0.124**	4327.19**
SxG	14	12.62**	3477.83**	0.012**	41997.21**	0.058**	626.24**
Error	87 <sup>a</sup> -88 <sup>b</sup> -89 <sup>c</sup>	1.14	442.86	0.002	1853.58	0.003	158.36

Fuente de variación	Grados de libertad	Media de cuadrados				
		ARA <sup>c</sup>	ARAP <sup>c</sup>	GS <sup>c</sup>	GG <sup>b</sup>	PRT <sup>b</sup>
S	1	8240.92**	1329.39**	323670.35**	22218.78**	267.24**
G	14	118.41**	41.22**	17909.52**	2076.22**	5.51**
SxG	14	68.55**	42.31**	4670.22**	519.05**	6.04**
Error	87 <sup>a</sup> -88 <sup>b</sup> -90 <sup>c</sup>	5.51	1.40	81.93	1.84	0.98

\* P≤0.05, \*\* P≤0.001

a,b,c, grados de libertad para las fuentes de variación, las interacciones y el error de cada variable

## 6. INTERACCIÓN DE LA FERTILIZACIÓN NITROGENADA Y LA SALINIDAD EN LA SIMBIOSIS *V. faba-R leguminosarum*

Acumulación de materia seca (PSP), relación peso seco de raíz/parte aérea (RPA), contenido en nitrógeno reducido (NIT), peso seco de nódulos (PSN), peso normalizado de nódulos (PNN), actividad reductora de acetileno (ARA), actividad reductora de acetileno por planta (ARAP), actividad glutamina sintetasa (GS), actividad glutamato sintasa (GG), contenido en proteína soluble (PRT) y contenido en prolina soluble (PRO). Las variables de control son nivel de salinidad (S), nivel de NO (N) y edad de la planta (T).

**Tabla 6.1. Resumen de los análisis de la varianza**

Fuente de variación	Grados de libertad	Media de cuadrados						
		PSP	RPA	NIT	PSN	PNN	ARA	ARAP
S	3	2.97**	0.26**	30950.37**	0.001*	3973.49**	4702.85**	46.31**
N	1	7.41**	0.014	8231.26**	0.058**	10757.01**	5226.37**	199.27**
T	3	12.01**	0.016	49698.06**	0.017**	349.84*	3960.74**	0.56
SxN	3	0.89**	0.051**	2880.56**	0.001*	842.34**	857.10**	11.30**
SxT	9	0.33*	0.008	1780.37**	0.000	117.49	160.11*	4.78**
NxT	3	0.38*	0.004	525.36**	0.001	461.19*	616.21**	4.11**
SxNxT	9	0.06	0.005	1078.02**	0.000	103.67	230.12*	1.82**
Error	160	0.12	0.006	67.54	0.000	89.06	77.94	0.42

Fuente de variación	Grados de libertad	Media de cuadrados				
		GS <sup>a</sup>	GG <sup>b</sup>	GDH <sup>b</sup>	PRT <sup>b</sup>	PRO <sup>b</sup>
S	3	9144.15**	11102.05**	88.19**	10.04**	54.81**
N	1	11935.28**	7953.76**	261.11**	6.55**	47.50**
T	3	8303.29**	10098.08**	212.37**	6.28**	48.22**
SxN	3	421.27**	1973.54**	23.58**	1.64**	13.83**
SxT	9	1454.73**	856.95**	22.56**	1.42**	4.97**
NxT	3	142.08**	212.47**	10.36**	2.19**	9.04**
SxNxT	9	429.14**	213.84**	8.88**	1.16**	2.06**
Error	94 <sup>a</sup> -96 <sup>b</sup>	35.43	4.61	1.30	0.18	0.03

\* P≤0.001, \*\* P≤0.001

a,b, grados de libertad para las fuentes de variación, las interacciones y el error de cada variable

**Tabla 6.2. Resumen de los tests de Tuckey (P≤0.05)**

Variable	Nivel de salinidad (mM)							
	0		50		100		200	
	x	Grupo	x	Grupo	x	Grupo	x	Grupo
PSP	2.51	c	2.32	b	2.30	b	1.92	a
RPA	0.40	a	0.46	b	0.51	c	0.57	d
NIT	180.25	d	169.41	c	137.88	b	126.64	a
PSN	0.06	a	0.06	b	0.09	c	0.11	d
PNN	49.45	a	57.79	b	59.00	b	71.75	c
ARA	51.52	d	42.05	c	38.52	b	27.56	a
ARAP	4.58	c	3.26	b	2.97	b	2.23	a
GS	291.27	d	275.15	c	265.84	b	250.89	a
GG	119.86	d	115.36	c	100.70	b	78.51	a
GDH	29.48	d	28.58	c	27.37	b	25.63	a
PRT	13.28	c	12.37	b	12.14	ab	12.06	a
PRO	0.39	a	0.97	b	1.95	c	3.18	d

Variable	Nivel de nitrato (mM)			
	2		8	
	x	Grupo	x	Grupo
PSP	2.0767	a	2.46	b
RPA	0.49	a	0.48	a
NIT	147.00	a	160.09	b
PSN	0.10	b	0.07	a
PNN	67.04	b	51.95	a
ARA	45.13	b	34.70	a
ARAP	4.29	b	2.24	a
GS	280.54	b	261.03	a
GG	111.49	b	95.73	a
GDH	29.20	b	26.33	a
PRT	12.24	a	12.69	b
PRO	0.97	a	2.28	b

Variable	Edad de la planta (días)							
	27		30		33		36	
	x	Grupo	x	Grupo	x	Grupo	x	Grupo
PSP	1.67	a	2.05	b	2.54	c	2.79	d
RPA	0.51	b	0.49	ab	0.46	a	0.48	ab
NIT	115.99	a	140.51	b	167.73	c	189.95	d
PSN	0.09	b	0.08	ab	0.08	a	0.08	a
PNN	56.51	a	58.10	ab	60.68	ab	62.70	b
ARA	49.67	d	44.54	c	36.43	b	29.01	a
ARAP	3.17	a	3.38	a	3.33	a	3.17	a
GS	290.25	c	272.98	b	269.38	b	250.55	a
GG	126.34	d	103.80	c	101.30	b	83.00	a
GDH	31.14	c	28.44	b	25.93	a	25.55	a
PRT	12.97	d	12.63	c	12.33	b	11.93	a
PRO	0.34	a	0.95	b	2.10	c	3.10	d

PARTE 8

## **Bibliografía**

---



**Abdul-Kadir, S.M. y Paulsen, G.M. (1982)** Effect of salinity on nitrogen metabolism in wheat. *J. Plant Nutr.* **5**: 1141-1151.

**Ackrell, B.A.; Johnson, M.K.; Gunsalus, R.P. y Cecchini, G. (1991)** Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes, Vol. **III**. F. Muller (ed.), pp. 229-297. CRC Press, Boca Raton, Florida.

**Alston, A.M. y Graham, R.D. (1982)** The influence of soil nitrogen status and previous crop on nitrogen fixation (acetylene reduction) in barrel medic, *Medicago trunculata* Gaertn. *Aust. J. Soil Sci.* **27**: 462-469.

**Allen, O.N. (1957)** Experiments in Soil Bacteriology. Burgess Publishing Minnesota. Minneapolis.

**Allen, O.N. y Allen, E.K. (1981)** The Leguminosae: A Source Book of Characteristics, Uses and Nodulation. Wisconsin. The University of Wisconsin Press, Madison, 812 pp.

**Anderson, M.P.; Vance, C.P.; Heichel, G.H. y Miller, S.S. (1989)** Purification and characterization of NADH-glutamate synthase from alfalfa root nodules. *Plant Physiol.* **90**: 351-358.

**Appelbaum, E. (1990)** The *Rhizobium/Bradyrhizobium*-legume symbiosis. En: Molecular Biology of Symbiotic Nitrogen Fixation. P.M. Gresshoff (ed.), pp. 131-151. CRC Press, Boca Ratón, Florida.

**Arp, D.J. (1985)** *Rhizobium japonicum* hydrogenase: Purification to homogeneity from soybean nodules and molecular characterization. *Arch. Biochem. Biophys.* **237**: 504-512

- Arp, D.J. y Burris, R.H. (1981)** Kinetic mechanism of the hydrogen-oxidizing hydrogenase from soybean nodule bacteroids. *Biochem.* **20**: 2234-2240.
- Ashraf, M. (1989)** The effect of NaCl on water relations, chlorophyll and protein and proline contents of two cultivars of blackgram (*Vigna mungo* L.). *Plant Soil* **119**: 205-210.
- Ashraf, M. y McNeilly, T. (1987)** Salinity effects on five cultivars/lines of pearl millet (*Pennisetum americanum* [L.] Leeke). *Plant Soil* **113**: 13-19.
- Ashraf, M. y Waheed, A. (1990)** Screening of local/exotic accessions of lentil (*Lens culinaris* Medic.) for salt tolerance at two growth stages. *Plant Soil* **128**: 167-176.
- Aslam, M.; Huffaker, R.C. y Rains, D.W. (1984)** Early effects of salinity on nitrate assimilation in barley seedlings. *Plant Physiol.* **76**: 321-325.
- Aspinall, D. y Paleg, L.G. (1981)** Proline accumulation. Physiological aspects. En: *Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants*. L.G. Paleg y D. Aspinall (eds.), pp. 205-240. Academic Press, New York.
- Austefeld, F.A. (1974)** The effect of NaCl and other alkali salts on the nitrate reductase activity of *Salicornia europea* L. *Pflanzenphysiol.* **71**: 288-296.
- Avila, C; Botella, J.R.; Cánovas, F.M.; Núñez de Castro, I. y Valpuesta, V. (1987)** Different characteristics of the two glutamate synthases in the green leaves of *Lycopersicon esculentum*. *Plant Physiol.* **85**: 1036-1039.

- Awonaike, K.O.; Lea, P.J. y Miflin, B.J. (1981)** The location of the enzymes of ammonia assimilation in root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. Plant Sci. Lett. **23**: 189-195.
- Ayanaba, A. y Lawson, T.L. (1977)** Diurnal changes in acetylene reduction in field-grown cowpeas and soybeans. Soil Biol. Biochem. **9**: 125-129.
- Bajpai, P.D. y Gupta, B.R. (1979)** Effect of salinization, phosphorus fertilization and their interaction on the symbiosis between *Rhizobium trifolii* and berseem (*Trifolium alexandrinum* L.) J. Ind. Soc. Soil Sci. **27**: 426-429.
- Ball, M.C. y Anderson, J.M. (1986)** Sensitivity of photosystem II to NaCl in relation to salinity tolerance. Comparative studies with thylakoids of the salt-tolerant mangrove, *Avicennia marina* and the salt-sensitive pea, *Pisum sativum*. Aust. Plant Physiol. **13**: 689-698.
- Barnett, N.M. y Naylor, A.W. (1966)** Amino acid and protein metabolism in bermuda grass during water stress. Plant Physiol. **41**: 1222-1230.
- Becana, M. y Bedmar, E.J. (1990)** Metabolismo del nitrato y oxígeno en nódulos de leguminosas. pp. 33-51. Colección Nuevas tendencias. C.S.I.C.
- Becana, M. y Sprent, J.I. (1987)** Nitrogen fixation and nitrate reductase in the root nodules of legumes. Physiol. Plant. **70**: 757-765.

- Becana, M.; Aparicio-Tejo, P.; Peña, P.; Aguirreola, J. y Sánchez-Díaz, M. (1986)** N<sub>2</sub> fixation (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-reducing activity) and leghemoglobin content during nitrate and water stress induced senescence of *Medicago sativa* root nodules. J. Exp. Bot. **37**: 597-605.
- Becana, M.; Aparicio-Tejo, P.M. y Sánchez-Díaz, M. (1985)** Nitrate and nitrite reduction by alfalfa root nodules: Accumulation of nitrite in *Rhizobium meliloti* bacteroids and senescence of nodules. Physiol. Plant. **64**: 353-358.
- Bedmar, E.J.; Edie, S.A. y Phillips, D.A. (1983)** Host plant cultivar effect on hydrogen evolution by *Rhizobium leguminosarum*. Plant Physiol. **72**: 1011-1015.
- Beevers, N. y Hageman, R.H. (1980)** Nitrate and nitrite reduction. En: The Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise. P.K Stumpf y E.E. Conn (eds.), pp. 115-168. Academic Press, New York.
- Beevers, L. y Storey, R. (1976)** Glutamate synthase in developing cotyledons of *Pisum sativum*. Plant Physiol. **57**: 862-866.
- Bekki, A.; Trinchant, J-C. y Rigaud, J. (1987)** Nitrogen fixation (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> reducción) by *Medicago* nodules and bacteroids under sodium chloride stress. Physiol. Plant. **71**: 61-67.
- Bello, A.B.; Cerón-Díaz, W.A.; Nickell, C.D.; El Sherif, E.O. y Davis, L.C. (1980)** Influence of cultivar, between row spacing and plant population on fixation of soybeans. Crop. Sci. **20**: 751-755.

- Bennet, M.J. y Cullimore, J.V. (1989)** Glutamine synthetase isoenzymes of *Phaseolus vulgaris* L.: Subunit composition in developing root nodules and plumules. *Planta* **179**: 433-440.
- Bennet, M.J.; Lightfoot, D.A. y Cullimore, J.V. (1989)** cDNA sequence and differential expression of the gene encoding the glutamine synthetase  $\gamma$  polypeptide of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Mol. Biol.* **12**: 553-565.
- Benny, A.G. y Boland, M.J. (1977)** Enzymes of nitrogen metabolism in legume nodules. Purification and properties of NADH-dependent glutamate synthase from lupin nodules. *Eur. J. Biochem.* **79**: 355-362.
- Bergersen, F.J. y Nutman, P.S. (1957)** Symbiotic effectiveness in nodulated red clover. IV. The influence of the host factors  $i_1$  and  $i_e$  upon nodule structure and cytology. *Heredity* **11**: 175-184.
- Bergersen, F.J. y Turner, G.L. (1967)** Nitrogen fixation by the bacteroid fraction of breis of soybean nodules. *Biochim. Biophys. Acta* **141**: 507-515.
- Bergman, , H.; Preddie, E. y Verma, D.P.S. (1983)** Nodulin 35: A subunit of specific uricase (uricase II) induced and localized in the uninfected cells of soybean nodules. *EMBO J.* **2**: 2333-2339.
- Bernstein, L. y Hayward, H.E. (1958)** Physiology of salt tolerance. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **9**: 25-46.
- Bernstein, L. y Ogata, G. (1966)** Effects of salinity on nodulation, nitrogen fixation and growth of soybeans and alfalfa. *Agron. J.* **58**: 201-203.

- Bethlenfalvay, G.J.; Abu-Snakra, S.S. y Phillips, S (1978)** Interdependence of nitrogen nutrition and photosynthesis in *Pisum sativum* L. I. Effect of combined nitrogen on symbiotic nitrogen fixation and photosynthesis. *Plant Physiol.* **62**: 127-130.
- Bhardwaj, K.K. (1975)** Survival and symbiotic characteristics of *Rhizobium* in saline-alkali soils. *Plant Soil* **43**: 377-385.
- Billard, J.P.; Binet, P. y Boucaud, J. (1982)** Modification électrophorétiques des protéines solubles foliaires de *Suaeda maritima* var. *macrocarpa*, *Atriplex hortensis* et *Phaseolus vulgaris* en relation avec la teneur en NaCl du milieu de culture. *Can. J. Bot.* **60**: 1590-1595.
- Binzel, M.L.; Hess, F.D.; Bressan, R.A. y Hasegawa, P.M. (1988)** Intracellular compartmentation of ions in salt adapted tobacco cells. *Plant Physiol.* **86**: 607-614.
- Bishop, P.E. (1990)** Genetics of alternative nitrogen fixation systems in *Azotobacter vinelandii*. 8th International Congress on Nitrogen Fixation. Knoxville, Tennessee, USA. p. L-51.
- Bishop, P.E. y Premakumar, R. (1992)** Alternative nitrogen fixation systems. En: *Biological Nitrogen Fixation*. G. Stacey, H.J. Evans y R.H. Burris (eds.), pp. 736-762. Chapman and Hall, New York.
- Bishop, P.E.; Jarlenski, D.M.L. y Hetherington, D.R. (1980)** Evidence for an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 7342-7346.

- Bisseling, T.; Franssen, H.; Govers, F.; Horwath, B.; Moerman, M.; Scheres, B.; van de Wield, C. y Yang, W.-C. (1991)** Early nodulins in pea and soybean nodule development. En: *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interaction*. Vol. **1**. H, Hennecke y D.P.S., Verma (eds.), pp. 300-303. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Bloom, A.J. y Finazzo, J. (1986)** The influence of ammonium and chloride on potassium and nitrate absorption by barley roots depends on time of exposure and cultivar. *Plant Physiol.* **81**: 67-69.
- Bloom-Zandstra, G. y Lampe, J.E.M. (1983)** The effect of chloride and sulphate salts on the nitrate content in lettuce plants (*Lactuca sativa* L.). *J. Plant Nutr.* **6**: 611-628.
- Boddey, R.M. y Döbereiner, J. (1984)** Nitrogen fixation associated with grasses and cereals. En: *Current Development in Biological Nitrogen Fixation*. N.S. Subba Rao (ed.), pp. 277-314. Edward Arnold, Londres.
- Bogges, S.F. y Stewart, C.R. (1980)** The relationship between water stress induced proline accumulation and inhibition of protein synthesis in tobacco leaves. *Plant Sci. Lett.* **17**: 245-252.
- Boland, M.J. (1979)** Kinetic mechanism of NADH-dependent glutamate synthase from lupin nodules. *Eur. J. Biochem.* **99**: 531-539.
- Boland, M.J. y Benny, A.G. (1977)** Enzymes of nitrogen metabolism in legume nodules: Purification and properties of NADH-dependent glutamate synthase from lupin nodules. *Eur. J. Biochem.* **79**: 355-362.

**Boland, M.J.; Fordyce, A.M. y Greenwood, R.M. (1978)** Enzymes of nitrogen metabolism in legume nodules: A comparative study. *Aust. J. Plant Physiol.* **5**: 553-559.

**Boland, M.J.; Hanks, J.F.; Reynolds, P.H.S.; Blevins, D.G.; Tolbert, N.E. y Schubert, K.R. (1982)** Subcellular organization of ureide biogenesis from glycolytic intermediates and ammonium in nitrogen fixing soybean nodules. *Planta* **155**: 45-51.

**Boller, B.C. y Heichel, G.H. (1983)** Photosynthate partitioning in relation to N<sub>2</sub> fixation capability of alfalfa. *Crop Sci.* **23**: 655-659.

**Botsford, J.L. (1984)** Osmoregulation in *Rhizobium meliloti*: Inhibition of growth by salts. *Arch. Microbiol.* **137**: 124-127.

**Bottacin, A.; Cacco, G. y Saccomani, M. (1985)** Nitrogen absorption and assimilation in NaCl-resistant and NaCl-susceptible millet genotypes (*Pennisetum americanum*). *Can. J. Bot.* **63**: 517-520.

**Botella, J.R.; Verbelen, J.P. y Valpuesta, V. (1988)** Immunolocalization of ferredoxin-GOGAT in the cells of green leaves and cotyledons of *Lycopersicon esculentum*. *Plant Physiol.* **87**: 255-257.

**Bouat, A. y Crouzet, C. (1965)** Notes techniques sur un appareil semiautomatique du clorage l'azote et des certains composés volatiles. *Ann. Agric.* **16**: 107-118.

**Boucaud, J. y Billard, J.P. (1978)** Caractérisation de la glutamate

déshydrogénase chez un halophyte obligatoire: Le *Suaeda maritima* var. *macrocarpa*. *Physiol. Plant.* **44**: 31-37.

**Bourgeois-Choillou, P; Pérez-Alfocea, F. y Guerrier, G. (1992)** Comparative effects of N-sources on growth and physiological responses of soybean exposed to NaCl-stress. *J. Exp. Bot.* **254**: 1125-1233.

**Bowsher, C.G.; Emes, M.J.; Cammack, R. y Hucklesby, D.P. (1988)** Purification and properties of nitrite reductase from roots of pea (*Pisum sativum* cv. Meteor). *Planta* **175**: 334-340.

**Bradford, M.M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

**Brandiss, M.C. y Falvey, D.A. (1992)** Proline biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: Analysis of the *PRO3* gene, which encodes  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate reductase. *J. Bacteriol.* **174**: 3782-3788.

**Bray, C.M. (1987)** Nitrogen Metabolism in Plants. Longman Inc., New York, 214 pp.

**Brewin, N.J. (1984)** Hydrogenase and energy efficiency in nitrogen-fixing symbionts. En: Genes Involved in Plant-Microbe Interactions. D.P.S. Verma y T. Hohn (eds.), pp. 179-203. Springer-Verlag, New York/Vienna.

**Brisson, N. y Verma, D.P.S. (1982)** Soybean leghemoglobin genes family: Normal, pseudo, and truncated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 4055-4059.

**Brouwer, R. (1963)** Some aspects of the equilibrium between overground and underground plant parts. *Jaarb. Inst. Bodemscheikunde* **213**: 31-39.

**Brown, A.D. (1976)** Microbial water stress. *Bacteriol. Rev.* **40**: 803.

**Brugnoli, E. y Lauter, M. (1991)** Effects of salinity on stomatal conductance, photosynthetic capacity, and carbon isotope discrimination of salt-tolerant *Gossypium hirsutum* L. and salt-sensitive *Phaseolus vulgaris* L. C<sub>3</sub> non-halophytes. *Plant Physiol.* **95**: 628-635.

**Bulen, W.A. y LeCompte, J.R. (1966)** The nitrogenase system from *Azotobacter*: Two enzyme requirement for nitrogen reduction, ATP-dependent H<sub>2</sub> evolution and ATP hidrolisis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **56**: 979-984.

**Burris, R.H. (1972)** Nitrogen Fixation-Assay Methods and Techniques. *Methods in Enzymology, IV*. S.P. Colowick y N.O. Kaplan (eds.). Academic Press, New York, 415 pp.

**Buttery, B.R. y Dirks, V.A. (1987)** The effect of soybean cultivar, *Rhizobium* strain and nitrate on plant growth, nodule mass and acetylene reduction rate. *Plant Soil* **98**: 285-293.

**Buttery, B.R. y Gibson, A.H. (1990)** The effect of nitrate on the time course of nitrogen fixation and growth in *Pisum sativum* and *Vicia faba*. *Plant Soil* **127**: 143-146.

**Caba, J.M. (1991)** Variabilidad genotípica del metabolismo simbiótico en *Vicia*

*faba*: Efecto del nitrato. Tesis Doctoral, Univ. Granada, 435 pp.

**Caba, J.M.; Lluch, C. y Ligeró, F. (1993)** Genotypic differences in nitrogen assimilation in *Vicia faba*: Effect of nitrate. *Plant Soil* (en prensa).

**Caba, J.M.; Lluch, C.; Hervás, A. y Ligeró, F. (1990a)** Nitrate metabolism in roots and nodules of *Vicia faba* in response to exogenous nitrate. *Physiol. Plant.* **79**: 531-539.

**Caba, J.M.; Lluch, C.; Lara, M. y Ligeró, F. (1990b)** Purification and partial characterization of glutamine synthetase from root nodules of faba bean (*Vicia faba*). *Physiol. Plant.* **79**: A82, p. 468.

**Caetano-Anollés, G. y Gresshoff, P.M. (1991)** Plant genetic control of nodulation. *Ann. Rev. Microbiol.* **45**: 345-382.

**Cai, X. y Wong, P.P. (1990)** Mechanism for the variations in electrophoretic mobility of glutamine synthetase from *Phaseolus vulgaris* L. root nodules. *Plant. Sci.* **72**: 199-206.

**Cammaerts, D.M. y Jacobs, M (1984)** A study of the polymorphism and the genetic control of the glutamate dehydrogenase isozymes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci. Lett.* **31**: 65-73.

**Cammaerts, D.M. y Jacobs, M (1985)** A study of the role of glutamate dehydrogenase in the nitrogen metabolism of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **163**: 517-526.

**Cantrell, M.A.; Hickok, R.E. y Evans, H.J. (1982)** Identification and

characterization of plasmids in hydrogen uptake positive and hydrogen uptake negative strains of *Rhizobium japonicum*. Arch. Microbiol. **131**: 102-106.

**Carlson, R.W. (1982)** Surface chemistry. En: Nitrogen Fixation, Vol **2**. *Rhizobium*. W.J., Broughton (Ed.). Clarendon Press, Oxford, 199 pp.

**Carnahan, J.E.; Mortenson, K.E.; Mower, H y Castle, J.C. (1960)** Nitrogen fixation in cell-free extracts of *Clostridium pasteurianum*. Biochim. Biophys. Acta **44**: 520-535.

**Carroll, B.J. y Mathews, A. (1990)** Nitrate inhibition of nodulation in legumes. En: Molecular Biology of Symbiotic Nitrogen Fixation. P.M. Gresshoff (ed.), pp. 159-180. CRC Press, Boca Raton, Florida.

**Clausen, H. y Hansen, V. (1968)** Landökonomisk försöglaboratorium. Arsbog, pp. 45-58. Landökonomisk försöglaboratorium. Copenhagen.

**Clement, C.R.; Hopper, M.J. y Jones, L.H.P. (1978)** The uptake of nitrate by *Lolium perenne* from flowing nutrient solution. J. Exp. Bot. **29**: 453-464.

**Coruzzi, G.M. (1991)** Molecular approaches to the study of amino acid biosynthesis in plants. Plant Sci. **74**: 145-155.

**Craig, G.F.; Atkins, C.A. y Bell, D.T. (1991)** Effect of salinity on growth of four strains of *Rhizobium* and their infectivity and effectiveness on two species of *Acacia*. Plant Soil **133** :253-262.

- Cramer, G.R.; Lynch, J.; Laüchli, A. y Epstein, E. (1987)** Influx of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> into roots of salt-stressed cotton seedlings. *Plant Physiol.* **83**: 510-516.
- Cregan, P.B. y Keyser, H.H. (1986)** Host restriction of nodulation by *Bradyrhizobium japonicum* strain USDA 123 in soybean. *Crop. Sci.* **26**: 911-916.
- Csonka, L.N. (1989)** Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* **53**: 121-147.
- Cubero, J.I. (1983)** Origen, evolución y mejora genética de las leguminosas-grano. En: *Leguminosas Grano*. J.I. Cubero y M.T. Moreno (eds.), pp. 35-52. Mundi-Prensa, Madrid.
- Cubero, J.I. y Suso, M.J. (1981)** Primitive and modern forms of *Vicia faba*. *Z. Kulturpfl.* **29**: 137-145.
- Cullimore, J.V. y Bennett, M.J. (1988)** The molecular biology and biochemistry of plant glutamine synthetase from root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. and other legumes. *Plant Physiol.* **132**: 387-393.
- Cullimore, J.V. y Sims, A.P. (1981)** An association between photorespiration and protein catabolism: Studies with *Chlamydomonas*. *Phytochem.* **20**: 597-600.
- Cullimore, J.V.; Lara, M.; Lea, P.J. y Mifflin, B.J. (1983)** Purification and properties of two forms of glutamine synthetase from the plant fraction of *Phaseolus* root nodules. *Planta* **157**: 245-253.

- Chaillou, S.; Morot-Gaudry, J.F.; Salsac, L.; Lesaint, C. y Jolivet, E. (1986)**  
Compared effects of nitrate and ammonium on growth and metabolism of French bean. *Physiol. Veg.* **24**: 679-687.
- Chaillou, S.; Vessey, J.K.; Morot-Gaudry, J.F.; Raper, C.D.; Henry, L.T. y Boutin, J.P. (1991)** Expression and characteristics of ammonium nutrition as affected by pH of root medium. *J. Exp. Bot.* **42**: 189-196.
- Chatt J. (1980)** Chemistry relevant to the biological fixation of nitrogen. En: Nitrogen Fixation. W.P.D. Stewart y J.R. Gallon (eds), pp. 1-17. Academic Press, Londres
- Chen, F.-L. y Cullimore, J.V. (1988)** Two isoenzymes of NADH-dependent glutamate synthase in root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* **88**: 1411-1417.
- Chen, F.-L. y Cullimore, J.V. (1989)** Location of two isoenzymes of NADH-dependent glutamate synthase in root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* **179**: 441-447.
- Chen, F.-L.; Bennett, M.J. y Cullimore, J.V. (1990)** Effect of the nitrogen supply on the activities of isoenzymes of NADH-dependent glutamate synthase and glutamine synthetase in root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. *J. Exp. Bot.* **231**: 1215-1221.
- Chen, W.X.; Yan, G.H. y Li, J.L. (1988)** Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**: 392-397.

**Chen, W.X.; Li, G.H. y Qi, Y.L. (1991)** *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. Int. J. Syst. Bacteriol. **41**: 275-280.

**Chow, W.S.; Ball, M.C. y Anderson, J.M. (1990)** Growth and photosynthetic responses of spinach to salinity: Implications of K<sup>+</sup> nutrition for salt tolerance. Aust. J. Plant Physiol. **17**: 563-578.

**Dailey, F.A.; Warner, R.L.; Somers, D.A. y Kleinhofs, A. (1982)** Characteristics of a nitrate reductase barley mutant deficient in NADH: Nitrate reductase. Plant Physiol. **69**: 1200-1204.

**Daines, R.J. y Gould, A.R. (1985)** The cellular basis of salt tolerance studied with tissue cultures of the halophytic grass *Distichlis spicata*. Plant Physiol. **119**: 269-280.

**Davis, D.D. (1986)** The fine control of cytosolic pH. Physiol. Plant. **67**: 702-706.

**Day, D.A.; Ou Yang, L.-J. y Udvardi. M.K. (1990)** Nutrient exchange across the peribacteroid membrane of isolated symbiosomes. En: Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives. P.M. Gresshoff, G. Stacey y W.E. Newton (eds.). Chapman and Hall, New York, pp. 857.

**Dean J.R y Clark R.W. (1980)** Effect of low level nitrogen fertilization on nodulation acetylene reduction and dry matter in faba bean and three other legumes. Can. J. Plant. Sci. **60**: 121-130.

- Delgado, M.J.; Garrido, J.M.; Poveda, J.L y Ligeró, F. (1992)** Effect of sodium chloride stress on nitrogen fixation by *Vicia faba* and *Pisum sativum* nodules. *Physiol. Plant.* **85**: p. A40, 226.
- Deroche, M.-E. y Carrayol, E. (1989)** Some properties of legume nodule phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol. Biochem.* **27**: 379-386.
- Dixon, R.O.D. (1968)** Hydrogenase in pea root nodule bacteroids. *Arch. Microbiol.* **85**: 272-283.
- Dixon, R.O.D. (1972)** Hydrogenase in legume root bacteroids: Occurrence and properties. *Arch. Microbiol.* **85**: 193-201.
- Dixon, R.O.D.; Berlier, Y.M. y Lespinat, P.A. (1981)** Respiration and nitrogen fixation in nodulated roots of soybean and pea. *Plant Soil* **61**: 135-143.
- Döbereiner, J.; Day, J.M. y Dart, J.M. (1972)** Nitrogenase activity and oxygen sensitivity of the *Paspalum notatum*-*Azotobacter paspali* association. *J. Gen. Microbiol.* **71**: 103-116.
- Dracup, M. (1991)** Increasing salt tolerance of plants through cell culture requires greater understanding of tolerance mechanism. *Aust. J. Plant. Physiol.* **18**: 1-15.
- Dreyfus, B.; García, J.L. y Gillis, M. (1988)** Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**: 89-98.

- Dubey, R.S. (1985)** Effect of salinity on nucleic acid metabolism of germinating rice seeds differing in salt tolerance. *Plant Physiol. Biochem.* **12**: 9-16.
- Dubey, R.S. y Rani, M. (1987)** Proteases and proteins in germinating rice seeds in relation to salt tolerance. *Plant Physiol. Biochem.* **14**: 174-182.
- Dubey, R.S. y Rani, M. (1989)** Influence of NaCl salinity on growth and metabolic status of proteins and amino acids in rice seedlings. *J. Agro. Crop. Sci.* **162**: 97-106.
- Dubey, R.S. y Rani, M. (1990)** Influence of NaCl salinity on the behaviour of protease, aminopeptidase and carboxypeptidase in rice seedlings in relation to salt tolerance. *Aust. J. Plant Physiol.* **17**: 215-221.
- Dubey, R.S. y Sharma, K.N. (1990)** Behaviour of phosphatases in germinating rice in relation to salt tolerance. *Plant Physiol. Biochem.* **28**: 17-26.
- Duc, G. (1980)** Activité fixatrice d'azote des légumineuses. Possibilités de sélection. Beaucauzé. Angers, 24-26 Sept.
- Duc, G. y Picard, J. (1986)** Note on the presence of the sym-1 gene in *Vicia faba* hampering its symbiosis with *Rhizobium leguminosarum*. *Euphytica* **35**: 61-64.
- Eaglesham, A.R.J.; Hassouna, S. y Seegers, R. (1983)** Fertilizer-N effects on nitrogen fixation by cowpea and soybean. *Agron. J.* **75**: 61.

- Edwards, J.W. y Coruzzi, G.M. (1989)** Photorespiration and light act in concert to regulate the expression of the nuclear gene for chloroplast glutamine synthetase. *Plant Cell* **1**: 241-248.
- Edwards, J.W.; Walker, E.L. y Coruzzi, G.M. (1990)** Cell-specific expression in transgenic plants reveals nonoverlapping roles for chloroplast and cytosolic glutamine synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 3459-3463.
- Egli, M.A.; Griffith, S.M.; Miller, S.S.; Anderson, M.P. y Vance, C.P. (1989)** Nitrogen assimilating enzyme activities and enzyme protein during development and senescence of effective and plant gene-controlled ineffective alfalfa nodules. *Plant Physiol.* **93**: 898-904.
- Egli, M.A.; Larson, R.J.; Hruschka, W.R. y Vance, C.P. (1991)** Synthesis of nodulins and nodule-enhanced polypeptides by plant gene-controlled ineffective alfalfa nodules. *J. Exp. Bot.* **44**: 969-997.
- Ehmke, A. y Hartmann, T. (1976)** Properties of glutamate dehydrogenase from *Lemna minor*. *Phytochem.* **15**: 1611.
- Eisbrenner, G. y Evans, H.J. (1983)** Spectral evidence for a component involved in hydrogen metabolism of soybean nodule bacteroids. *Plant Physiol.* **70**: 1667-1672.
- Elkan, G.H. (1992)** Taxonomy of the rhizobia. *Can. J. Microbiol.* **38**: 446-450.
- Elsheikh, E.A.E. y Wood, M. (1990)** Effect of salinity on growth, nodulation and nitrogen yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *J. Exp. Bot.* **41**: 1263-1269.

**Emmerich, D.W.; Ruíz-Argüeso, T.; Ching, T.M. y Evans, H.J. (1979)** Hydrogen-dependent nitrogenase activity and ATP formation in *Rhizobium japonicum* bacteroids. *J. Bacteriol.* **137**: 153-160.

**Epstein, E. (1985)** Salt-tolerant crops: Origins, development and prospects of the concept. *Plant Soil.* **89**: 187-198.

**Epstein, E. y Norlyn, J.D. (1977)** Seawater-based crop production: A feasibility study. *Sci.* **197**: 249-251.

**Evans, H.J. (1954)** Diphosphopyridine nucleotide-nitrate reductase from soybean nodules. *Plant Physiol.* **29**: 298-301.

**Evans, H.J.; Purohit, K.; Cantrell, M.A.; Eisbrenner, G.; Russell, S.A.; Hanus, F.J. y Lepo, J.E. (1981)** Hydrogen losses and hydrogenases in nitrogen-fixing organisms. En: *Current Perspectives in Nitrogen Fixation*. A.H. Gibson y W.E. Newton (eds.), pp. 84-96. Australian Academy of Sciences, Camberra.

**Evans, H.J.; Russell, S.A.; Hanus, F.J.; Harker, A.R.; Lambert, G.R. y Dalton, D.A. (1985)** Biochemical characterization, evaluation and genetics of hydrogen recycling in *Rhizobium*. En: *Nitrogen Fixation and Carbon Dioxide Metabolism*. P.W. Ludden y J. E. Burris (eds). pp. 3-11. Elsevier Science Publishing Co.

**Evans, H.J.; Russell, S.A.; Hanus, F.J.; Harker, A.R.; Pappen, H.; Zuber, M. (1987)** Physiology, biochemistry and genetics of the uptake hydrogenase in rhizobia. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**: 335-361.

- Faria, S.M.; Hay, G.T. y Sprent, J.I. (1988)** Entry of rhizobia into roots of *Mimosa scabrella* Bentham occurs between epidermal cells. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 2291-2296.
- Farnden, K.J.F. y Robertson, J.G. (1980)** Methods for studying enzymes involved in metabolism related to nitrogenase. En: *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*. F.J. Bergersen (ed.), pp. 265-314. J. Wiley and Sons, New York.
- Farquhar, G.D.; O'Leary, M.H. y Berry, J.A. (1982)** On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Aust. J. Plant Physiol.* **9**: 121-137.
- Farquhar, G.D.; Ehleringer, J.R. y Hubick, K.T. (1989)** Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**: 503-537.
- Fauque, G.; Peck, H.D., Jr.; Moura, J.J.G.; Huynh, B.H.; Berlier, Y.; der-Vartanian, D.V.; Texeira, M.; Przybyla, A.E.; Lespinat, A.T.; Moura, I. y LeGall, J. (1988)** The three classes of hydrogenases from sulfate-reducing bacteria of the genus *Desulfobivrio*. *FEMS Microbiol. Rev.* **54**: 299-344.
- Fernández-Conde, M.E.; Maldonado, J.M. y de la Haba, P. (1992)** Variaciones rítmicas de las actividades glutamina sintasa y ferredoxina-glutamato sintasa en hojas de girasol. I Reunión Nacional de Metabolismo del Nitrógeno Inorgánico. Málaga, Enero 1992, p. 61.

- Feigin A.; Rylski, I. y Shalhevet, J. (1984)** Response of melon plants to different combinations of NO and Cl<sup>-</sup> in saline nutrient solutions. Soil Salinity under Irrigation-Processes and Management, Inter. Conference, Soc. Soil Sci. and Israel Soc. Soil Sci., Bet Dagan, Israel.
- Filippova, K.F. (1959)** The effect of different degrees of salinity on the nitrogen-fixing capacity of nodule bacterial of lucerne. I.Z.V. Estestv. Nauch. Inst. Molotov. Univ. 13. 113-120. Fide Soils Fertile, Harpenden **22**: 450, 2783.
- Finan, T.M.; Hirsch, A.M.; Leigh, J.A.; Johansen, E.; Kuldau, G.A.; Deegan, S.; Walker, G.C. y Signer, E.R. (1985)** Symbiotic mutants of *Rhizobium meliloti* that uncouple plant from bacterial differentiation. Cell **40**: 869.
- Fischer, H.M. y Hennecke, H. (1987)** Direct response of *Bradyrhizobium japonicum* nifA-mediated nif gene regulation to cellular oxygen status. Mol. Gen. Genet. **209**: 621-626.
- Fischer, P. y Klein, U. (1988)** Localization of nitrogen assimilating enzymes in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol. **88**: 947-952.
- Flowers, T.J.; Troke, P.F. y Yeo, A.R. (1977)** The mechanism of salt tolerance in halophytes. Ann. Rev. Plant Physiol. **28**: 89-121.
- Ford, C.W. (1984)** Accumulation of low molecular weight solutes in water-stressed tropical legumes. Phytochem. **23**: 1007-1015.
- Forde, B.J. y Cullimore, J.V. (1989)** The molecular biology of glutamine synthetase in higher plant. Oxf. Surv. Plant Mol. Biol. **6**: 247-296.

**Forde, B.J.; Day, H.M.; Turton, J.F.; Shen, W.J.; Cullimore, J.V. y Oliver, J.E. (1989)** Two glutamine synthetase genes from *Phaseolus vulgaris* L. display contrasting developmental and spatial pattern of expression in transgenic *Lotus corniculatus* plant. *Plant Cell* **1**: 391-401.

**Fougère, F.; LeRudulier, D. y Streeter, J.G. (1991)** Effects of salt stress on amino acid, organic acid, and carbohydrate composition of roots, bacteroids and cytosol of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* **96**: 1228-1236.

**Franco, A.A.; Pereina, J.C. y Neyra, C.A. (1979)** Seasonal patterns of nitrate reductase and nitrogenase activities in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.* **63**: 421-424.

**Franssen, H.J.; Nap, J.P. y Bisseling, T. (1992)** Nodulins in root nodule development. En: *Biological Nitrogen Fixation*. G. Stacey, H.J. Evans y R.H. Burris (eds.), pp. 598-624. Chapman and Hall, New York.

**Galiba, G. y Yamada, Y. (1988)** A novel method for increasing the frequency of somatic embryogenesis in wheat tissue culture by NaCl and KCl supplementation. *Plant Cell Rep.* **7**: 55-58.

**Galiba, G.; Simon-Sakardi, L.; Salgo, A. y Kocsy, G. (1989)** Genotype dependent adaptation of wheat varieties to water stress in vitro. *Plant Physiol.* **134**: 730-735.

- Galván, F.; Márquez, A.J. y Vega, J.M. (1984)** Purification and molecular properties of ferredoxin glutamate synthase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* **162**: 180-187.
- Gallon, J.R. y Chaplin, A.E. (1987)** Nitrogen fixation in perspective. En: An Introduction to Nitrogen Fixation. J.R. Gallon y A.E. Chaplin (eds.), pp. 1-10. Cassell, Londres.
- Garrido, J.M. (1992)** Estrés salino en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. Fijación de nitrógeno y metabolismo carbonado en nódulos de *Pisum sativum*. Tesina de Licenciatura, Univ. de Granada, 200 pp.
- Giannakis, C.; Nicholas, D.J.D y Wallace, W. (1988)** Utilization of nitrate by bacteroids of *Bradyrhizobium japonicum* in the soybean root nodule. *Planta* **174**: 51-58.
- Givan, C.V. (1979)** Metabolic detoxification of ammonia in tissues of higher plants. *Phytochem.* **18**: 375-382.
- Gill, K.S. (1987)** Effects of soil alkalinity on growth, yield and some biochemical parameters at grain filling stages in cowpea and *Sesbania cannabian*. *Ind. J. Plant Physiol.* **30**: 38-41.
- Gloude-mans, T.; de Vries, S.C.; Bussink, H.J.; Malik, N.S.A.; Franssen, H.J.; Louwerse, J. y Bisseling, T. (1987)** Nodulin gene expression during soybean (*Glycine max*) nodule development. *Plant Mol. Biol.* **8**: 395.

- Gloude-mans, T.; Bhuvan-eswari, T.V.; Moerman, M.; van Brussel, A.A.N.; van Kammen, A. y Bisseling, T. (1989)** Involvement of *Rhizobium leguminosarum* nodulation genes on gene expression in pea root hairs. *Plant Mol. Biol.* **12**: 157-167.
- Gö-ring, H. y Plescher, F. (1986)** Proline accumulation induced weak acids and IAA in coleoptiles of wheat seedlings. *Biol. Plant.* **28**: 401-406.
- Govers, F.; Nap, J.P.; van Kammen, A. y Bisseling, T. (1987)** Nodulins in the developing root nodule. *Plant. Physiol. Biochem.* **25**: 309.
- Graham, P.H. (1964)** The application of computer techniques to the taxonomy of root nodule bacteria of legumes. *J. Gen. Microbiol.* **35**: 511-517.
- Graham, P.H. y Rosas, J.C. (1977)** Growth and development of indeterminate bush and climbing cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. inoculated with *Rhizobium*. *J. Agric. Sci.* **88**: 503-508.
- Graig, G.F.; Atkins, C.A. y Bell, D.T. (1991)** Effect of salinity on growth of four strain of *Rhizobium* and their infectivity and effectiveness on two species of Acacia. *Plant Soil* **133**: 253-262.
- Grattan, S.R. y Maas, E.V. (1988)** Effect of salinity on phosphate accumulation and injury in soybean: 1. Influence of CaCl<sub>2</sub>/NaCl ratios. *Plant Soil* **105**: 25-32.
- Green, P.D. y Wong, P.P. (1992)** Subunit analysis of glutamine synthetase isozymes of tepary bean (*Phaseolus acutifolius* Gray). *Plant Sci.* **82**: 179-186.

- Greenway, H. y Munns, R. (1980)** Mechanism of salt tolerance in nonhalophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **31**: 149-190.
- Grierson, D. y Corey, S.N. (1988)** *Plant Molecular Biology*, 2nd ed. Blackie, London. 243 pp.
- Groat, R.G. y Vance, C.P. (1981)** Root nodule enzymes of ammonia assimilation in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* **67**: 1198-1203.
- Groat, R.G.; Vance, C.P. y Barnes, D.K. (1984)** Host plant nodule enzymes associated with selection for increased N<sub>2</sub> fixation in alfalfa. *Crop Sci.* **24**: 895-898.
- Guerrero, M.G.; Vega, J.M. y Losada, M. (1981)** The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **32**: 169-204.
- Guerin, V.; Trinchant, J.C. y Rigaud, J. (1990)** Nitrogen fixation (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> reduction) by broad bean (*Vicia faba* L.) nodules and bacteroids under water-restricted conditions. *Plant Physiol.* **92**: 959-601.
- Hafeez, F.Y.; Aslam, Z. y Malik, K.A. (1988)** Effect of salinity and inoculation on growth, nitrogen fixation and nutrient uptake of *Vigna radiata* L. Wilczek. *Plant Soil* **106**: 3-8.
- Hagberg, A. y Sjodin, J. (1975)** Broad bean. En: *Food Protein Sources*. N.W. Pirie (ed.). pp. 117-119. Cambridge University Press, Cambridge.

- Handa, S.; Handa, A.K.; Hasegawa, P.M. y Bressan, R.A. (1986)** Proline accumulation and the adaptation of cultured plant cells to water stress. *Plant Physiol.* **80**: 938-945.
- Hanelt, P. (1972)** Die infraspezifische variabilität von *Vicia faba* L. und ihre gliederung. *Kult'pflanz.* **20**: 75-128.
- Hanson, A.D. y Hitz, W.D. (1982)** Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **33**: 163-203.
- Hardanson, G.; Danso, S.K.A; Zapata, F. y Reichardt, K. (1991)** Measurements of nitrogen fixation in faba bean dilution and 'A-value' methods. *Plant Soil* **131**: 161-168.
- Harker, A.R.; Xu, L.S.; Hanus, F.J. y Evans, H.J. (1984)** Some properties of the nickel-containing hydrogenase of chemolithotrophically grown *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* **159**: 850-856.
- Hasewaga, P.M.; Bressan, R.A. y Handa, A.K. (1986)** Cellular mechanisms of salinity tolerance. *Hort. Sci.* **21**: 1317-1324.
- Hatata, M. (1982)** Specific effect of certain salts on nitrogen metabolism of young corn seedlings. *Acta Bot. Pol.* **51**: 263-273.
- Hayakawa, T.; Kamachi, K.; Oikawa, M.; Ojima, K. y Yamaya, T. (1990)** Response of glutamine synthetase and glutamate synthase isoforms to nitrogen sources in rice cell cultures. *Plant Cell Physiol.* **31**: 1071-1077.

- Hayakawa, T.; Yamaya, T.; Kamichi, K. y Ojima, K. (1992)** Purification, characterization and immunological properties of NADH-dependent glutamate synthase from rice cell cultures. *Plant Physiol.* **98**: 1317-1322.
- Hecht, U.; Oelmuller, R.; Schmidt, S. y Mohr, H. (1988)** Action of light, nitrate and ammonium on the levels of NADH- and ferredoxin-dependent glutamate synthases in the cotyledons of mustard seedlings. *Planta* **175**: 130-138.
- Heichel, G.H.; Barnes, D.K. y Vance, C.P. (1981)** Nitrogen fixation of alfalfa in the seedling year. *Crop. Sci.* **21**: 330-335.
- Helal, M.; Koch, K. y Mengel, K. (1975)** Effect of salinity and potassium on the uptake of nitrogen and on nitrogen metabolism in young barley plants. *Physiol. Plant.* **35**: 310-313.
- Helal, H.M. y Mengel, K. (1979)** Nitrogen metabolism of young barley plants as affected by NaCl-salinity and potassium. *Plant Soil* **51**: 547-562.
- Herdina, J.A. y Silsbury, J.H. (1991)** Estimating nitrogenase activity of faba bean (*Vicia faba*) by acetylene reduction (AR) assay. *Aust. J. Plant Physiol.* **17**: 489-502.
- Hervás, A. (1988)** Selección de razas de *Rhizobium leguminosarum* y su tolerancia al nitrógeno combinado en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. Tesis Doctoral, Univ. Granada, 396 pp.

- Hervás A.; Caba J.M.; Ligeró F. y Lluch C. (1991)** Effect of combined nitrogen on dinitrogen fixation and productivity in *Pisum Sativum* L. inoculated with different strains of *Rhizobium*. *Chemosphere* **22**: 1153-1160.
- Hewitt, E.J. (1966)** Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Comm. Agric. Bur. Tech. Commun. No. 22, 2nd Ed.
- Hidalgo, E.; Palacios, J.M.; Murillo, J. y Ruíz-Argüeso, T. (1992)** Nucleotide sequence and characterization of four additional genes of the hydrogenase structural operon from *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae*. *J. Bacteriol.* **174**: 4130-4139.
- Hirasawa, M. y Tamura, G. (1984)** Flavin and iron-sulfur containing ferredoxin-linked glutamate synthase from spinach leaves. *J. Biochem.* **95**: 983-994.
- Hirasawa, M.; Chang, K.T. y Knaff, D.B. (1991)** The interaction of ferredoxin and glutamate synthase-cross linking and immunological studies. *Arch. Biochem. Biophys.* **286**: 171-177.
- Hirasawa, M.; Robertson, D.E.; Ameyibor, E.; Johnson, M.K. y Knaff, D.B. (1992)** Oxidation-reduction properties of the ferredoxin-linked glutamate synthase from spinach leaf. *Biochem. Biophys. Acta* **1100**: 105-108.
- Hirel, B.; Perrot-Rechenmann, C.; Suzuki, A.; Vidal, J. y Gadal, P. (1982)** Glutamine synthetase in spinach leaves and immunocytochemical localization. *Plant Physiol.* **69**: 983-987.

- Hirel, B.; Bouet, C.; King, B.; Layzell, D.; Jacobs, F. y Verma, D.P.S. (1987)** Glutamine synthetase genes are regulated by ammonia provided externally or by symbiotic nitrogen fixation. *EMBO J.* **6**: 1167-1171.
- Ho, L.C.; Grange, R.I. y Picken, A.J. (1987)** An analysis of the accumulation of water and dry matter in tomato fruit. *Plant Cell Environ.* **10**: 157-162.
- Högberg, P. y Kvarnström, M. (1982)** Nitrogen fixation by the woody legume *Leucaena leucocephala* in Tanzania. *Plant Soil* **66**: 21-28.
- Höpfner, M.; Reifferscheid, G. y Wild, A. (1988)** Molecular composition of glutamine synthetase of *Sinapis alba* L. *Z. Naturforsch.* **43c**: 194-198.
- Höpfner, M.; Ochs, G. y Wild, A. (1990)** Glutamine synthetases of green and etiolated leaves of *Sinapis alba*. *Planta* **181**: 155-161.
- Hopmans, P.; Douglas, L.A. y Chalk, P.M. (1984)** Effect of soil salinity and mineral nitrogen on the acetylene reduction activity of *Trifolium subterraneum* L. *Aust. J. Agric. Res.* **35**: 9-15.
- Hua, S.S.; Tsai, V.Y.; Lichens, G.M. y Noma, A.N. (1982)** Accumulation of aminoacids in *Rhizobium* sp. strain WR1001 in response to sodium chloride salinity. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 135-140.
- Hunt, S.; Gaito, S.T. y Layzell, D.B. (1988)** Model of gas exchange and diffusion in legume nodules. II. Characterisation of the diffusion barrier and estimation of the concentrations of CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> and N<sub>2</sub> in the infected cells. *Planta* **173**: 128-141.

- Hutchinson, J. (1964)** The Genera of Flowering Plants. Dicotyledones, **1**. Clarendon Press, Oxford. 516 pp.
- Hyman, M.R. y Arp, D.J. (1987)** Acetylene is an active-site-directed, slow-binding, reversible inhibitor of *Azotobacter vinelandii* hydrogenase. *Biochem.* **26**: 6447-6454.
- Imperial, J.; Hoover, T.R.; Madden, M.S.; Ludden, P.W. y Shah, V.K. (1989)** Substrate reduction properties of dinitrogenase activated *in vitro* are dependent upon the presence of homocitrate or its analogues during iron-molybdenum cofactor synthesis. *Biochem. USA* **28**: 7796-7799.
- Ingle, J.; Joy, K.W. y Hageman, R.H. (1966)** The regulation of activity of enzymes involved in the assimilation of nitrate by higher plants. *Biochem. J.* **100**: 577-584.
- Irigoyen, J.J.; Emerich, D.W. y Sánchez-Díaz, M. (1992)** Alfalfa leaf senescence induced by drought stress: Photosynthesis, hydrogen peroxide metabolism, lipid peroxidation and ethylene evolution. *Physiol. Plant.* **84**: 67-72.
- Irigoyen, J.J.; Emerich, D.W. y Sánchez-Díaz, M. (1992)** Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugar in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiol. Plant.* **84**: 55-60.
- Itagaki, T.; Dry, I.B. y Wiskich, J.T. (1988)** Purification and properties of NAD-glutamate dehydrogenase from turnip mitochondria. *Phytochem.* **27**: 3373-3378.

- Jarvis, B.D.W.; Gillis, M. y DeLey, J. (1986)** Intra- and inter-generic similarities between the ribosomal ribonucleic acid cistrons of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species and some related bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**: 129-138.
- Jeschke, W.D.; Wolf, O. y Hartung, W. (1992)** Effect of NaCl salinity on flows and partitioning of C, N and mineral ions in whole plants of white lupin, *Lupinus albus* L. *J. Exp. Bot.* **43**: 777-788.
- Jones, B.L.; Agarwal, A.K. y Keister, D.L. (1985)** Inhibition of growth of *Rhizobium japonicum* by cyclic GMP. *J. Bacteriol.* **164**: 757-761.
- Jordan, D.C. (1984)** *Rhizobiaceae*. En: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8 ed. R.E. Buchanan y N.E. Gibson, (eds), pp. 302-324. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Kahane, I. y Poljakoff-Mayber, A. (1968)** Effect of substrate salinity on the ability for protein synthesis in pea roots. *Plant Physiol.* **43**: 1115-1119.
- Kaiser, J.J. y Lewis, O.A.H. (1984)** Nitrate reductase and glutamine synthetase activity in leaves and roots of nitrate fed *Helianthus annuus* L. *Plant Soil* **70**: 127-130.
- Kamachi, K.; Amemiya, Y.; Ogura y N.; Nakagawa, H. (1987)** Immuno-gold localization of nitrate reductase in spinach (*Spinacia oleracea*) leaves. *Plant Cell Physiol.* **28**: 333-338.

- Kamachi, K.; Yamaya, T.; Hayakawa, T.; Mae, T. y Ojima, K. (1992)** Changes in cytosolic glutamine synthetase polypeptide and its mRNA in a leaf blade of rice plants during natural senescence. *Plant Physiol.* **98**: 1323-1329.
- Kanamori, T.; Konishi, S. y Takahashi, E. (1972)** Inducible formation of glutamate dehydrogenase in rice plant roots by the addition of ammonia to the media. *Physiol. Plant.* **26**: 1-6.
- Kassem, M.; Capellano, A. y Gounot, A.M. (1985)** Effets du chlorure de sodium sur la croissance *in vitro*, l'infectivité et l'efficacité de *Rhizobium meliloti*. *MIRCEN J.* 1, 63-75.
- Kay, D.E. (1979)** Legumbres alimenticias. Acribia. S.A. 437 pp.
- Kendall, A.C.; Wallsgrove, R.M.; Hall, N.P.; Turner, J.C. y Lea, P.J. (1986)** Carbon and nitrogen metabolism in barley (*Hordeum vulgare* L.) mutants lacking ferredoxin-dependent glutamate synthase. *Planta* **168**: 316-323.
- Keys, A.J.; Bird, I.F.; Cornelius, M.J.; Lea, P.J.; Wallsgrove, R.M. y Mifflin, B.J. (1978)** The photorespiratory nitrogen cycle. *Nature* **275**: 741-743.
- Kijne, J.W. (1992)** The *Rhizobium* infection process. En: *Biological Nitrogen Fixation*. G. Stacey, H.J. Evans y R.H. Burris (eds.), pp. 349-398. Chapman and Hall, New York.
- Klaus, R.E.; Berger, M.G. y Fock, H.P. (1985)** Effect of light intensity on ammonia assimilation in maize leaves. *Photo. Res.* **6**: 221-228.

- Knaff, D.B.; Hirasawa, M.; Ameybor, E.; Fu, W. y Johnson, M.K. (1991)** Spectroscopic evidence for a 3Fe-4S cluster in spinach glutamate synthase. *J. Biol. Chem.* **266**: 5080-5084.
- Kneen, B.E.; LaRue, T.A. y Weedin, N. (1984)** Genes reported to affect symbiotic nitrogen fixation in peas, *Pisum*. *News Lett.* **16**: 31-34.
- Knox, J.P.; Day, S. y Roberts, K. (1989)** A set of cell surface glycoproteins from an early marker of cell position but not cell type in the root apical meristem of *Daucus carota* L. *Develop.* **106**: 47-56.
- Kohl D.H.; Schubert K.R.; Carter M.B.; Hagedron C.H. y Shearer, G. (1988)** Proline metabolism in nitrogen-fixing root nodules: Energy transfer and regulation of purine synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 2036-2040.
- Kohl D.H.; Kennelly, E.J.; Zhu, Y.-Z.; Schubert K.R. y Shearer, G. (1991)** Proline accumulation, nitrogenase (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> reducing) activity, and activities of enzymes related to proline metabolism in drought stressed soybean nodules. *J. Exp. Bot.* **42**: 831-837.
- Kozlowski, T.T. (1972)** Water deficits and plant growth. pp. 177-216. Academic Press. Inc., New York.
- Krebs, H.A.G. y Eggleston, L.V. (1974)** The regulation of the pentose phosphate cycle in rat liver. *Adv. Enz. Regul.* **12**: 421-434.

- Kumar, P.A. y Abrol, Y.P. (1990)** Ammonia assimilation in higher plants. En: Nitrogen in Higher Plants. Y.P. Abrol (ed.), pp. 159-179. Research Studies Press LTD, Taunton, Somerset.
- Lachica, M.; Recalde, L. y Esteban, E. (1965)** Análisis foliar. Métodos utilizados en la Estación Experimental del Zaidín. An. Edaf. y Agrobiol. **XXIV**: 589-610.
- Lachica, M.; Aguilar, A. y Yañez, J. (1973)** Análisis foliar. Métodos utilizados en la Estación Experimental del Zaidín (II). An. Edaf. y Agrobiol. **XXXII**: 1033-1047.
- Laemmli, U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T<sub>4</sub>. Nature **227**: 680-689.
- Lakshmi-Kumari, M.; Singh, C.S. y Subbarao, N.S. (1974)** Root hair infection and nodulation in lucerne *Medicago sativa* L. as influenced by salinity and alkalinity. Ibid. **40**: 261-268.
- Lambert, G.R.; Harker, A.R.; Cantrell, M.A.; Hanus, F.J.; Russel, S.A.; Haugland, R.A. y Evans, H.J. (1987)** Symbiotic expression of cosmid-borne *Bradyrhizobium japonicum* hydrogenase genes. Appl. Environ. Microbiol. **53**: 422-428.
- Langdale, G.W.; Thomas, J.R. y Littleton, T.G. (1973)** Nitrogen metabolism of stargrass as affected by nitrogen and soil salinity. Agron. J. **65**: 468-470.

- Langkamp, P.J.; Swinden, L.B. y Dalling, M.J. (1979)** Nitrogen fixation (acetylene reduction) by *Acacia pellita* on areas restored after mining at Groote Eylandt, Northern Territory. *Austr. J. Bot.* **30**: 57-106.
- Lara, M.; Cullimore, J.V.; Lea, P.J.; Mifflin, B.J.; Johnston, A.W.B. y Lamb, J.W. (1983)** Appearance of a novel form of plant glutamine synthetase during nodule development in *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* **157**: 254-258.
- Lara, M.; H. Porta; Padilla, J.; Folch, J. y Sanchez, F. (1984)** Heterogeneity of glutamine synthetase polypeptides in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* **76**: 1019-1023.
- LaRue, T.A. y Patterson, T.G. (1981)** How much nitrogen do legumes fix? *Adv. Agron.* **24**: 15-39.
- LaRue T.A.G. y Kurtz, W.G.W. (1973)** Stimulation of nitrogenase using a colorimetric determination for ethylene. *Can. J. Microbiol.* **19**: 304-305.
- Läuchli, A. (1984)** Salt exclusion: An adaptation of legumes for crops and pastures under saline conditions. En: *Salinity Tolerance in Plants - Strategies for Crop Improvement*. R.C. Staples y G.H. Toenniessen (eds.), pp. 171-188. J.Wiley and Sons, New York.
- Lauter, D.J. y Munns, D.N. (1986)** Salt resistance of chickpea genotypes in solutions salinized with NaCl or Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. *Plant Soil* **95**: 271-279.
- Lauter, D.J.; Munns, D.N. y Clarkin, K.L. (1981)** Salt response of chickpeas influenced by N supply. *Agron. J.* **73**: 961-966.

- Lazof, D. y Cheeseman, J.M. (1988)** Sodium and potassium compartmentation and transport across the roots of intact *Spergularia marina*. *Plant Physiol.* **88**: 1274-1278.
- Lea, P.J. y Fowden, L.F. (1975)** The purification and properties of glutamate dependent asparagine synthetase from *Lupinus albus*. *Proc. R. Soc. (London)* **B192**: 13-26.
- Lea, P.J. y Mifflin, B.J. (1974)** An alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature* **251**: 614-616.
- Lea, P.J.; Mills, W.R.; Wallsgrove, R.M. y Mifflin, B.J. (1982)** On the Origin of Chloroplasts. J.A. Schiff (ed.), pp. 149-178. Elsevier North Holland, New York.
- Lea, P.J.; Blackwell, R.D.; Chen, F.-L. y Hecht, U. (1990)** The enzymes of ammonia assimilation. En: *Methods in Plant Biochemistry*. Vol **3**. P.J. Lea (ed.), pp. 129-144. Academic Press. Londres.
- Lee, B. (1980)** Sources of reductant for nitrate assimilation in non-photosynthetic tissue. A review. *Plant Cell Environ.* **3**: 65-90.
- Leidi, E.O.; Silberbush, M.; Soares, M.I.M. y Lips, S.H. (1992)** Salinity and nitrogen nutrition studies on peanut and cotton plant. *J. Plant Nutr.* **15**: 591-604.
- Leisinger, T. (1987)** Biosynthesis of proline. En: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology, Vol. **1**. F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter y H.E.

Umbarger (eds.). Am. Soc. Microbiol., Washington, D.C.

**Lenee, P. y Chupeau, Y. (1989)** Development of nitrogen assimilating enzymes during growth of cells derived from protoplasts of sunflower and tobacco. *Plant Sci.* **59**: 109-117.

**Leonard, L.T. (1943)** A simple assembly for use in testing of culture of rhizobia. *J. Bacteriol.* **45**: 523-527.

**Levitt, J. (1980)** Responses of Plants to Environmental Stresses, Vol. **II**. Academic Press, New York.

**Levy, D. (1983)** Water deficit enhancement of proline and  $\alpha$ -amino nitrogen accumulation in potato plants and its association with susceptibility to drought. *Physiol. Plant.* **57**: 169-173.

**Lewis, O.A.M. y Pate, J.S. (1973)** The significance of transpiration derived nitrogen in protein synthesis in fruiting plants of pea (*Pisum sativum* L.) *J. Exp. Bot.* **80**: 596-606.

**Lewis, O.A.M.; James, D.M. y Hewitt, E.J. (1982)** Nitrogen assimilation in barley (*Hordeum vulgare* L cv. Mazurka) in response to nitrate and ammonium nutrition. *Ann. Bot.* **49**: 39-45.

**Lewis, O.A.M.; Leidi, E.O. y Lips, S.H. (1989)** Effect of nitrogen source on growth response to salinity stress in maize and wheat. *New Phytol.* **111**: 155-160.

- Li, Z.Z. y Gresshoff, P.M. (1990)** Developmental and biochemical regulation of 'constitutive' nitrate reductase activity in leaves of nodulating soybean. *J. Exp. Bot.* **231**: 1231-1238.
- Ligero, F.; Lluch, C. y Olivares, J. (1986)** Evolution of ethylene from roots of *Medicago sativa* plants inoculated with *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* **125**: 361-365.
- Ligero, F.; Lluch, C. y Olivares, J. (1987)** Evolution of ethylene from roots and nodulation rate of alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants inoculated with *Rhizobium meliloti* as affected by the presence of nitrate. *Plant Physiol.* **129**: 461-467.
- Ligero, F.; Caba J.M.; Lluch, C. y Olivares, J. (1991)** Nitrate inhibition of nodulation can be overcome by the ethylene inhibitor aminoethoxyvinylglycine. *Plant Physiol.* **97**: 1221-1225.
- Lightfoot, D.A.; Green, N.K. y Cullimore, J.V. (1988)** The chloroplast-located glutamine synthetase of *Phaseolus vulgaris* L.: Nucleotide sequence, expression in different organs and uptake into isolated chloroplasts. *Plant Mol. Biol.* **11**: 191-202.
- López-Ruíz, A.; Roldan, J.M.; Verbelen, J.P. y Díez, J. (1985)** Nitrate reductase from *Monoraphidium braunii*. *Plant Physiol.* **78**: 614-618.
- Loulakakis, C.A. y Roubelakis-Angelakis, K.A. (1990)** Intracellular localization and properties of NADH-glutamate dehydrogenase from *Vitis vinifera* L.: Purification and characterization of the major leaf isoenzyme. *J. Exp. Bot.* **41**: 1223-1230.

- Lowe, D.J.; Thorneley, R.N.F. y Smith, B.E. (1985)** Nitrogenase. En: Metaloproteins. Part 1: Metal Proteins with Redox Roles. P. Harrison (ed.), pp. 207-249. Verlag-Chemie, Basel.
- Loyola-Vargas, V.M.; Yáñez, A.; Caldera, J.; Oropeza, C.; Robert, M.L.; Quiroz, J. y Scorer, K.N. (1988)** Nitrogen metabolism in *Canavalia ensiformis* (L.) DC. II. Changing activities of nitrogen-assimilating enzymes during growth. *Plant Physiol.* **132**: 289-293.
- Mäck, G. y Tischner, R. (1990)** Glutamine synthetase oligomers and isoforms in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). *Planta* **181**: 10-17.
- Magasanik, B. (1982)** Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **16**: 135-168.
- Manhart, J.R. y Wong, P.P. (1979)** Nitrate reductase activities of *Rhizobia* and the correlation between nitrate reduction and nitrogen fixation. *Can. J. Microbiol.* **25**: 1169-1174.
- Mann, A.F.; Fentem, P.A. y Steward, G.R. (1979)** Identification of two forms of glutamine synthetase in barley (*Hordeum vulgare*). *BBRC* **88**: 515-521.
- Marques, I.A.; Oberholzer, M.J. y Erisman, K.H. (1983)** Effect of different inorganic nitrogen sources on photosynthetic carbon metabolism in primary leaves of non-nodulated *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* **71**: 555-561.

- Marqués, S.; Florencio, F.J. y Candau, P. (1992)** Purification and characterization of the ferredoxin-glutamate synthase from the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 6301. *Eur. J. Biochem.* **206**: 69-77.
- Márquez, A.J.; Gotor, C.; Romero, L.C.; Galván, F. y Vega, J.M. (1986)** Ferredoxin glutamate synthase from *Chlamydomonas reinhardtii*. Prosthetic groups and preliminary studies of mechanism. *Int. J. Biochem.* **18**: 531-535.
- Martínez, V. y Cerdá, A. (1989)** Nitrate reductase activity in tomato and cucumber leaves as influenced by NaCl and N source. *J. Plant Nutr.* **12**: 1335-1350.
- Martínez, E.; Segovia, L. y Mercante, T.M. (1991)** *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**: 417-426.
- Martínez-Bilbao, M.; Alaña, A.; Arizmendi, J.M. y Serra, J.L. (1987)** Inorganic nitrogen assimilation in the non-fixing cyanobacterium *Phormidium laminosum*. I. Cellular levels of glutamine synthetase and NADPH-dependent glutamate dehydrogenase. *Physiol. Plant.* **70**: 697-702.
- Martínez-Molina, E. y Olivares, J. (1982)** A note on evidence for involvement of pectolytic enzymes in infection process of *Medicago sativa* by *Rhizobium meliloti*. *J. Appl. Bacteriol.* **52**: 453-455.
- Maas, E.V. (1985)** Salt tolerance of plants. En: *Handbook of Plants Science in Agriculture*. B.R. Chistie (Ed.). CRC Press, Boca Ratón, Florida.

- Marwaha, R.S. y Juliano, B.O. (1976)** Aspects of nitrogen metabolism in the rice seedling. *Plant Physiol.* **57**: 923-929.
- Matoh, T.; Ida, S. y Takahashi, E. (1980)** Isolation and characterization of NADH-glutamate synthase from pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Physiol.* **21**: 1461-1474.
- Matsuzawa, T. e Ishiguro, I. (1980)**  $\Delta^1$ -Pyrroline-5-carboxylate reductase from baker's yeast. Further purification by affinity chromatography with 5'AMP-Sepharose 4B. *Biochim. Biophys. Acta* **616**: 381-383.
- Maxwell, C.A.; Hartwig, U.A.; Joseph, C.M. y Phillips, D.A. (1989)** A chalcone and two related flavonoids released from alfalfa roots induce *nod* genes of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* **91**: 842-847.
- Mazelis, M. (1980)** Amino acid catabolism. En: *The Biochemistry of Plants*, Vol. **5**. B.J. Mifflin (ed.), pp. 542-568. Academic Press, New York.
- McNally, S.F. y Hirel, B. (1983)** Glutamine synthetase isoforms in higher plants. *Physiol. Vég.* **21**: 761-779.
- McNally, S.F.; Hirel, B.; Gadal, P.; Mann, A.F. y Steward, G.R. (1983)** Glutamine synthetase of higher plants. Evidence for a specific isoform content related to their possible physiological role and their compartmentation within the leaf. *Plant Physiol.* **72**: 22-25.

- McParland, R.H.; Guevara, J.G.; Becker, R.R. y Evans, H.J. (1976)** The purification of the glutamine synthetase from the cytosol of soybean root nodules. *Biochem. J.* **153**: 597-606.
- Meeks, J.C.; Walk, C.P.; Schilling, N.; Shaffer, P.W.; Avissar, Y. y Chien, W.S. (1978)** Initial organic products of fixation of  $^{13}\text{N}$ -dinitrogen by root nodules of soybeans (*Glycine max*). *Plant Physiol.* **61**: 980-983.
- Melesse, T. y Caesar, K. (1992)** Stomatal and non-stomatal effects of salinity on photosynthesis in faba beans (*Vicia faba* L.). *J. Agron. Crop Sci.* **168**: 345-353.
- Mellor, R.B.; Christensen, T.M.I.E. y Werner, D. (1986)** Choline kinase II is present only in nodules that synthesize stable peribacteroid membranes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **83**: 659-663.
- Miao, G.-H.; Joshi, C.P. y Verma, D.P.S. (1990)** Nodulin-26: Topology and function in root nodules. En: *Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives*. P.M. Gresshoff, L.E. Roth, G. Stacey y W.E. Newton (eds.), pp. 755-782. Chapman and Hall, New York.
- Miao, G.-H.; Hirel, B.; Marsolier, M.C.; Ridge, R.W. y Verma, D.P.S. (1991)** Ammonia-regulated expression of a soybean gene encoding cytosolic glutamine synthetase in transgenic *Lotus corniculatus*. *Plant Cell* **3**: 11-22.
- Miflin, B.J. (1974)** The location of nitrite reductase and other enzymes related to amino acid biosynthesis in the plastids of roots and leaves. *Plant Physiol.* **54**: 550-555.

- Miflin, B.J. y Lea, P.J. (1980)** Ammonia assimilation. En: The Biochemistry of Plants. Vol. 5: Aminoacids and Derivates. P.J. Stumpf y E.E. Conn (eds.), pp. 169-202. Academic Press, New York.
- Miflin, B.J. y Lea, P.J. (1982)** Ammonia assimilation and amino acid metabolism. En: Nucleic Acids and Proteins in Plants I. Vol. 14a. D. Boulter y B. Parthier (eds.), pp. 5-47. Springer-Verlag, Berlin.
- Mikkonen, A. (1986)** Activities of some peptidases and proteinases in germinating kidney bean, *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plant.* **68**: 282-286.
- Millerd, A. (1975)** Biochemistry of legume seed proteins. *Annu. Rev. J. Plant Physiol.* **25**: 53-72.
- Minchin, F.R. y Pate, J.S. (1974)** Diurnal functioning of the legume root nodule. *J. Exp. Bot.* **25**: 295-308.
- Miranda-Ham, M.L. y Loyola-Vargas, V.M. (1987)** Study of enzymes involved in ammonia assimilation under water and salt stress in maize. *Plant Physiol.* **129**: 169-174.
- Miranda-Ham, M.L. y Loyola-Vargas, V.M. (1988)** Ammonia assimilation in *Canavalia ensiformis* plants under water and salt stress. *Plant Cell Physiol.* **29**: 747-753.
- Mishustin, E.M. y Yemstev, V.T. (1975)** Anaerobic nitrogen-fixing bacteria of different soil types. En: Nitrogen Fixation by Free-Living Microorganisms. W.D.P. Stewart (ed.), pp. 29-38. Cambridge University Press, Cambridge.

- Misra, N. y Dwivedi, U.N. (1990)** Nitrogen assimilation in germinating *Phaseolus aureus* seeds under saline stress. *Plant Physiol.* **135**: 719-724.
- Mitchell, J.P.; Shennan, C.; Grattan, S.R. y May, D.M. (1991a)** Tomato fruit yields and quality under water deficit and salinity. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **116**: 215-221.
- Mitchell, J.P.; Shennan, C. y Grattan, S.R. (1991b)** Developmental changes in tomato fruit composition in response to water deficit and salinity. *Physiol. Plant.* **83**: 177-185.
- Mittal, R. y Dubey, R.S. (1991)** Behaviour of peroxidases in rice: changes in enzyme activity and isoforms in relation to salt tolerance. *Plant Physiol. Biochem.* **29**: 31-40.
- Moftah, A.E. y Michel, B.E. (1987)** The effect of sodium chloride on solute potential and proline accumulation in soybean leaves. *Plant Physiol.* **83**: 238-240.
- Mohammad, R.M.; Akhavan-Kharazian, M.; Campbell, W.F. y Rumbaugh, M.D. (1991)** Identification of salt- and drought-tolerant *Rhizobium meliloti* L. strains. *Plant Soil* **134**: 271-276.
- Mohr, H.; Neininger, A. y Seith, B. (1992)** Control of nitrate reductase and nitrite reductase gene expression by light, nitrate and a plastidic factor. *Bot. Acta* **105**: 81-89.

- Morris, P.F.; Layzell, D.B. y Canvin, D.T. (1988)** Ammonia production and assimilation in glutamate synthase deficient mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **87**: 148-154.
- Mothes, K. von (1956)** Der einflub des wasserzustandes auf fermentprozesse und stoffumsatz. En: *Encyclopedia of Plant Physiology*. Vol. **3**, pp. 656-664. Springer Verlag, Berlin.
- Muhitch, M.J. (1991)** Tissue distribution and developmental patterns of NADH-dependent and ferredoxin-dependent glutamate synthase activities in maize (*Zea mays*) kernels. *Physiol. Plant.* **81**: 481-488.
- Muñoz-Blanco, J. y Cardenas, J. (1989)** Changes in glutamate dehydrogenase activity of *Chlamydomonas reinhardtii* under different trophic and stress conditions. *Plant Cell Environ.* **12**: 173-182.
- Murotava, V. (1931)** Common beans (*Vicia faba* L.). *Suppl. Environ. Bull. Appl. Bot. Genet. Plant. Breed.* (suppl. 50th).
- Nagel, M. y Hartmann, T. (1980)** Glutamate dehydrogenase from *Medicago sativa* L.: Purification and comparative kinetic studies of organ-specific multiple forms. *Zeitschrift für Naturforschung.* **35C**: 406-415.
- Nap, J.P. y Bisseling, T. (1989)** Nodulin function and nodulin gene regulation in root nodule development. En: *The Molecular Biology of Symbiotic Nitrogen Fixation*. P.M. Gresshoff (ed.), pp. 181-229. CRC Press, Boca Ratón, Florida.

- Nelson, L.M. y Salminen, S.O. (1982)** Uptake hydrogenase activity and ATP formation in *Rhizobium leguminosarum* bacteroids. J. Bacteriol. **151**: 989-995.
- Ng, B.H. (1987)** The effect of salinity on growth, nodulation and nitrogen fixation of *Casuarina equisetifolia*. Plant Soil **103**: 123-125.
- Nguyen, T.; Zelechowska, M.G.; Foster, V.; Bergmann, H. y Verma, D.P.S. (1985)** Primary structure of the soybean nodulin-35 gene encoding nodule-specific uricase localized in peroxisomes of uninfected cells of soybean. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**: 5040-5044.
- Nieman, R.H. (1962)** Some effects of sodium chloride on growth, photosynthesis and respiration of twelve crop plants. Bot. Gaz. **123**: 279-285.
- Nieman, R.H.; Clark, R.A.; Pap, D.; Ogata, G. y Maas, E.V. (1988)** Effects of salt stress on adenine and uridine nucleotide pools, sugar and acid-soluble phosphate in shoots of pepper and sunflower. J. Exp. Bot. **39**: 301-309.
- O'Brian, M.R. y Maier, R.J. (1985)** Role of ubiquinone in hydrogen dependent electron transport in *Rhizobium japonicum*. J. Bacteriol. **161**: 775-777.
- O'Brian, M.R. y Maier, R.J. (1988)** Hydrogen metabolism in *Rhizobium*: Energetics, regulation, enzymology and genetics. Adv. Microb. Physiol. **29**: 1-52.
- O'Neal, D. y Joy, K.W. (1973)** Localization of glutamine synthetase in chloroplasts. Nature, New Biol., **246**: 61-62.

- Oaks, A. y Hirel, B. (1985)** Nitrogen metabolism in roots. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **36**: 345-365.
- Oaks, A.; Jones, K. y Misra, S. (1979)** A comparison of glutamate synthase obtained from maize endosperms and roots. *Plant Physiol.* **63**: 793-795.
- Oaks, A.; Stulen, I.; Jones, K.; Winspear, M.J.; Misra, S. y Boesel, I.L. (1980)** Influence of amino acids and amonium on nitrate reduction in corn seedling. *Planta* **148**: 477-482.
- Oji, Y.; Otani, Y; Hosomi, Y; Wakiuchi, N. y Shiga, H. (1989)** Nitrate reduction in root and shoot and exchange of reduced nitrogen between organs in two-row barley seedlings under light-dark cycles. *Planta* **179**: 359-366.
- Okon, Y. (1984)** Response of cereal and forage grasses to inoculation with N<sub>2</sub>-fixing bacteria. En: *Advances in Nitrogen Fixation Research*. C. Veeger y W.E. Newton (eds.), pp. 303-309. Nijhoff, Wageningen.
- Okon, Y.; Heytler, P.G. y Hardy, R.W.F. (1983)** N<sub>2</sub> fixation by *Azospirillum brasilense* and its incorporation into host *Sesbania italica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 694-697.
- Olson, J.E.; Nakao, P.; Bohlool, B.B. y Gresshoff, P.M. (1989)** Lack of systemic suppression of nodulation in split root systems of supernodulating soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] mutants. *Plant Physiol.* **90**: 1347-1352.

- Ortega, J.L.; Blanco, L. y Lara, M. (1990)** Effect of high CO<sub>2</sub> concentration in nitrogen and carbon metabolism of the *Phaseolus vulgaris* root-nodules. 5th Int. Symp. Mol. Genet. Plant-Microbe Interact., Interlaken, Suiza, p.154.
- Ortega, J.L.; Sánchez, F.; Soberón, M. y Lara, M. (1992)** Regulation of nodule glutamine synthetase by CO<sub>2</sub> levels in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiol.* **98**: 584-587.
- Ostrem, J.A.; Vernon, D.M.; Olson, S.W. y Bohnert, H.J. (1987)** Proline accumulation is an early response to salt stress in *Messebrantenium crystallinum*. *Plant Physiol.* **83**: 5-47
- Pacovsky, R.S. y Fuller, G. (1991)** Nitrogen assimilation and partitioning in two nitrogen-fixing cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Soil* **132**: 139-148.
- Padilla, J.E.; Campos, F.; Conde, V.; Lara, M. y Sánchez, F. (1987)** Nodule-specific glutamine synthetase is expressed before the onset of nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Mol. Biol.* **9**: 65-74.
- Pahlich, E. y Gerlitz, C. (1980)** Deviation from Michaelis-Menton behaviour of plant glutamate dehydrogenase with ammonium as the variable substrate. *Phytochem.* **19**: 11-13.
- Palacios, J.M.; Leyva, A. y Ruíz-Argüeso, T. (1988)** Generation and characterization of hydrogenase deficient mutants in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Plant Physiol.* **132**: 412-416.

- Park, S.J. y Buttery, B.R. (1989)** Identification and characterization of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) lines well nodulated in the presence of high nitrate. *Plant Soil* **119**: 237-244.
- Pasqualini, S.; Lluch, C. y Antonielli, M. (1991)** Seed storage proteins in several genetic lines of *Vicia faba*. *Plant Physiol. Biochem.* **29**: 507-515.
- Pate, J.S. (1973)** Uptake, assimilation and transport of nitrogen compounds by plants. *Soil Biol. Biochem.* **5**: 109-119.
- Pate, J.S. y Dart, P.J. (1961)** Nodulation studies on legumes. IV. The influence of inoculant strain and time of application of ammonium nitrate on symbiotic response. *Plant Soil* **15**: 329-346.
- Pate, J.S. y Layzell, D.B. (1990)** Energetics and biological cost of nitrogen assimilation. En: *The Biochemistry of Plants*. Vol. **16**. P.J. Stumpf y E.E. Conn (eds.), pp. 1-41. Academic Press, New York.
- Patterson, T.G. y LaRue, T.A. (1983)** Nitrogen fixation by soybeans: Seasonal and cultivar effects, and comparison of estimates. *Crop Sci.* **23**: 488-492.
- Peach, K. y Tracey, M.V. (1955)** *Modern Methods of Plant Analysis*. Springer-Verlag. Berlin.
- Peoples, M.B. y Craswell, E.T. (1992)** Biological nitrogen fixation: Investments, expectations and actual contribution to agriculture. *Plant Soil* **141**: 13-39.

**Pessaraki, M. y Tucker, T.C. (1985)** Ammonium ( $^{15}\text{N}$ ) metabolism in cotton under salt stress. *J. Plant Nutr.* **8**: 1025-1045.

**Pessaraki, M., Huber, J.T. y Tucker, T.C. (1989a)** Protein synthesis in green beans under salt stress conditions. *J. Plant Nutr.* **12**: 1105-1121.

**Pessaraki, M., Huber, J.T. y Tucker, T.C. (1989b)** Protein synthesis in green beans under salt stress with two nitrogen sources. *J. Plant Nutr.* **12**: 1261-1377.

**Peterson, T.A.; Nieman, R.H. y Clark, R.A. (1987)** Nucleotide metabolism in salt-stresses *Zea mays* L. root tips. I. Adenine and uridine nucleotides. *Plant Physiol.* **85**: 984-989.

**Phillips, D.A.; Jones, M.B. y Foster, K.W. (1986)** Advantages of the nitrogen-15 dilution technique for field measurements of symbiotic dinitrogen fixation in legumes. En: *Field Measurement of Dinitrogen Fixation and Denitrification*. R.D. Hauck y R.W. Weaver (eds.), pp. 11-21. Amer. Soc. Agronomy, Madison.

**Planké, K.; Kennedy, I.R.; Devries, G.E.; Quispel, A. y van Brussel, A.A.N. (1977)** Location of nitrogenase and ammonia-assimilatory enzymes in bacteroids of *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium lupini*. *J. Gen. Microbiol.* **102**: 95-104.

**Polhill, R.M. y Raven, P.H. (1981)** *Advances in Legume Systematics*. I. Royal Botanic Gardens, Kew.

- Postgate, J. (1987)** Nitrogen Fixation, 2nd edition. Edward Arnold, Londres, 73 pp.
- Pueppke, S.G. (1986)** Physiology of nodule initiation in the nitrogen-fixing legume-*Rhizobium* symbiosis. *Physiol. Plant.* **67**: 262-266.
- Quetz, P.C.; Tischner, R. y Lorenzen, H. (1982)** Changes in the activity of enzymes involved in nitrogen metabolism in maize seedlings dependent on different nitrogen sources. *Biochem. Physiol. Pflanzen* **177**: 567-571.
- Rae, A.L.; Bonfante-Fasolo, P. y Brewin, B.J. (1992)** Structure and growth of infection threads in the legume symbiosis with *Rhizobium leguminosarum*. *J. Plant Physiol.* **2**: 385-395.
- Rainbird, R.M.; Atkins, C.A. y Pate, J.S. (1983)** Diurnal variations in the functioning of cowpea nodules. *Plant Physiol.* **72**: 308-312.
- Rains, D.W. (1986)** Isolation and characterization of mutant cell lines and plant: Salt tolerance. En: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol. **3**. I.K. Vasil (ed.), pp. 537-547. Academic Press, New York.
- Rao, K.P. y Rains, D.W. (1976)** Nitrate absorption by barley. I. Kinetics and energetics. *Plant Physiol.* **57**: 55-58.
- Rao, R.K. y Gnanam, A. (1990)** Inhibition of nitrate and nitrite reductase activities by salinity stress in *Sorghum vulgare*. *Phytochem.* **29**: 1047-1049.

- Rao, R.K.; Mannan, R.M.; Gnanam, A. y Bose, S. (1988)** Inhibition of nitrate and nitrite reductase induction in wheat by sandoz-9785. *Phytochem.* **27**: 685-692.
- Rasche, M.E. y Arp, D.J. (1989)** Hydrogen inhibition of nitrogen reduction by nitrogenase in isolated soybean nodule bacteroids. *Plant Physiol.* **91**: 663-668.
- Rawsthorne, S.; Minchin, F.R.; Summerfield, R.J.; Cookson, C. y Coombs, J. (1980)** Carbon and nitrogen metabolism in legume root nodules. *Phytochem.* **19**: 341-355.
- Rennenberg, H.J. (1984)** Fate of excess sulfur in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **35**: 121-153.
- Reuber, T.L.; Reed, J.W.; Glazebrook, J.; Urzainqui, A. y Walker, G.C. (1991)** Analyses of the roles of *R. meliloti* exopolysaccharides in nodulation. En: *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. H. Hennecke y D.P.S. Verma (eds), pp. 182-188. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- Rhodes, D.; Sims, A.P. y Folkes, B.F. (1980)** Pathway of ammonia assimilation in illuminated *Lemna minor* L.. *Phytochem.* **19**: 357-365.
- Rhodes, D.; Brunk, D.G. y Magalhaes, J.R. (1989)** Assimilation of ammonia by glutamate dehydrogenase?. En: *Plant Nitrogen Metabolism*. J.E. Poulton, J.T. Romeo y E.E. Conn (eds.), pp. 191-206. Plenum Press, New York.

- Richards, J.E. y Soper, R.J. (1978)** Effect of nitrogen fertilizer on yield, protein content and symbiotic nitrogen fixation in faba beans. *Agron. J.* **71**: 807-811.
- Rigaud, J. (1976)** Effet des nitrates sur la fixation d'azote par les nodules de haricot (*Phaseolus vulgaris* L.). *Physiol. Vég.* **14**: 297-308.
- Rigaud, J. y Puppo, A. (1975)** Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacteroids. *J. Gen. Microbiol.* **88**: 223-228.
- Roberts, G.P.; Leps, W.T.; Silver, L.E. y Brill, W.J. (1980)** Use of two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis to identify and classify *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**: 414-422.
- Robertson, J.G. y Farnden, K.J.F. (1980)** Ultrastructure and metabolism of the developing legume root nodule. En: *The Biochemistry of Plants*, Vol. **5**. B.J. Mifflin (ed.), pp. 66-113. Academic Press, New York.
- Robinson, R.A.; Slade, A.P.; Fox, G.G.; Phillips, R.; Ratcliffe, R.G. y Stewart, G.R. (1991)** The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism. *Plant Physiol.* **95**: 509-516.
- Robson, A.D. (1989)** The role of self regenerating pastures in rotation with cereals in Mediterranean areas. En: *The Role of Legumes in the Farming Systems of the Mediterranean Areas*. A.E. Osman, M.M. Ibrahim y M.A. Jones (eds.), pp. 217-236. Kluwer Academic. Dordrecht.

- Robson, R.L.; Eady, R.R.; Richardson, T.H.; Miller, R.W.; Hawkins, M. y Postgate, J.R. (1986)** The alternative nitrogenase of *Azotobacter chroococcum* is a vanadium enzyme. *Nature* **322**: 388-390.
- Ronis, D.H.; Sammons, D.J.; Kenworthy, W.J. y Meisinger, J.J. (1985)** Heritability of total and fixed N content of the seed in two soybean populations. *Crop. Sci.* **25**: 1-4.
- Roskoski, R.J. y van Kessel, C. (1985)** Annual, seasonal and diurnal variation in nitrogen fixation activity by *Inga jinicuil*, a tropical leguminous tree. *Oikos* **44**: 306-312.
- Roughley, R.J. y Dart, P.J. (1969)** Reduction of acetylene by nodules of *Trifolium subterraneum* as affected by root temperature, *Rhizobium* strain and host culture. *Arch. Microbiol.* **69**: 171-179.
- Rufty, T.W.; Volk, R.J. y Glass, A.D.M. (1992)** Relationship between carbohydrate availability and assimilation of nitrate. En: *Nitrogen Metabolism of Plants*. K. Mengel y D.J. Pilbeam (Eds.), pp. 103-119. Clarendon Press, Oxford.
- Ruíz-Argüeso, T.; Emerich, D.W. y Evans, H.J. (1979)** Hydrogenase system in legume nodules: A mechanism of providing nitrogenase with energy and protection from oxygen damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **86**: 259-264.
- Ruíz-Argüeso, T.; Hidalgo, E.; Murillo, J.; Rey, L. y Palacios, J.M. (1991)** Molecular genetics of the hydrogen uptake system of *Rhizobium leguminosarum*. En: *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe*

Interactions, Vol. 1. H. Hennecke y D.P.S. Verma (eds.), pp. 222-225.  
Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.

**Ryle, G.J.A.; Powell, C.E. y Gordon, A.J. (1978)** Effect of source of nitrogen on the growth of fiskey soybean: The carbon economy of whole plants. *Ann. Bot.* **42**: 637-648.

**Ryle, G.J.A.; Powell, C.E. y Gordon, A.J. (1981)** Assimilate partitioning in red and white clover either dependent on N<sub>2</sub> fixing in root nodules or utilizing nitrate nitrogen. *Ann. Bot.* **47**: 515-523.

**Saad, R. (1979)** Effect of atmospheric carbon dioxide levels on nitrogen uptake and metabolism in red kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.) under salt and water stress. Ph.D. Dissertation, Univ. Arizona, Univ. Microfilms. Ann Arbor, Mich.

**Sakakibara, H.; Watanabe, M.; Hase, T. y Sugiyama, T. (1991)** Molecular cloning and characterization of complementary DNA encoding for ferredoxin-dependent glutamate synthetase in maize leaf. *J. Biol. Chem.* **266**: 2028-2035.

**Sakamoto, A.; Takeba, G.; Shibata, D. y Tanaka, K. (1990)** Phytochrome-mediated activation of the gene for cytosolic glutamine synthetase genes (GS<sub>1</sub>) during inhibition of photosensitive lettuce seeds. *Plant Mol. Biol.* **15**: 317-323.

- Sánchez, F.; Campos, F.; Padilla, J.; Bonneville, J.-M.; Enriques, C. y Caput, D. (1987)** Purification, cDNA cloning and developmental expression of the nodule-specific uricase from *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* **84**: 1143-1147.
- Sayavedra-Soto, L.A.; Powell, G.K.; Evans, H.J. y Morris, R.O. (1988)** Nucleotide sequence of the genetic loci encoding subunits of *Bradyrhizobium japonicum* uptake hydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 8395-8399.
- Scheres, B.; van de Wield, C.; Zalensky, A.; Hirsch, A.; van Kammen, A. y Bisseling, T. (1989)** Identification of *Rhizobium leguminosarum* genes and signal compounds involved in the induction of early nodulin gene expression. En: *Signal Molecules in Plants and Plant-Microbe Interactions*. B.J.J. Lutenberg (ed.), pp. 367-377. Springer-Verlag, Berlín.
- Scheres, B.; van de Wield, C.; Zalensky, A.; Horvath, B.; Spaink, H.; van Eck, H.; Zwartkruis, F.; Wolters, A.M.; Gloudemans, T.; van Kammen, A. y Bisseling, T. (1990)** The ENOD13 gene product is involved in the infection process during the pea-*Rhizobium* interaction. *Cell* **60**: 281-294.
- Scholl, M.H. y Elkan, G.H. (1984)** *Rhizobium fredii* sp. nov., a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**: 484-486.
- Schrader, L.E. (1978)** *Nitrogen in the Environment*. D.R. Nielsen y J.G. McDonald (eds.), pp. 101-141. Academic Press, New York.

- Schubert, K.R. (1986)** Products of biological nitrogen fixation in higher plants: Synthesis, transport, and metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **37**: 539-574.
- Schubert, K.R. y Evans, H.J. (1976)** Hydrogen evolution: A major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**: 1207-1211.
- Schuster, C.; Schmidt, S. y Mohr, H. (1989)** Effect of nitrate, ammonium, light and plastidic factor on the appearance of multiple forms of nitrate reductase in mustard cotyledons. *Planta* **177**: 74-83.
- Seefeldt, L.C. y Arp, D.J. (1989a)** Cyanide inactivation of hydrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **171**: 3298-3303.
- Seefeldt, L.C. y Arp, D.J. (1989b)** Oxygen effects on the nickel- and iron-containing hydrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *Biochem.* **28**: 1588-1596.
- Seeman, J.R. y Critchley, C. (1985)** Effects of salt stress on the growth, ion content, stomatal behaviour and photosynthetic capacity of a salt-sensitive species, *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* **164**: 151-162.
- Seeman, J.R. y Sharkey, T.D. (1986)** Salinity and nitrogen effects on photosynthesis, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and metabolite pool size in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* **82**: 555-560.

- Sellstedt, A. y Huss-Danell, K. (1986)** Biomass production and nitrogen utilization by *Alnus incana* when grown on N<sub>2</sub> or NH made available at the same rate. *Planta* **167**: 387-394.
- Sellstedt, A.; Högberg, P. y Jonsson, K. (1989)** Diurnal variation in acetylene reduction and net hydrogen evolution in five tropical and subtropical nitrogen-fixing tree symbioses. *J. Exp. Bot.* **40**: 1163-1168.
- Sengupta-Gopalan, C.; Pitas, J.W.; Thompson, D.V. y Hoffman, L.M. (1986)** Expression of host genes during root nodule development in soybeans. *Mol. Gen. Genet.* **203**: 410-420.
- Sequeira, L. (1986)** Plant-bacterial interactions. En: *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. 17*. A. Pirson y M.H. Zimmermann (eds.), pp. 187-211. Springer-Verlag, Berlín.
- Serraj, R.; Dreven, J.J.; Obaton, M. y Vidal, A. (1992)** Variation in nitrate tolerance of nitrogen fixation in soybean (*Glycine max*) - *Bradyrhizobium* symbiosis. *J. Plant Physiol.* **140**: 366-371.
- Shannon, M.C. (1985)** Principles and strategies in breeding for higher salt tolerance. *Plant Soil.* **89**: 227-241.
- Sheehy, J.E.; Minchin, F.R. y Witty, J.F. (1985)** Control of nitrogen fixation in a legume nodule: An analysis of the role of oxygen diffusion in relation to nodule structure. *Ann. Bot.* **55**: 549-562.

- Shelp, B.J. y Atkins, C.A. (1984)** Subcellular locations of enzymes of ammonia assimilation and asparagine synthesis in root nodules of *Lupinus albus* L. Plant Sci. Lett. **36**: 225-230.
- Shelp, B.J.; Atkins, C.A.; Storer, P.J. y Canvin, D.J. (1983)** Cellular and subcellular organization of pathway of ammonia assimilation and ureide synthesis in nodules of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). Arch. Biochem. Biophys. **224**: 429-441.
- Shelp, B.J.; Sieciechowicz, K.I.; Ireland, R. y Joy, K.W. (1985)** Determination of urea and ammonia in leaf extracts: Application to ureide metabolism. Can. J. Bot. **63**: 1135-1140.
- Silberbush, M. y Lips, S.M. (1988)** Nitrogen concentration, ammonium/nitrate ratio and NaCl interaction in vegetative and reproductive growth of peanuts. Physiol. Plant. **74**: 493-498.
- Silberbush, M.; Golan-Goldhirsch, A. y Lips, S.H. (1988)** Responses of peanut (*Arachis hypogaea* L.) grown in saline nutrient solutions to potassium nitrate. J. Plant Physiol. **132**: 229-233.
- Simoniz, W. (1947)** CO<sub>2</sub> assimilation and stoff production trochen gezogener pflanzen. Planta, **35**: 188-214.
- Simoniz, W. (1952)** Untersuchungen zum Dürreeffect I. Morphologische structur, wasserchaushalt. Atmung und photosynthese feucht und trocken gezogener pflanzen. Planta **40**: 313-332.

- Simpson, F.B. y Burris, R.H. (1984)** A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. *Sci.* **224**: 1095-1097.
- Sing, M.P. y Abrol, Y.P. (1985)** Effect of soil sodicity on growth, yield and chemical composition of groundnut (*Archis hypogaea* L.). *Plant Soil* **84**: 123-127.
- Singh, R.P. y Srivastava, H.S. (1982)** Glutamate dehydrogenase activity and assimilation of inorganic nitrogen in maize seedling. *Biochem. Physiol. Pflanzen* **177**: 633-638.
- Singh, R.P. y Srivastava, H.H. (1986)** Increase in glutamate synthase (NADH) activity in maize seedlings in response to nitrate and ammonium nitrogen. *Physiol. Plant.* **66**: 413-416.
- Singh, T.N.; Aspinall, D.; Paleg, L.G. y Boggess, S.F. (1973)** Stress metabolism. II. Changes in proline concentration in excised plant tissues. *Aust. J. Biol. Sci.* **26**: 57-63.
- Sing, M.P.; Pandey, S.K.; Singh, P.C. y Singh, B.B. (1990)** Mustard physiology under stress I. Photosynthesis, transpiration, stomatal conductance and leaf chlorophyll content of *Brassica* genotypes grown under sodic conditions. *Photosynthetica* **24**.
- Singleton, P.W. (1983)** A split-root growth system for evaluating the effect of salinity on the components of the soybean *Rhizobium japonicum* symbiosis. *Crop. Sci.* **23**: 259-262.

**Singleton, P.W. y Bohlool, B.B. (1984)** Effect of salinity on nodule formation by soybean. *Plant Physiol.* **74**: 72-76.

**Slatyer, R.O. (1961)** Effects of several osmotic substrates on the water relationships of tomato. *Aust. J. Biol. Sci.* **14**: 519-540.

**Smirnoff, N. y Stewart, G.R. (1987)** Glutamine synthetase and ammonium assimilation in roots of zinc-tolerant and non-tolerant clones of *Deschampsia cespitosa* L. Beauv. and *Anthoxanthum odoratum* L. *New Phytol.* **107**: 659-670.

**Smith, F.W. y Thompson, J.F. (1971)** Regulation of nitrate reductase in excised barley roots. *Plant Physiol.* **48**: 219-233.

**Sneath, P.H.A. (1986)** Ed. *Bergey's Manual of Systematics Bacteriology*, Vol. **2**. Williams and Wilkins, Baltimore.

**Sodek, L. y Silva, W.J. (1977)** Glutamate synthase: A possible role in nitrogen metabolism of the developing maize endosperm. *Plant Physiol.* **60**: 602-605.

**Sprent, J.I. (1984)** Nitrogen fixation. En: *Advanced Plant Physiology*. M.B. Wilkins (Ed.), pp. 249-276. Pittman Publishing, London.

**Sprent, J.I. (1987)** *The Ecology of the Nitrogen Cycle*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 151 pp.

**Sprent, J.I. (1989)** Which steps are essential for the formation of functional legume nodules? *New Phytol.* **111**: 129-153.

**Sprent, J.I. y Sprent, P. (1990)** Nitrogen Fixing Organisms. Chapman and Hall, London, 256 pp.

**Sprent, J.I.; Sutherland, J.M. y Faria, S.M. (1987)** Some aspects of the biology of nitrogen-fixing organism. Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. **317**: 111-129.

**Sprent, J.I.; Sutherland, J.M. y Faria, S.M. (1989)** Structure and function of root nodules from woody legumes. En: Advances in Legume Biology, Vol. **29**. C.H. Stirton y J.L. Zarucchi (eds.), pp. 559-578. Monog. Syst. Bot., Missouri Bot. Gard., Missouri.

**Srivastava, H.S. y Singh, R.P. (1987)** Role and regulation of L-glutamate dehydrogenase activity in higher plants. Phytochem. **26**: 597-610.

**Staley, J.T. (1989)** Ed. Bergey's Manual of Systematics Bacteriology, Vol. **3**. Williams and Wilkins, Baltimore.

**Stam, H.; van Verseveld, H.W.; de Vries, W. y Stouthamer, A. (1984)** Hydrogen oxidation and efficiency of nitrogen fixation in succinate-limited chemostat cultures of *Rhizobium* ORS 571. Arch. Microbiol. **139**: 53-60.

**Stasiewicz, S. y Dunham, V.L. (1979)** Isolation and characterization of two forms of GS from soybean hypocotyls. Biochem. Biophys. Res. Comm. **87**: 627-634.

- Stephens, B.D. y Neyra, C.A., (1983)** Nitrate and nitrite reduction in relation to nitrogenase activity in soybean nodules and *Rhizobium japonicum* bacteroids. *Plant Physiol.* **71**: 731-735.
- Stewart, C.R. (1972)** The effect of wilting on proline metabolism in excised bean leaves in the dark. *Plant Physiol.* **51**: 508-511.
- Stewart, C.R. (1981)** Proline accumulation: Biochemical effects. En: *Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants*. L.G. Paleg y D. Aspinall (eds.), pp. 243-360. Academic Press, New York.
- Stewart, C.R. y Lee, J.A. (1979)** The rate of proline accumulation in halophytes. *Planta.* **120**: 279-289.
- Stewart, C.R.; Mann, A.F. y Fentem, P.A. (1980)** Enzymes of glutamate formation: Glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase. En: *The Biochemistry of Plants*, Vol. 5. B.J. Mifflin (ed), pp. 271-327. Academic Press, New York.
- Stewart, V. (1988)** Nitrate respiration in relation to facultative metabolism in enterobacteria. *Microbiol. Rev.* **52**: 190-232.
- Stewart, W.D.P. (1982)** Nitrogen fixation. Its current relevance and future potential. *Isr. J. Bot.* **31**: 5-44.
- Stone, J.R.; Copeland, L. y Kennedy, I.R. (1979)** Glutamate dehydrogenase of lupine nodules: Purification and properties of the enzyme. *Phytochem.* **18**: 1273-1278.

**Streeter, J.G. (1982)** Synthesis and accumulation of nitrite in soybean nodules supplied with nitrate. *Plant Physiol.* **69**: 1429-1434.

**Streeter J.G. (1985)** Nitrate inhibition of legume nodule growth and activity. I. Long term studies with a continuous supply of nitrate. *Plant Physiol.* **77**: 321-324.

**Streeter, J.G. (1988)** Inhibition of legume nodule formation and nitrogen-fixation by nitrate. *Crit. Rev. Plant Sci.* **7**: 1-23.

**Streit, L.; Martin, B.A. y Harper, J.E. (1987)** A method for the separation and partial purification of the three forms of nitrate reductase present in wild-types soybean leaves. *Plant Physiol.* **84**: 654-657.

**Strózycki, P.; Konieczny, A. y Legocki, A.B. (1985)** Identification and synthesis *in vitro* of plant-specific proteins in yellow lupin root nodules. *Acta Biochim. Polin.* **32**: 27-34.

**Stulen, I.; Lanting, L.; Lambers, H.; Posthumus, F.; von de Dijk, S.J. y Hofstra, R. (1981)** Nitrogen metabolism of *Plantago lanceolata* as dependent on the supply of mineral nutrients. *Physiol. Plant.* **51**: 93-98.

**Subba Rao, N.S. (1977)** Nitrogen deficiency as a world-wide problem. En: *A Treatise on Dinitrogen Fixation; Section IV: Agronomy and Ecology.* R.W.F. Hardy y A.H. Gibson (eds.), pp. 3-32. J. Wiley and Sons, New York.

- Subba Rao, N.S.; Lakshmi-Jumari, M.; Singh, C.S. y Magu, S.P. (1972)** Nodulation of lucerne (*Medicago sativa* L.) under the influence of sodium chloride. *Indian J. Agric. Sci.* **42**: 384-386.
- Suzuki, A. y Gadal, P. (1982)** Glutamate synthase from rice leaves. *Plant Physiol.* **69**: 848-852.
- Suzuki, A.; Gadal, P. y Oaks, A. (1981)** Intracellular distribution of enzymes associated with nitrogen assimilation in roots. *Planta* **151**: 457-461.
- Suzuki, A.; Vidal, J. y Gadal, P. (1982)** Glutamate synthase isoforms in rice. Immunological studies of enzymes in green leaf, etiolated leaf and root tissues. *Plant Physiol.* **70**: 827-832.
- Suzuki, A.; Vidal, J.; Nguyen, J. y Gadal, P. (1984)** Occurrence of ferredoxin-dependent glutamate synthase in plant cell fraction of soybean root nodules (*Glycine max*). *FEBS Lett.* **19**: 204-208.
- Suzuki, A.; Audet, C. y Oaks, A. (1987)** Influence of light on the ferredoxin-dependent glutamate synthase in maize leaves. *Plant Physiol.* **84**: 578-581.
- Tamura, G.; Oto, M.; Hirasawa, M. y Aketagawa, J. (1980)** Isolation and partial characterization of homogeneous glutamate synthase from *Spinacia oleracea*. *Plant Sci. Lett.* **19**: 209-215.
- Taubert, P. (1894)** *Leguminosae*. En: Die Natürlichen Pflanzenfamilien, Part. 3, sec. 3. A. Engler, A. y K. Prantl (eds.). Leipzig: Engelmann, 396 pp.

- Tempest, D.W.; Meers, J.L. y Brown, C.M. (1970)** Synthesis of glutamate in *Aerobacter aerogenes* by a hitherto unknown ruote. *Biochem. J.* **117**: 405-407.
- Tewari, T.N. y Singh, B.B. (1991)** Stress studies in lentil (*Lens esculenta* Moench). *Plant Soil*, **136**: 225-230.
- Thomas, H. (1978)** Enzymes of nitrogen mobilization in detached leaves of *Lolium temulentum* during senescence. *Planta* **142**: 161-169.
- Thorneley, J.H.M. (1972)** A balanced quantitative model for root: Shoot ratios in vegetative plants. *Ann. Bot.* **36**: 431-441.
- Thorneley, R.N.F. (1990)** Kinetics and mechanisms of ATP hydrolysis, electron transfers and proton release by *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase. 8th International Congress on Nitrogen Fixation, L-07. Knoxville, Tennessee.
- Thorneley, R.N.F. y Lowe, D.J. (1985)** Kinetics and mechanism of the nitrogenase enzyme system. En: *Molibdenum Enzymes*. T.G. Spiro (ed.), pp. 222-284. J. Wiley and Sons, New York.
- Thummler, F. y Verma, D.P.S. (1987)** Nodulin-100 of soybean is the subunit of sucrose synthase regulated by the availability of free haem in nodules J. *Biol. Chem.* **262**: 14730.
- Tingey, S.V.; Walker, E.L. y Coruzzi, G.M. (1987)** Glutamine synthetase genes of pea encode distinct polypeptides which are differentially expressed in leaves, roots and nodules. *EMBO J.* **6**: 1-9.

**Tirado, J.L.; Conejero, G. y Robin. P. (1990a)** Comparaison des activités glutamine synthétase et glutamate déshydrogénase dans la feuille de *Glycine max.* Distribution dans la plante et effet de l'ammonium et du nitrate. *Plant Physiol. Biochem.* **28**: 239-250.

**Tirado, J.L.; Conejero, G. y Robin. P. (1990b)** Comparaison des activités glutamine synthétase, glutamate déshydrogénase et nitrate réductase chez *Glycine max.* Effet de l'obscurité sur la première feuille trifoliée. *Plant Physiol. Biochem.* **28**: 251-257.

**Tjepkema, J.D. y Yocum, C.S. (1974)** Measurement of nitrogen partial pressure within soybean nodules by oxygen microelectrodes. *Planta* **119**: 351-360.

**Tobin, A.K.; Ridley, S.M. y Stewart G.R. (1985)** Changes in the activities of chloroplastic and cytosolic isoenzymes of glutamine synthetase during normal leaf growth and plastid development in wheat. *Planta* **163**: 544-548.

**Torres, B.C. y Bingham, F.E. (1973)** Salt tolerance of Mexican wheat. I: Effect of NO and NaCl on mineral nutrition, growth and grain production of four wheats. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* **37**: 711-715.

**Treeby, M.T. y van Steveninck, R.F.M. (1988a)** Effects of salinity and phosphate on ion distribution in lupin leaflets. *Physiol. Plant.* **73**: 317-322.

**Treeby, M.T. y van Steveninck, R.F.M. (1988b)** The influence of salinity on phosphate uptake and distribution in lupin roots. *Physiol. Plant.* **72**: 617-622.

- Treichel, S. (1975)** Der einfluß von NaCl auf die prolinekonzentration verschiedener halophyten. *Z. Pflanzenphysiol.* **76**: 56-68.
- Trivedi, S.; Galiba, G.; Sankhla, N. y Erdei, L. (1991)** Responses to osmotic and NaCl stress of wheat varieties differing in drought and salt tolerance in callus cultures. *Plant Sci.* **73**: 227-232.
- Truchet, G.; Roche, P.; Lerouge, P.; Vasse, J.; Camut, S.; de Billy, F.; Promé, J.-C. y Deénarié, J. (1991)** Sulphated lipooligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* in alfalfa. *Nature* **351**: 670-673.
- Udovenko, G.V.; Mashanskii, V.F. y Sinitskoya, I.A. (1970)** Changes of root cell ultrastructure under salinization in plants of different salt resistance. *Sov. Plant Physiol.* **17**: 813-818.
- Unnikrishnan, S.K.; Prakash, L.; Josekutty, P.C.; Bhatt, P.N. y Metha, A.R. (1991)** Effect of NaCl salinity on somatic embryo development in *Sapindus trifoliatus* L. *J. Exp. Bot.* **236**: 401-406.
- Valpuesta, V. y Cárdenas, J. (1992)** Asimilación de amonio por las plantas superiores. En: *Interacción Planta-Microorganismo: Biología del Nitrógeno*. J. González y C. Lluch (eds.), pp. 223-237. Rueda, Madrid.
- van de Wield, C.; Scheres, B.; Franssen, H.; van Lierop, M.J.; van Lammeren, A.; van Kammen, A. y Bisseling, T. (1990)** The early nodulin transcript ENOD2 is located in the nodule parenchyma (inner cortex) of pea and soybean root nodules. *EMBO J.* **9**: 1-7.

- van Kammen, A. (1984)** Suggested nomenclature for plant genes involved in nodulation and symbiosis. *Plant Mol. Biol. Rep.* **2**: 43-45.
- van Steveninck, M.E.; Stelzer, R. y Läuchi, A. (1982)** Studies on the distribution of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> in two species of lupin (*Lupinus luteus* and *Lupinus angustifolius*) differing in salt tolerance. *Physiol. Plant.* **56**: 465-473.
- Vance, C.P. y Johnson, L.E.B. (1983)** Plant determined ineffective nodules in alfalfa (*Medicago sativa* L.): Structural and biochemical comparisons. *Can. J. Bot.* **61**: 93-106.
- Vanoni, M.A.; Nuzzi, L.; Rescigno, M.; Zanetti, G. y Curti, B. (1991)** The kinetic mechanisms of the reactions catalyzed by the glutamate synthase from *Azospirillum brasilense*. *Eur. J. Biochem.* **202**: 181-189.
- Vanoni, M.A.; Edmondson, D.E.; Zanetti, G. y Curti, B. (1992)** Characterization of the flavins and the iron-sulfur centers of glutamate synthase from *Azospirillum brasilense* by absorption, circular dichroism, and electro paramagnetic resonance spectroscopies. *Biochem.* **31**: 4613-4623.
- Velagaleti, R.R. y Marsh, S. (1989)** Influence of host cultivars and *Bradyrhizobium* strains on the growth and symbiotic performance of soybean under salt stress. *Plant Soil* **119**: 133-138.
- Venekamp, J.H. y Koot, J.T.M (1988)** The sources of free proline and asparagine in field bean plants, *Vicia faba* L., during and after a short period of water withholding. *Plant Physiol.* **132**: 102-109.

- Verma, D.P.S.; Hu, A.-A. y Zhang, M. (1992)** Root nodule development: origin, function and regulation of nodulin genes. *Physiol. Plant.* **85**: 253-265.
- Vessey, J.K. y Patriquin, D.G. (1984)** *In situ* nitrogen fixation by white clover in mixed swards in Nova Scotia. *Can. J. Plant Sci.* **64**: 625-636.
- Viands, D.R.; Barnes, D.K. y Heichel, G.H. (1981)** Nitrogen fixation in alfalfa. USDA Tech. Bull. No. **1643**.
- Vincent, J.M. (1970)** A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria. Blackwell, Oxford, 164 pp.
- Vincent, J.M. (1977)** *Rhizobium*: General Microbiology. En: A Treatise on Dinitrogen Fixation, Section **III**. R.W.F. Hardy y W.S. Silver (eds.), pp. 277-366. J. Wiley and Sons, New York.
- Vincent, J.M. (1980)**. En: A Manual for the Practical Study of the Root Nodule Bacteria. Internacional Biological Programme Handbook 15. Blackwell, Oxford.
- Vogel, H.J. y Bonner, D.M. (1954)** On the glutamine-proline-ornithine interrelation in *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **40**: 688-694.
- Wahab, A.M.A. y Zahran, H.H. (1981)** Effects of salt stress on nitrogenase activity and growth of four legumes. *Biol. Plant.* **23**: 16-23.

- Walker, E.L. y Coruzzi, G.M. (1989)** Developmentally regulated expression of the gene family for cytosolic glutamine synthetase in *Pisum sativum*. *Plant Physiol.* **91**: 702-708.
- Wallace, W. (1986)** Distribution of nitrate assimilation between the root and shoot of legumes and a comparison with wheat. *Physiol. Plant.* **66**: 630-636.
- Wallsgrave, R.M.; Lea, P.J. y Miflin, B.J. (1979)** Distribution of enzymes of nitrogen assimilation within the pea leaf cell. *Plant Physiol.* **63**: 232-236.
- Wallsgrave, R.M.; Lea, P.J. y Miflin, B.J. (1982)** The development of NAD(P)H-dependent and ferredoxin-dependent glutamate synthase in greening barley and pea leaves. *Planta* **154**: 473-476.
- Wallsgrave, R.M.; Lea, P.J.; Keys, A.J. y Miflin, B.J. (1983)** Photosynthesis, photorespiration and nitrogen metabolism. *Plant Cell Environ.* **6**: 301-309.
- Wallsgrave, R.M.; Turner, J.C.; Hall, N.P.; Kendall, A.C. y Bright, S.W.J. (1987)** Barley mutants lacking chloroplast glutamine synthetase - biochemical and genetic analysis. *Plant Physiol.* **83**: 155-158.
- Wang, C.Y.; Cheng, S.H. y Kao, C.H. (1982)** Senescence of rice leaves VII. Proline accumulation in senescing excised leaves. *Plant Physiol.* **69**: 1348-1349.
- Ward, M.R.; Grimes, H.D. y Huffaker, R.C. (1989)** Latent nitrate reductase activity is associated with the plasma membrane of corn root. *Planta* **177**: 470-475.

- Watson, L. (1981)** An automated system of generic descriptions for *Cesalpinoideae*, and its application to classification and key making. En: *Advances in Legume Systematics*. R.M. Polhill y P.H. Raven, (eds.), pp. 65-80. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Weaver, C.D.; Crombie, B.; Stacey, G. y Roberts, D.M. (1991)** Calcium-dependent phosphorylation of symbiosome membrane protein from nitrogen-fixing soybean nodules. *Plant Physiol.* **95**: 222-227.
- Weber, M.; Schmidt, S.; Schuster, C. y Mohr, H. (1990)** Factor involved in the coordinate appearance of nitrite reductase and glutamine synthetase in the mustard (*Sinapis alba* L.) seedling. *Planta* **180**: 429-434.
- Weil, R.R. y Khalil, N.A. (1986)** Salinity tolerance of winged beans as compared to that of soybean. *Agron. J.* **78**: 67-70.
- Weissman, G.S. (1972)** Influence of ammonium and nitrate nutrition on enzymatic activity in soybean and sunflower. *Plant Physiol.* **57**: 923-930.
- Wery, J. (1986)** Relationship between growth, nitrogen fixation and assimilation in a legume (*Medicago sativa* L.). *Plant Soil* **96**: 17-29.
- Wignarajah, K. (1990)** Growth response of *Phaseolus vulgaris* to varying salinity regimes. *Env. Exp. Bot.* **2**: 141-147.
- Wilson, J.R. (1970)** Response to salinity in *Glycine*. VI. Some effect of a range of short-term salt stresses on growth, nodulation and nitrogen fixation of *Glycine wightii*. *Austr. J. Agric. Res.* **21**: 571-582.

**Wilson, J.R. (1985)** Comparative response to salinity of the growth and nodulation of *Macropodium atropurpureum* cultivar Siratro and *Neonotonia wightii* cultivar cooper seedlings. Aust. J. Agric. Res. **36**: 589-600.

**Wilson, C.; Clark, R.A. y Nieman, R.H. (1992)** Effects of salinity, diurnal cycle and age on nucleotide pools of bean leaves. J. Exp. Bot. **43**: 1009-1014.

**Williams, S.T. (1989)** En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. **4**. J. Williams and Wilkins, Baltimore.

**Witty, J.F.; Minchin, F.R.; Shøt, L. y Sheehy, J.E. (1986)** Nitrogen fixation and oxygen in legume root nodules. Oxford Surveys of Plant Cel. Biol. **3**: 275-315.

**Woese, C.R. (1987)** Bacterial evolution. Microbiol. Rev. **51**: 221-271.

**Wolk, C.P.; Thomas, J.; Shaffer, P.W.; Austin, S.M. y Galonsky, A. (1976)** Pathway of nitrogen metabolism after fixation of <sup>13</sup>N-labelled nitrogen gas by the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. J. Biol. Chem. **251**: 5027-5034.

**World Resources (1987)** An assessment of the resource base and the supports for the global economy. International Institute for Environment and Development, World Resources Institute. Basic Books, New York.

- Wyn Jones, R.G; Storey, R.; Laigh, R.A.; Ahmad, N. y Pollard, A. (1977)** A hypothesis on cytoplasmic osmoregulation. En: Regulation of Cell Membrane Activities in Plants. E. Marre y O. Ceifferri (Eds.). North Holland Pub. Co. Amsterdam.
- Yamaya, T. y Oaks, A. (1987)** Synthesis of glutamate by mitochondria, an anaplerotic function for glutamate dehydrogenase. *Physiol. Plant.* **70**: 749-756.
- Yamaya, T. y Oaks, A. (1988)** Distribution of two isoforms of glutamine synthetase in bundle sheath and mesophyll cells of corn leaves. *Physiol. Plant.* **72**: 23-28.
- Yamaya, T.; Oaks, A. y Matsumoto, H. (1984)** Characteristics of glutamate dehydrogenase in mitochondria prepared from corn shoots. *Plant Physiol.* **76**: 1009-1013.
- Yamaya, T.; Oaks, A.; Rhodes, D. y Matsumoto, H. (1986)** Synthesis of <sup>15</sup>N glutamate from <sup>15</sup>N H and <sup>15</sup>N glycine by mitochondria isolated from pea and corn shoots. *Plant Physiol.* **81**: 754-757.
- Yancey, P.H.; Clark, M.E.; Hand, S.C.; Bowlus, R.D: y Somero, G. (1982)** Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Sci.* **217**: 1214-1222.
- Yates, M.G. (1992)** The enzymology of molybdenum-dependent nitrogen fixation. En: Biological Nitrogen Fixation. G. Stacey, H.J. Evans y R.H. Burris (eds.), pp. 685-735. Chapman and Hall, New York.

- Yelton, M.M. y Yoch, D.C. (1981)** Nitrogen metabolism in *Rhodospirillum rubrum*: Characterization of glutamate synthase. *J. Gen. Microbiol.* **123**: 335-342.
- Yelton, M.M.; Yang, S.S.; Edie, S.A. y Lim, S.T. (1983)** Characterization of an effective salt-tolerant, fast-growing strain of *Rhizobium japonicum*. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 1537-1547.
- Yeh, G.C. y Phang, J.M. (1988)** Stimulation of phosphoribosyl pyrophosphate and purine nucleotide production by pyroline-5'-carboxylate in human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **263**: 13083-13089.
- Yeo, A.R. y Fowers, T.J. (1984)** Mechanisms of salinity resistance in rice and their role as physiological criteria in plant breeding. En: *Plant-Strategies for Crop Improvement*. R.C. Staples y G.H. Toennisessen (eds.), pp. 151-170. J. Wiley and Sons, New York.
- Young, J.P.W. (1992)** Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. En: *Biological Nitrogen Fixation*. G. Stacey, H.J. Evans y R.H. Burris (eds.), pp. 43-86. Chapman and Hall, New York.
- Yousef, A.N. y Sprent, J.I. (1983)** Effect of NaCl on growth, nitrogen incorporation and chemical composition of inoculated and  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  fertilized *Vicia faba* L. plants. *J. Exp. Bot.* **143**: 941-950.

**Zaat, S.A.J.; van Brussel, A.A.N.; Tak, T.; Lugtenberg, B.J.J. y Kijne, J.W. (1989)** The ethylene-inhibitor aminoethoxyvinylglycine restores normal nodulation by *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* on *Vicia sativa* subsp. *nigra* by suppressing the thick and short roots phenotype. *Planta* **177**: 141-150.

**Zahran, H.H. y Sprent, J.I. (1986)** Effects of sodium chloride and polyethylene glycol on root-hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. plants by *Rhizobium leguminosarum*. *Planta*, **167**: 303-309.

**Zhu, Y.; Shearer, G. y Kohl, D.H. (1992)** Proline fed to intact soybean plants influences acetylene reducing activity and content and metabolism of proline in bacteroids. *Plant Physiol.* **98**: 1020-1028.

**Zoglauer, K.; Dembny, H. y Göring, H. (1987)** Inhibition of IAA-induced ethylene production and proline accumulation in wheat coleptiles by fusaric acid. *Biochem. Physiol. Pflanzen* **182**: 23-29.