



**Universidad Nacional de La Pampa**  
**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

Efecto del Azufre, Boro, Fósforo y Zinc sobre la fijación biológica de nitrógeno en la simbiosis *Medicago sativa* – *Sinorhizobium meliloti*, en condiciones controladas.

**Trabajo presentado por**

**Carlos Abel Glusko**

**para obtener el grado académico**

**de**

**Licenciado en Química**

**Director:** Dra. Alicia E. Grassano

**CoDirector:** MSc. Maria S. Boeris

## **Evaluadores**

Lic. Dr: José M. Camiña

Ing. Agro.: María Pereyra Cardoso

## *Agradecimientos*

*Quiero agradecer a la Universidad Nacional de La Pampa - Fac. de Cs. Ex. y Nat. – Dpto. de Química por financiar la pasantía en la Universidad de la República, Uruguay, donde me entrene sobre las técnicas enzimáticas implementadas y financiar los materiales. Además, a todo el personal docente y no docente por la excelente predisposición en todo momento del desarrollo del trabajo y mi carrera.*

*A mis compañeros que en todo momento me alentaron y vieron crecer en los años transcurridos.*

*A la MSc. Susana Boeris por su buena predisposición para corregir y aportar en el desarrollo estadístico junto a la Lic. Valeria Lozano.*

*A la Dra. Mónica Bellozas por la invaluable colaboración en los arduos días de trabajo de laboratorio.*

*A la Dra. Alicia Grassano por su excelente predisposición en aportes humanos y materiales que estuvieran a su alcance. Por la exhaustiva y criteriosa corrección del texto. Sin dejar de resaltar el énfasis puesto en el desarrollo y realce de los aspectos humanos del futuro profesional.*

*Por último, pero no menos importante, a mi familia por su apoyo constante y especialmente a mi compañera de vida Eugenia por su estímulo y paciencia durante los años transcurridos.*

***Se la dedico a un carpintero que trabajo en la provincia de La Pampa en condiciones insalubres materiales y afectivas pero de una amplia visión temporal que lo llevo ha estimular el desarrollo humano y académico de sus hijos; mi padre.***

## Resumen

### Efecto del azufre, boro, fósforo y zinc sobre la fijación biológica de nitrógeno en la simbiosis *Medicago sativa* – *Sinorhizobium meliloti*, en condiciones controladas

Glusko Carlos Abel

**Introducción:** La mayor demanda de alimentos por una población en desarrollo ha llevado a prácticas agrícolas que aumentan el rendimiento pero han convertido a la agricultura en una práctica no sustentable cuando son desmedidas. Las leguminosas aportan proteína y aceite en forma directa o indirecta a la población sin necesidad de una fertilización nitrogenada. Las leguminosas son plantas con la capacidad de realizar fijación biológica del nitrógeno (FBN) al establecer simbiosis con microorganismos denominados rizobios desarrollando estructuras denominadas nódulos, donde el nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) se reduce a amonio ( $NH_4^+$ ) y se incorpora a estructuras carbonadas mediante el ciclo enzimático glutamina sintetasa (GS)–glutamato sintasa (GOGAT) generando glutamina y asparagina, compuestos que transportan nitrógeno reducido a tejidos de la planta en desarrollo. En el desarrollo de la FBN intervienen factores varios entre los que se encuentran los macro y micronutrientes como azufre (S), boro (B), fósforo (P) y zinc (Zn). El fósforo participa en moléculas como ADN, ARN y ATP. El azufre forma parte de aminoácidos proteicos y compuestos que participan en los mecanismos de defensa de la planta. El boro tiene la funcionalidad de estabilizar membranas como la del simbiote. Mientras que el zinc participa en la fotosíntesis, metabolismo de las proteínas – carbohidratos y en mecanismo defensivos de radicales libres de oxígeno. **Objetivo:** El objetivo de esta tesis es establecer las relaciones existentes entre S, P, B y Zn para la cual se logra la mayor respuesta en la simbiosis *S. meliloti*-*M. sativa*. Las cuales serán evaluadas mediante la cuantificación de la expresión de las enzimas GS-GOGAT. **Materiales y métodos:** Las semillas de alfalfa (*M. sativa*) estériles se germinaron y las plántulas se cultivaron en hidroponía controlando los nutrientes S, B, P y Zn de acuerdo a un desarrollo factorial de cuatro factores y dos niveles, P+/- y S +/- (45 – 17 ppm) – B+/- (179 ppb – no adición) – Zn+/- (179 ppb – no adición), resultado 16 ensayos. La inoculación se realizó con *S. meliloti* B399. Las plantas se cultivaron en cámara controlando temperatura y fotoperiodo por 45 días, para luego recolectar la materia nodular y parte aérea sobre la que se determinó actividad GS-GOGAT y materia seca respectivamente. Los datos de actividad específica se analizaron estadísticamente. **Resultados:** Para GOGAT se obtuvo como efecto principal  $0.789125 \pm 0,6392$  para B y dobles  $1.205125 \pm 0,6392$  para B–S,  $1.929125 \pm 0,6392$  S–P. Para GS se obtuvo como efecto principal  $0.173 \pm 0.122$  para S y  $0.206 \pm 0.122$  para P, dobles  $0.173 \pm 0.122$  para Zn–S,  $0.176 \pm 0.122$  para B–S y  $0.171 \pm 0.122$  para S–P. **Discusión:** Del análisis estadístico factorial puede inferirse que existe una interacción entre los nutrientes analizados. La actividad GOGAT es mayor con presencia de B y en las interacciones B–S y S–P. Para GS se encuentra mayor actividad a altas concentraciones de S y P, y en las interacciones entre Zn–S, B–S y S–P. La concentración y relación de macro y micronutrientes evaluados afectan al ciclo GS-GOGAT en la simbiosis *M. sativa* – *S. meliloti* y por tanto a la fijación biológica de nitrógeno. **Conclusión:** Se confirma la hipótesis de interrelaciones entre los nutrientes evaluados a distintos niveles sobre la FBN mediante el ciclo GS-GOGAT.

# INDICE

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 1       | Introducción  | 9  |
| 1.1     | Leguminosas: Historia y su aporte alimentario       | 9  |
| 1.2     | Mineralogía de las plantas                          | 12 |
| 1.3     | Nitrógeno   | 14 |
| 1.3.1   | Dinámica del nitrógeno en el ambiente               | 14 |
| 1.3.2   | Asimilación del nitrógeno en las plantas            | 16 |
| 1.3.3   | Fijación biológica del nitrógeno                    | 17 |
| 1.3.3.1 | Simbiosis <i>M. sativa-S. meliloti</i>              | 17 |
| 1.3.3.2 | Nodulación  | 19 |
| 1.3.3.3 | Procesos enzimáticos                                | 24 |
| 1.4     | Fósforo   | 29 |
| 1.4.1   | Disponibilidad del fósforo del suelo                | 29 |
| 1.4.2   | Asimilación y funcionalidad metabólica del fósforo  | 29 |
| 1.5     | Azufre  | 31 |
| 1.5.1   | Asimilación del azufre en plantas                   | 31 |
| 1.5.2   | Funcionalidad metabólica del azufre                 | 32 |
| 1.5.3   | Síntesis y regulación del glutatión                 | 35 |
| 1.5.4   | Funcionalidad metabólica del azufre en la simbiosis | 37 |
| 1.6     | Boro  | 38 |
| 1.6.1   | Boro en el suelo y su metabolismo en la planta      | 38 |
| 1.7     | Zinc  | 40 |
| 1.7.1   | El zinc en el suelo y su absorción por la planta    | 40 |
| 1.7.2   | Funcionalidad metabólica del Zn en la planta        | 41 |
| 1.7.2.1 | Metabolismo de los carbohidratos                    | 41 |

|     |  |    |
|-----|--|----|
|     | 1.7.2.2 Metabolismo de las proteínas   | 42 |
|     | 1.7.2.3 Integridad de la membrana  | 42 |
|     | 1.7.2.4 Metabolismo de las hormonas  | 43 |
|     | 1.7.2.5 El zinc en la simbiosis rizobio – leguminosa   | 43 |
| 1.8 | Deficiencias en los suelos   | 43 |
| 2   | Objetivos  | 45 |
| 3   | Materiales y Métodos   | 46 |
|     | 3.1 Desarrollo y cultivos de las plantas   | 46 |
|     | 3.1.1 Esterilización y germinación de las semillas   | 46 |
|     | 3.1.2 Desarrollo del inóculo   | 46 |
|     | 3.1.3 Desarrollo del medio de cultivo para hidroponia controlando la concentración de S, B, P y Zn | 47 |
|     | 3.1.4 Diseño experimental  | 48 |
|     | 3.1.5 Cultivos de las plántulas y recolección  | 49 |
|     | 3.2 Determinación de actividad enzimática GOGAT – GS y proteína soluble                            | 50 |
|     | 3.2.1 Preparación del extracto enzimático  | 50 |
|     | 3.2.2 Determinación de proteína soluble  | 51 |
|     | 3.2.3 Determinación de la actividad GOGAT y GS nodular   | 51 |
|     | 3.2.3 Determinación de la actividad GS nodular   | 52 |
|     | 3.3 Determinación de materia seca  | 53 |
|     | 3.4 Análisis estadístico   | 53 |
| 4   | Resultados   |    |
|     | 4.1 Características cualitativas del ensayo  | 54 |
|     | 4.2 Resultados de proteína soluble   | 62 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 4.3   | Resultados de la actividad GOGAT           | 63 |
| 4.3.1 | Análisis estadístico de la actividad GOGAT | 65 |
| 4.4   | Resultados de la actividad GS              | 67 |
| 4.4.1 | Análisis estadístico de la actividad GOGAT | 68 |
| 4.5   | Resultados de peso seco en parte aérea     | 71 |
| 5     | Discusión                                  | 73 |
| 6     | Conclusiones                               | 74 |
| 7     | Bibliografía                               | 75 |



# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Leguminosas: historia y su aporte alimentario

Las leguminosas son generalmente definidas como plantas con una inusual estructura floral, fruta recubierta de una vaina y cerca del 88% de las especies examinadas forman nódulos con rizobios (de Farias, 1989; citado por Vance and Graham, 2003). Estas siguen a las gramíneas en orden de importancia para el humano. Se compone de 750 géneros con 18.000 a 19.000 especies (Polhill et al., 1981; citado por Vance, 2003) incluyendo leguminosas de grano, forrajeras y agroforestales. Se ha reportado que la domesticación de la lentejas (*Lens esculenta*) se remonta a los actuales territorios de Irak (mesopotamia del oriente medio) entre 8 – 9.000 años AC (Cohen, 1977; citado por Vance, 2003). Roosevelt et al., 1996 (citado por Vance and Graham, 2003) reportaron el uso de *Hymenaea* como alimento en el amazona prehistórica. La haba (*Phaseolus vulgaris*) y soja (*Glycine max*) fueron domesticadas en América y Asia respectivamente 3.000 años atrás (Hymowitz and Singh, 1987; Kaplan and Lynch, 1999; citado por Vance and Graham, 2003). El uso de las leguminosas de pastura como mejoradoras de la calidad de los suelos se remonta a los romanos surgiendo una frase muy significativa “*Las leguminosas pueden ser plantadas en suelos pobres no solo para producción si no para mejorar producciones posteriores*” (Fred et al., 1932; citado por Vance and Graham, 2003).

El nitrógeno necesario para mantener la salud del ser humano es aportado directa o indirectamente por el reino vegetal, especialmente de las plantas superiores. Desde 1960 al 2000 la población del mundo se ha duplicado, cercana a los 6.000 millones de personas, proyectándose un crecimiento y estabilización para los siguientes 40 años en los en 8-9.000 millones de personas (Vance C P, 2001).

Las leguminosas de granos y forrajeras utilizan 180 millones de Ha, cerca del 12 – 15 % de la superficie arable de la tierra como puede verse en el tabla 1. Estas contribuyen a la producción primaria mundial en un 27%, siendo las leguminosas de granos fuente del 33% del nitrógeno proteico de la dieta del

ser humano (Vance et al., 2000; citado por Vance, 2003). Bajo condiciones de subsistencia, el nitrógeno proteico puede ser la principal fuente de este nutriente en la dieta. Las leguminosas, donde se destacan la soja y maní, aportan cerca del 35% de aceite vegetal producido mundialmente siendo estas leguminosas fuente de proteína para la para la cría industrial de pollo y cerdo. El potencial de las leguminosas se ve reflejado en la espectacular producción de soja desarrollada en Brasil (Vance and Graham, 2003).

El menor aumento en rendimiento de las leguminosas respecto de los cereales se debe, en parte, a los suelos pobres en que se producen y al desfasaje temporal debido a que son sembradas después del cultivo de cereales sobre el fin de temporada, exponiendo a este cultivo a sequías y corto periodo de cultivo. A esto se le debe sumar la progresiva degradación física y química de los suelos (Vance and Graham, 2003).

**Tabla 1. Producción y superficie utilizada por diferentes cultivos.**

| <b>Cultivo</b>                              | <b>Producción</b>    | <b>Área cultivada</b> |
|---|----------------------|-----------------------|
|   | TM x 10 <sup>6</sup> | ha x 10 <sup>6</sup>  |
| Leguminosas de grano                        | 275                  | 160                   |
| Leguminosas forrajeras                      | 605                  | 20                    |
|   | 583                  | 214                   |
| Arroz ( <i>Oryza sativa</i> )               | 590                  | 152                   |
| Maíz ( <i>Zea mays</i> )                    | 609                  | 138                   |
| Cebada ( <i>Horseum vulgare</i> )           | 141                  | 54                    |
| Papa ( <i>Solanum tuberosum</i> )           | 308                  | 19                    |
| Mandioca ( <i>Manihot esculeta</i> Crantz.) | 179                  | 20                    |
| <b>Total</b>                                | <b>3,32</b>          | <b>777</b>            |

**Fuente: Vance, 2003.**

La expansión proyectada de los suelos con estrés hídrico lleva a plantear la problemática de la tolerancia a este factor para las leguminosas. La remediación del estrés hídrico con irrigación antrópica lleva a la salinización de los suelos, por lo que debe plantearse tolerancia también a este factor, ya que este también está distribuido ampliamente de forma natural en muchos suelos del mundo, por lo que el desarrollo de tolerancia o adaptación a este tipo de suelos permitiría aprovecharlos (Vance and Graham, 2003).

La disminución de nutrientes en los suelos es un factor de reducción de los niveles de producción a nivel mundial que puede revertirse con el uso de

fertilizantes. Sin embargo granjeros de países periféricos, como muchos de Argentina, no disponen de una renta que le permitan alcanzar esta práctica. Además el uso indiscriminado de fertilizantes lleva a polución ambiental haciendo la agricultura una práctica no sustentable. La acidificación de los suelos como causa de la lluvia ácida (principalmente en países desarrollados), uso intensivo de fertilizantes nitrogenados y la acidez de mantos de agua naturales, reduce la producción de leguminosas (Graham and Vance, 2000; Vance and Graham, 2003). La acidez aumentada del suelo lleva a toxicidad de elementos como aluminio (Al) y manganeso (Mn), y deficiencias en fósforo (P), molibdeno (Mo) y calcio (Ca). La nodulación y fijación biológica del nitrógeno es severamente afectada por la baja disponibilidad de fósforo y acidez del suelo.

El uso de leguminosas en la dieta humana suele ser problemática. Estas contienen cerca de un 20 % de proteínas ricas en lisina (Lys), siendo complementarias de los cereales y tubérculos. Sin embargo son deficientes en aminoácidos azufrados, contiene factores antinutricionales, factores causantes de flatulencias y generalmente duras para cocinar. Las leguminosas forrajeras se usan básicamente para la producción de carne y leche, siendo una buena fuente de proteínas, fibra y energía. En climas templados la alfalfa es la leguminosa forrajera mas utilizada aunque también se usan trébol y lotus, entre otras (Vance and Graham, 2003).

Aunque en 1960 se predecía que la velocidad de aumento en la producción de alimentos no alcanzaría a abastecer la población según el ritmo de crecimiento, el mejoramiento del germoplasma, uso indiscriminado de fertilizantes y la aplicación de irrigación, permitió el abastecimiento de alimentos. El uso indiscriminado de fertilizantes y consecuente contaminación de los mantos de agua dulce, tanto superficiales como subterráneos, ha generado un deterioro del ambiente llevando a la agricultura a convertirse en una practica no sustentable (Vance C P, 2001).

## 1.2 MINERALOGIA DE LAS PLANTAS

Las plantas en desarrollo incorporan elementos del ambiente que se pueden clasificar, de acuerdo a su abundancia en la biomasa, en macro y micronutrientes. Entre los macronutrientes se encuentran el Carbono, Oxígeno, Hidrógeno que se obtienen del agua o dióxido de carbono y el Nitrógeno, Fósforo, Azufre, Potasio, Magnesio, Calcio y Silicio que los provee el suelo. Entre los micronutrientes se encuentran el Cloro, Hierro, Boro, Manganeso, Sodio, Zinc, Cobre, Níquel y Molibdeno, que la planta toma del suelo (Azcón-Bieto y Talón; 2000). Las características fisicoquímicas y presencia relativa de cada elemento respecto del Molibdeno (Mo) se muestra en tabla 2. Mientras que la función fisiológica se resume en el tabla 3 (Taiz and Zeiger, 2002).

**Tabla 2. Abundancia mineral en las plantas.**

| Elementos  | Símbolo | Masa Atómica | Conc. en Materia Seca        |          | Nº At / Mo         |
|--|---------|--------------|------------------------------|----------|--------------------|
|  |         |              | % Macronut. Ppm<br>Micronut. | µmol / g |                    |
| <b>Obtenidos del agua y dióxido de carbono</b>                 |         |              |                              |          |                    |
| Hidrogeno  | H       | 1.01         | 6 %                          | 60.000   | 60x10 <sup>6</sup> |
| Carbono  | C       | 12.01        | 45                           | 40.000   | 40x10 <sup>6</sup> |
| Oxigeno  | O       | 16.00        | 45                           | 30.000   | 30x10 <sup>6</sup> |
| <b>Obtenidos del suelo</b>                                     |         |              |                              |          |                    |
| <b>Macronutrientes entre los que se encuentran en H, C, O.</b> |         |              |                              |          |                    |
| Nitrógeno  | N       | 14.01        | 1.5                          | 1000     | 1.000.000          |
| Potasio  | K       | 39.01        | 1.0                          | 250      | 250.000            |
| Calcio   | Ca      | 40.08        | 0.5                          | 125      | 125.000            |
| Magnesio   | Mg      | 24.32        | 0.2                          | 80       | 80.000             |
| Fósforo  | P       | 30.98        | 0.2                          | 60       | 60.000             |
| Azufre   | S       | 32.07        | 0.1                          | 30       | 30.000             |
| Silicio  | Si      | 28.09        | 0.1                          | 30       | 30.000             |
| <b>Micronutrientes</b>   |         |              |                              |          |                    |

|           |    |       |         |       |      |
|-----------|----|-------|---------|-------|------|
| Cloro     | Cl | 35.46 | 100 ppm | 3.0   | 3000 |
| Hierro    | Fe | 55.85 | 100     | 2.0   | 2000 |
| Boro      | B  | 10.82 | 20      | 2.0   | 2000 |
| Manganeso | Mn | 54.94 | 50      | 1.0   | 1000 |
| Sodio     | Na | 22.91 | 10      | 0.40  | 400  |
| Zinc      | Zn | 65.38 | 20      | 0.30  | 300  |
| Cobre     | Cu | 63.54 | 6       | 0.10  | 100  |
| Nikel     | Ni | 58.69 | 0.1     | 0.002 | 2    |
| Molibdeno | Mo | 95.95 | 0.1     | 0.001 | 1    |

Fuente: Taiz and Zeiger, 2002, 104.

**Tabla 3. Función de los minerales en las plantas.**

| Elemento       | Función   |
|----------------|---|
| <b>Grupo 1</b> | <b>Elem. que forman parte de los compuestos orgánicos</b>   |
| <b>N</b>       | Constituyente de aminoácidos, amidas, proteínas, ácidos nucleicos, coenzimas, hexoaminas, etc.  |
| <b>S</b>       | Constituyente de aminoácidos como cisteína, cistina y metionina, proteínas, ácido lipóico, coenzima A, pirofosfato de tiamina, glutatión, biotina, adenosina -5'-fosfosulfato y 3-fosfoadenosina. |
| <b>Grupo 2</b> | <b>Elem. que participan en el almacenamiento de energía y de la integridad estructural</b>  |
| <b>P</b>       | Componente de azúcares fosfato, ácidos nucleicos, nucleótidos, coenzimas, fosfolípidos, ácido fítico etc. Rol importante en las reacciones que participa el ATP.                                  |
| <b>B</b>       | Forma complejos con manitol, manano, ácido poliaminourónico y otros constituyentes de la pared celular. Interviene en la elongación celular y el metabolismo del ADN.                             |
| Si             | Forma depósitos amorfos que contribuyen a las propiedades mecánicas de la pared celular incluyendo rigidez y elasticidad.   |
| <b>Grupo 3</b> | <b>Nutrientes que permanecen en forma iónica</b>  |
| K              | Actúa como cofactor en más de 40 enzimas. Principal catión en mantener la electroneutralidad.   |
| Na             | Participa en la regeneración de fosfoenolpiruvato en plantas C4 y CAM. Puede ser sustituido por potasio en algunas funciones.   |
| Mg             | Requerido por muchas enzimas de la transferencia de fosfatos. Constituyente de la clorofila.  |

|                |   |
|----------------|---|
| Ca             | Constituyente de la lamina media de la pared celular. Cofactor de algunas enzimas que hidrolizan ATP y fosfolípidos. Segundo mensajero en regulaciones metabólicas.       |
| Mn             | Participa en las enzimas como deshidrogenadas, descarboxilasas, kinasas, oxidasas y peroxidasas. Participa en activación de enzimas y en la evolución de la fotosíntesis. |
| Cl             | Participa en la fotosíntesis y evolución del O <sub>2</sub>   |
| <b>Grupo 4</b> | <b>Nutrientes que participan en la transferencia de electrones</b>  |
| Fe             | Constituyente de citocromos y proteínas no hémicas participantes de la fotosíntesis, fijación de N <sub>2</sub> y respiración.  |
| Cu             | Constituyente de ascórbico oxidasa, tirosinasa, monoaminoxidasa.  |
| <b>Zn</b>      | Constituyente de alcohol y glutámico deshidrogenasa, anhidrasa carbónica  |
| Mo             | Constituyente de la nitrogenasa, nitrato reductasa y xantin deshidrogenasa.   |
| Ni             | Constituyente de la ureasa, hidrogenasas en bacterias de la fijación de nitrógeno.  |

Fuente: Taiz and Zeiger, 2002, 104.

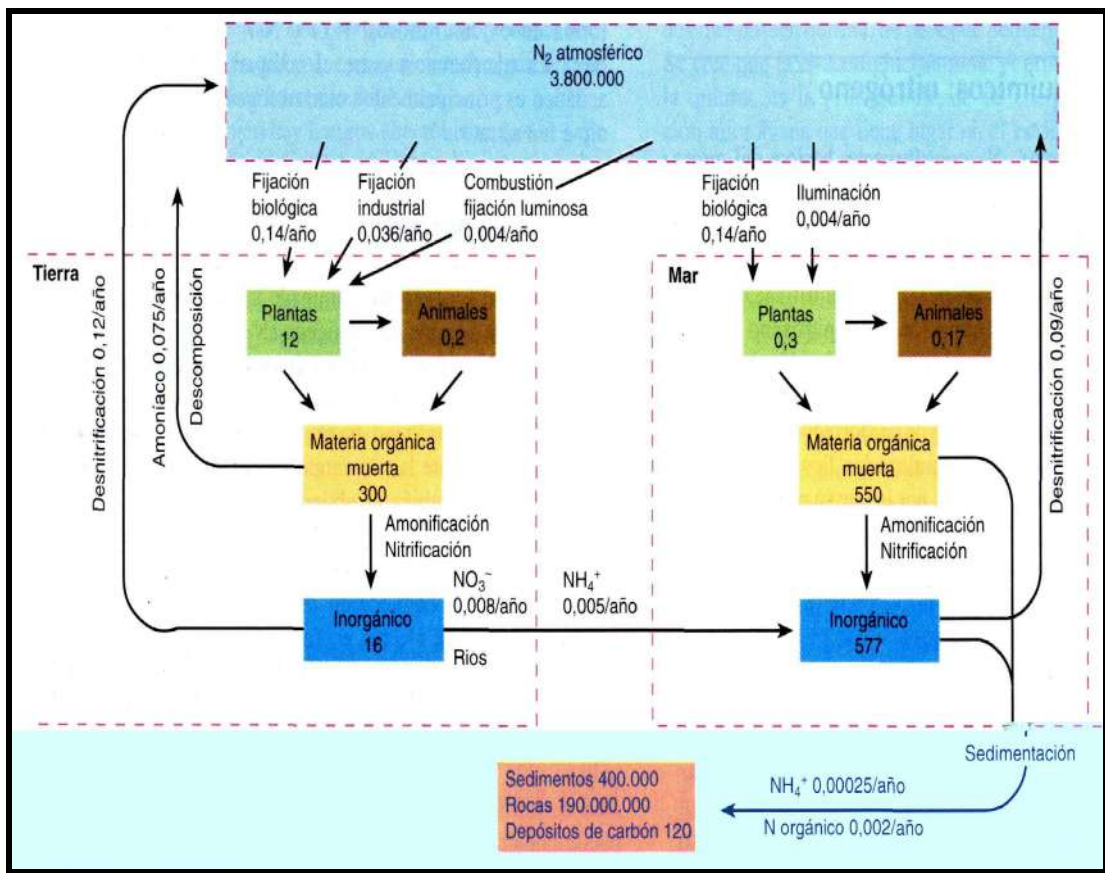
## 1.3 NITROGENO

### 1.3.1 Dinámica del nitrógeno en el ambiente

La importancia del nitrógeno se pone en evidencia al analizar la productividad de ecosistemas naturales y agrícolas, siendo mayor esta al ser fertilizados con este elemento (Graham and Vance, 2003). El elemento nitrógeno se presenta en la naturaleza como diferentes compuestos: NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; NO<sub>2</sub><sup>-</sup>; NO; N<sub>2</sub>O; N<sub>2</sub>; NH<sub>3</sub>. La forma mas abundante es el N<sub>2</sub> que se encuentra principalmente en la atmósfera en un 78% de su composición. Sin embargo esta forma de nitrógeno no es utilizable por la planta. Esta abundancia tiene correlato con la estabilidad termodinámica de este compuesto ya que se requieren 940 KJ/mol para romper la triple ligadura que une a los átomos de N para formar amoniaco (NH<sub>3</sub>) o amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). Estas reacciones de transformación del nitrógeno, pueden ser procesos naturales o industriales. La transformación industrial del nitrógeno se lleva a cabo por el proceso conocido como "Haber" y utiliza temperaturas y presiones del orden de 200 °C y 200 atm. Este genera amoniaco que se utiliza para fabricar sales de amonio como nitrato, sulfato, fosfatos o sus mezclas que son los fertilizantes mas utilizados agrónomicamente. Como puede verse en la figura 1 este proceso ronda en el

11% de la fijación total de nitrógeno (Madigan et al., 2002). La transformación natural del nitrógeno engloba a dos mecanismos: biológica y fotoquímica. El proceso fotoquímico engloba al nitrógeno atmosférico transformado a óxidos que luego llegaran al suelo como nitratos mediante la lluvia ácida. Estos óxidos se forman por acción de descargas eléctricas durante las tormentas y/o combustiones naturales o accidentales. Este proceso representa solamente el 2.5% del nitrógeno fijado. Por otro lado tenemos al proceso biológico o la fijación biológica de nitrógeno (FBN), donde el nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) es reducido e incorporado a estructuras carbonadas (organificación del nitrógeno). La FBN es propiedad exclusiva de algunos procariotas como los rizobios, comprendiendo el 86.5% del nitrógeno fijado en la naturaleza. El ciclo se cierra por procesos que generan  $N_2$  a partir del nitrógeno que se ha fijado. Estos procesos se conocen como Desnitrificación y Nitrificación-Amonificación. La desnitrificación comprende procesos biológicos, respiración anaerobia, donde el nitrato, principalmente, es utilizado como aceptor de electrones para formar compuestos más reducidos como  $N_2O$ ,  $NO$  y  $N_2$  que se pierden a la atmósfera.

Figura 1: Ciclo Geoquímico del Nitrógeno.



Fuente: Madigan, 2004; pag: 572

La amonificación comprende el proceso formador de amonio mediante la descomposición de la materia orgánica, animales, vegetales y otros organismos muertos. Este amonio puede perderse a la atmósfera, como amoniaco ( $\text{NH}_3$ ) en suelos alcalinos, mientras que en suelos ácidos la forma amónica se retiene por absorción a las partículas coloidales del suelo. El amonio es estable en suelos anóxicos ya que en los oxigenados se oxida a nitrato y óxidos del nitrógeno mediante las bacterias nitrificantes. Así, la nitrificación engloba un proceso oxidativo donde el amoniaco se transforma en nitrato. La nitrificación ocurre fácilmente en suelos bien aireados a pH neutros y es inhibida a pH muy ácidos y anaerobios, pudiendo en estas condiciones generar altas concentraciones de nitratos que puede ser utilizado por las plantas (Madigan et al., 2004).

### **1.3.2 Asimilación del nitrógeno en plantas**

El nitrógeno, después del agua, es el nutriente más importante en el desarrollo de la planta dada su abundancia en las principales biomoléculas de la materia viva. Distribuyéndose en tres grupos donde proteínas y ácidos nucleicos representan más del 50% y el resto en nitrógeno orgánico soluble como aminoácidos, amidas, aminas entre otras y nitrógeno inorgánico como nitratos y amonio (Taiz L. and Zeiger E.; 2002).

Las plantas pueden transformar el nitrógeno inorgánico, nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), en orgánico a través de la asimilación de nitrógeno. En la asimilación de nitrógeno el nitrato captado del suelo, a través de un sistema de transportadores estructurales e inducibles ubicados en las células de la raíz (Forde et al; 2000), para luego reducirse a amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) mediante las enzimas nitrato y nitrito reductasa presentes en tejidos verdes como hojas (Azcón-Bieto y Talón, 2000; Taiz and Zeiger, 2002). El amonio se incorpora en estructuras carbonadas mediante las enzimas glutamina sintetasa (GS) y 2-oxoglutarato glutamina aminotransferasa dependiente de ferridoxina (GOGAT-Fed) presentes en tejidos fotosintéticos generando aminoácidos que serán el esqueleto de las proteínas.



### 1.3.3 FIJACION BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO

#### 1.3.3.1 Simbiosis *S. meliloti* - *M. sativa*

La característica distintiva de las leguminosas es que tienen la capacidad de fijar simbióticamente el nitrógeno con diversos grupos de bacterias gram-negativas al formar nódulos en la raíz (Spaink et al, 1998; citado por Brewin 2004). Los procariotas que establecen simbiosis con las leguminosas son conocidos como rizobios y pertenecen a los siguientes géneros: *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y algunas especies de los géneros *Burkholderia*, *Ralstonia* y *Methylobacterium* (Perret et al., 2000; Brewin, 2002; Broughton, 2000). Se estima que cerca del 90 % de todas las especies de leguminosas son noduladas por cepas de rizobios. La nodulación es predominante en dos subfamilias, la *Papilionoides* y *Mimosoides*, siendo mucho menos frecuente en miembros de la primitiva *Caesalpinioides* donde solo se ha reportado el 21 % de nodulación (Sprent, 2001; citado por Brewin 2004).

Los rizobios tienen dos formas de vida: libre y en simbiosis. En la libre se los encuentra en el suelo, mientras que en la simbiótica se tiene colonización e infección de la raíz donde el rizobio evoluciona a un estado denominado bacteroide. Estas formas difieren metabólicamente y morfológicamente. En vida libre son incapaces de fijar nitrógeno y utilizan una variedad de fuentes de carbono mientras que los bacteroides pueden fijar nitrógeno y solo pueden utilizar ácidos dicarboxílicos como malato y/o succinato como fuente de energía. La transición de rizobio en vida libre a bacteroide requiere de un reconocimiento de la planta para que el sistema de defensa no lo elimine (Lodeiro et al., 2003); en la tabla 4 se presenta la compatibilidad de grupo leguminosa-rizobio.

Tabla 4. Compatibilidad de grupo simbiote - huésped

| Species  | Typical host(s)  | Host range   | Examples of nonhosts   | Reference(s)   |
|--|--|--|--|--|
| <i>Azorhizobium caulinodans</i>  | Robinieae (P), <i>Sesbania</i> spp.  | Compatible only with <i>Sesbania punctata</i> and <i>S. rostrata</i>   | MIMOSOIDEAE, PAPILIONOIDEAE (except <i>Sesbania</i> )                  | M. Holsters, personal communication  |
| <i>Bradyrhizobium</i> spp.<br><i>Lupinus</i> isolates<br><i>Vigna</i> isolates | Genisteae (P), <i>Lupinus</i> spp., Phaseoleae (P), <i>Macropitium</i> , <i>Vigna</i> spp. | Acaciae (M), Mimoseae (M), Desmodieae (P), Lotaeae (P), Psoraleae (P), Phaseoleae (P), Aeschynomeneae (P)  | Vicieae (P), Cicereae (P), Trifolieae (P)                              | C. E. Pankhurst and C. W. Ranson, personal communication; H. Meyer z. A. and W. J. Broughton, unpublished data |
| <i>Bradyrhizobium elkanii</i>  | Phaseoleae (P), <i>Glycine</i> spp.  | Phaseoleae (P), <i>Macropitium</i> , <i>Vigna</i> spp.   | Vicieae (P), Cicereae (P), Trifolieae (P)                              | G. Stacey, personal communication  |
| <i>Bradyrhizobium japonicum</i>  | Phaseoleae (P), <i>Glycine</i> spp.  | Aeschynomeneae (P), <i>Arachis</i> spp., Phaseoleae (P), <i>Macropitium</i> , <i>Vigna</i> spp.  | Vicieae (P), Cicereae (P), Trifolieae (P)                              | G. Stacey, personal communication  |
| <i>Mesorhizobium huakuii</i>   | <i>Astragalus sinicus</i>  | Galegeae (P), <i>Astragalus</i> spp.   | MIMOSOIDEAE, PAPILIONOIDEAE  | 282  |
| <i>Mesorhizobium loti</i>  | Lotaeae (P), <i>Lotus</i> spp., Genisteae (P), <i>Lupinus</i> spp.                         | Mimoseae (M), <i>Mimosa pudica</i> , <i>Leucaena leucocephala</i> ; Phaseoleae (P), <i>Macropitium atropurpureum</i>   | Vicieae (P), Cicereae (P), Trifolieae (P)                              | G. Stacey, personal communication  |
| <i>Rhizobium</i> sp. strain NGR234   | Phaseoleae (P), Desmodieae (P)   | Mimoseae (M), Acaciae (M), Ingeae (M), Sophoreae (P), Dalbergieae (P), Amorpheae (P), Millettieae (P), Robinieae (P), Indigofereae (P), Lotaeae (P), Galegeae (P), Bossiaeeae (P), Mirbelieae (P), Podalyriaceae (P), Crotalariae (P), Thermopsidaceae (P), Genisteae (P), Psoraleae (P) | Vicieae (P), Cicereae (P), Trifolieae (P)                              | 207  |
| <i>Rhizobium etli</i>  | Phaseoleae (P), <i>Phaseolus</i> spp.  | Ingeae (M), Crotalariae (P), Galegeae (P), Mimoseae (M), Desmodieae (P), Robinieae (P)   | Robinieae (P)  | 122; E. Martínez-Romero, personal communication  |
| <i>Rhizobium fredii</i>  | Phaseoleae (P), Desmodieae (P)   | Mimoseae (M), Ingeae (M), Sophoreae (P), Amorpheae (P), Millettieae (P), Robinieae (P), Indigofereae (P), Lotaeae (P)  | Vicieae (P), Cicereae (P), Trifolieae (P)                              | 207  |
| <i>Rhizobium galegae</i>   | Galegeae (P), <i>Galega</i> spp.   | Compatible only with <i>Galega</i> spp.  | MIMOSOIDEAE, PAPILIONOIDEAE (except <i>Galega</i> )                    | K. Lindström, personal communication   |
| <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. phaseoli                                    | Phaseoleae (P), <i>Phaseolus</i> spp.  | Phaseoleae (P)   | MIMOSOIDEAE, Trifolieae (P)  | E. Martínez-Romero, personal communication   |
| <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii                                    | Trifolieae (P), <i>Trifolium</i> spp.  | Phaseoleae (P), Desmodieae (P), Trifolieae (P), <i>Medicago</i> spp.   | MIMOSOIDEAE, Phaseoleae (P)  | H. P. Spink, personal communication  |
| <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. viciae                                      | Vicieae (P), <i>Pisum sativum</i> , <i>Vicia</i> spp.                                      | <i>Lathyrus</i> spp. (e.g., <i>L. sativa</i> )   | MIMOSOIDEAE, Phaseoleae (P), Desmodieae (P)                            | J. A. Downie, personal communication   |
| <i>Rhizobium meliloti</i>  | Trifolieae (P), <i>Medicago</i> spp., <i>Melilotus</i> spp., <i>Trigonella</i> spp.        | Acaciae (M), Desmodieae (P), Mimoseae (M), Phaseoleae (P), Vicieae (P)   | Acaciae (M), Desmodieae (P), Mimoseae (M), Phaseoleae (P), Vicieae (P) | J. Dénaire, personal communication   |
| <i>Rhizobium saheli</i>  | Robinieae (P), <i>Sesbania</i> spp.  | Acaciae (M), Mimoseae (M)  | Acaciae (M), Mimoseae (M)  | 165; C. Boivin, personal communication   |
| <i>Rhizobium teranga</i> bv. acaciae   | Acaciae (M), <i>Acacia</i> spp.  | Robinieae (M), <i>Leucaena leucocephala</i> , <i>Prosopis juliflora</i>  | Robinieae (P), <i>Sesbania</i> spp.                                    | 165; C. Boivin, personal communication   |
| <i>Rhizobium teranga</i> bv. sesbaniae   | Robinieae (P), <i>Sesbania</i> spp.  | Acaciae (M), Mimoseae (M)  | Acaciae (M), Mimoseae (M)  | 165; C. Boivin, personal communication   |
| <i>Rhizobium tropici</i>   | Phaseoleae (P), <i>Phaseolus</i> spp.  | Galegeae (P), Crotalariae (P), Desmodieae (P), Mimoseae (M), Robinieae (P), Lotaeae (P)  | Vicieae (P), Cicereae (P), Trifolieae (P)                              | E. Martínez-Romero, personal communication   |

<sup>a</sup> Plants are listed by their subfamilies, tribes, genera, and species. Associations are listed only where fully effective nodulation (i.e., Fix<sup>+</sup>) has been reported. Subfamily names are listed in capital letters (Caesalpinoideae [C], Mimosoideae [M], and Papilionoideae [P]) (201).

### 1.3.3.2 NODULACION

Para iniciar el proceso de nodulación los rizobios deben colonizar la rizosfera, espacio íntimo a la raíz que se ve modificado fisicoquímicamente por ésta debido al exudado de aminoácidos, azúcares, proteínas, carbohidratos, vitaminas, hormonas, flavonoides y ácidos grasos. Se ha comprobado que la planta secreta cerca del 19 % de los fotosintatos en las inmediaciones de la raíz (Perret, 2000). Íntimamente a la raíz se encuentra una capa mucilaginosa, *mucigel*, que junto a la superficie de la raíz forman la estructura denominada rizoplasma, la cual también puede ser colonizada. Además, las bacterias pueden colonizar a capas subcorticales de la raíz, zona que se conoce como endorrizosfera. La rizosfera genera una quimiotaxis positiva poco específica de los rizobios y otros microorganismos, como los hongos. Para que los primeros se fijen a la raíz existen múltiples factores que dependen de la planta y el rizobio. Las adhesinas (Mathysse and Kijne, 1998) de la bacteria y lectinas de la superficie celular generan una atracción relativamente específica entre huésped y hospedador (van Rhijn *et al.*, 2001). Los flavonoides (2-fenil – 1,4 – benzopiranos derivados) son las responsables de la especificidad en el reconocimiento hospedador – huésped. Estos son generados por la planta y tienen acción sobre la misma y para activar genes de la nodulación (*nod*, *nol* y *noe*) de los rizobios denominados *nod*. En algunos casos pueden inhibir la nodulación y participan en el sistema de defensa de la planta frente a microorganismos no compatibles. La activación de los genes *nod* es mediado por las proteínas NodD que se unen al promotor del *nod* box de dichos genes, aunque se requiere los flavonoides para dicha activación o su presencia mejora la activación, no se ha podido demostrar la interacción entre el flavonoide y las proteínas NodD. En los rizobios, los genes *nod*, participan en la liberación de lipo-quitina-oligosacárido (LCOs), oligopolímero de N-acetil-β-D-glucosamina, que se denomina factor Nod (NFs), siendo estos específicos para cada rizobio. El gen *nodA* codifica el corazón del NFs y una serie de genes que codifican para enzimas que lo decoran, adición de acil-graso, fucosa, sulfatación, acetilación, N-metilación y carbamoilación, O-metilación. La tabla 5 muestra la estructura de los factores *nod*, especificidad y su decorado (Excelente revisión

de los factores nod se presenta en el trabajo de D`Haeze and Holsters del 2002).

Tabla 5. Estructura, especificidad y decorado de los factores nod.

TABLE 4. Nod factors and their baroque decorations<sup>d</sup>

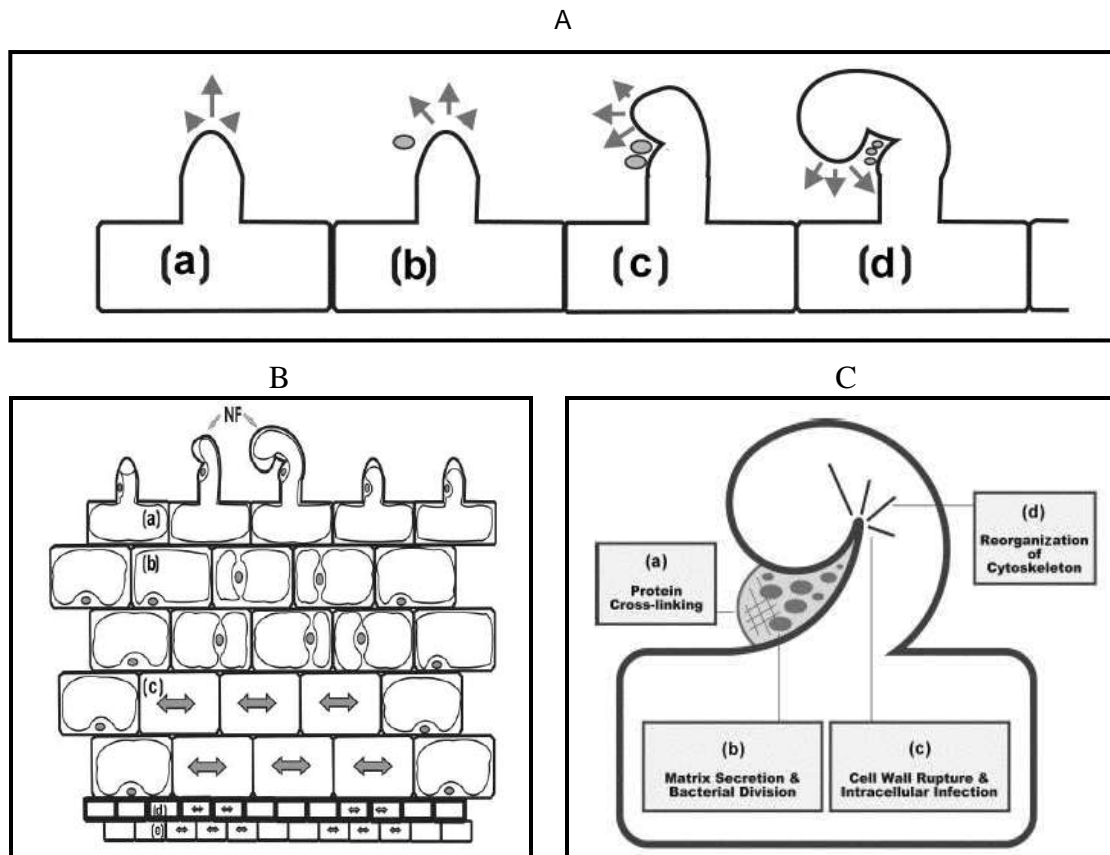
| Strains  | Acyl   | R1    | R2              | R3              | R4                        | R5     | R6  | n           | Ref.   |
|--|--|-------|-----------------|-----------------|---------------------------|--------|-----|-------------|--------|
| <i>A. caulinodans</i> ORS571                   | C <sub>18:1</sub> , C <sub>16:0</sub>  | Me    | OH              | Cb, H           | Fuc, H                    | Ara, H | OH  | 1, 2        | 172    |
| <i>B. elkanii</i> USDA61                       | C <sub>18:1</sub>  | Me, H | Cb, H           | Ac, H           | MeFuc                     | H      | OH  | 1, 2        | 35     |
| <i>B. japonicum</i> USDA110                    | C <sub>16:0</sub> , C <sub>16:1</sub> ,<br>C <sub>18:1</sub>   | H     | OH              | H               | MeFuc                     | H      | OH  | 2           | 229    |
| <i>Rhizobium</i> sp. strain GRH2               | C <sub>16:0</sub> , C <sub>18:0</sub> ,<br>C <sub>18:1</sub> , C <sub>20:1</sub>   | Me, H | OH              | H               | S, H                      | H      | OH  | 1, 2, 3     | 160    |
| <i>Rhizobium</i> sp. strain ORS1645            | C <sub>18:0</sub> , C <sub>18:1</sub>  | Me    | Cb <sup>c</sup> | Cb <sup>c</sup> | S, H                      | H      | OH  | 2           | 164    |
| <i>Rhizobium</i> sp. strain NGR234             | C <sub>16:1</sub> , C <sub>18:0</sub> ,<br>C <sub>18:1</sub>   | Me    | Cb, OH          | Cb, H           | MeFuc, AcMeFuc,<br>SMeFuc | H      | OH  | 2           | 206    |
| <i>R. eli</i> CFN42                            | C <sub>18:1</sub>  | Me    | Cb, OH          | H               | AcFuc                     | H      | OH  | 2           | 33     |
| <i>R. eli</i> CE3                              | C <sub>18:0</sub> , C <sub>18:1</sub>  | Me    | Cb, OH          | H               | AcFuc                     | H      | OH  | 2           | 203    |
| <i>R. fredii</i> USDA191 <sup>b</sup>          | C <sub>18:1</sub> , C <sub>18:0</sub> ,<br>C <sub>16:1</sub>   | H     | H               | H               | Fuc, MeFuc                | H      | H   | 0, 1, 2     | 7      |
| <i>R. fredii</i> USDA257                       | C <sub>18:1</sub>  | H     | OH              | H               | Fuc, MeFuc                | H      | OH  | 0, 1, 2     | 6      |
| <i>R. galegae</i>                              | C <sub>18:1</sub> , C <sub>18:2</sub> ,<br>C <sub>18:3</sub> , C <sub>20:2</sub> ,<br>C <sub>20:3</sub>  | H     | OH              | Cb              | H                         | H      | Ac  | 1           | 282    |
| <i>R. huakuii</i> <sup>d</sup>                 | C <sub>18:4</sub>  | H     | OH              | H               | S                         | H      | OH  | 2           | 282    |
| <i>R. leguminosarum</i><br>bv. trifolii ANU843 | C <sub>16:0</sub> , C <sub>16:1</sub> ,<br>C <sub>18:0</sub> , C <sub>18:1</sub> ,<br>C <sub>18:2</sub> , C <sub>20:3</sub>                        | H     | OH              | H, Ac           | H                         | H      | OH  | 0, 1, 2     | 188    |
| bv. trifolii LPR5045                           | C <sub>18:0</sub> , C <sub>18:1</sub> ,<br>C <sub>20:3</sub> , C <sub>20:4</sub>   | H     | OH              | Ac              | H                         | H      | OH  | 2           | 269b   |
| bv. viciae RBL5560                             | C <sub>18:1</sub> , C <sub>18:4</sub>  | H     | OH              | Ac              | H                         | H      | OH  | 1, 2        | 252    |
| bv. viciae TOM                                 | C <sub>18:1</sub> , C <sub>18:4</sub>  | H     | OH              | Ac              | Ac                        | H      | OH  | 1, 2        | 80     |
| <i>R. loti</i> NZP2213                         | C <sub>16:0</sub> , C <sub>16:1</sub> ,<br>C <sub>18:0</sub> , C <sub>18:1</sub> ,<br>C <sub>20:0</sub> , C <sub>20:1</sub> ,<br>C <sub>22:1</sub> | H     | Cb              | H               | Fuc, AcFuc                | H      | Fuc | -1, 0, 1, 2 | 187    |
| <i>R. loti</i> NZP2037                         | C <sub>18:0</sub> , C <sub>18:1</sub>  | Me    | Cb              | Cb              | AcFuc                     | H      | OH  | 2           | 161    |
| <i>R. meliloti</i> RCR2011                     | C <sub>16:1</sub> , C <sub>16:2</sub> ,<br>C <sub>16:3</sub>   | H     | OH              | H, Ac           | S                         | H      | OH  | 1, 2        | 2, 154 |
| <i>R. tropici</i> CFN299                       | C <sub>18:1</sub>  | Me    | OH              | H               | S, H                      | H      | OH  | 2           | 202    |
| <i>S. saheli</i> ORS611                        | C <sub>16:0</sub> , C <sub>18:1</sub>  | Me    | Cb <sup>c</sup> | Cb <sup>c</sup> | Fuc, H                    | Ara, H | OH  | 2           | 163    |
| <i>S. teranga</i> bv. acaciae ORS1602          | C <sub>16:0</sub> , C <sub>18:0</sub> ,<br>C <sub>18:1</sub>   | Me    | Cb <sup>c</sup> | Cb <sup>c</sup> | S, H                      | H      | OH  | 2           | 164    |

<sup>a</sup> Abbreviations: Ac, acetyl; Ara, arabinosyl; Cb, carbamoyl; Fuc, fucosyl; H, hydrogen; Me, methyl; S, sulfate; MeFuc, methylfucose; AcMeFuc, acetylated methylfucose; SMeFuc, sulfated methylfucose.  
<sup>b</sup> In USDA191, a minor fraction of the N-acetylglucosamine marked in brown is replaced by a glucose.  
<sup>c</sup> Carbamoyl group is either on R2 or R3.  
<sup>d</sup> *R. huakuii* Nod factors are partially glycosylated at the C-2 position of the reducing termini.

Fuente: Perret, 2000.

En el caso de *Medicago spp.*, se ha demostrado por espectroscopia de fluorescencia, que el NFs se une a la superficie de la pared celular, aunque es poco clara la manera en que altera el desarrollo celular de las raíces secundarias en desarrollo. Si es claro que pocos segundos después de la aplicación del NFs se tiene un flujo de  $Ca^{+2}$  desde el medio al citoplasma celular en el punto de aplicación del NFs. Esto causa un cese del crecimiento, que se reanuda mas tarde con dirección diferente causando un enrulado de la raíz secundaria y confinamiento de la bacteria en espacio generado por el enrulado. Hay que agregar que no todos los pelos son infectables, estudios han mostrado que los pelos maduros no lo son. Esto indica que la inoculación debe hacerse en etapas tempranas del desarrollo de la raíz. A demás, los NFs, inducen a las células subcorticales al reingreso al ciclo mitótico dando origen al primordio del nódulo; esto puede verse en los gráficos A, B y C de la figura 2 (Brewin 2004; Broughton, 2000; Mylona et al., 1995; Lodeiro et al., 2003; Perret, 2000).

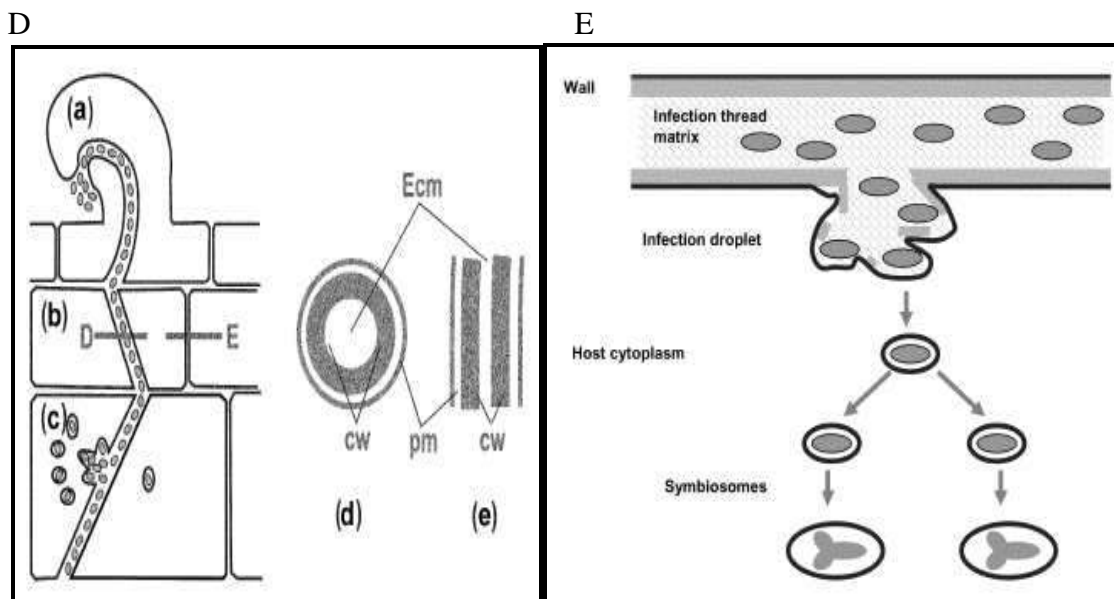
**Figura 2. Deformación de la raíz secundaria por presencia del rhizobio.**



Fuente: Brewin, 2004.

El ingreso de la bacteria se hace en un medio hostil debido a que la planta despliega mecanismos de defensa como compuestos reactivos de oxígeno y la bacteria hace lo mismo mediante una peroxidasa y exopolisacaridos (EP I y/o EP II). Los NFs parecen estar involucrados en la activación de genes ENOD, que codifican proteínas presentes en el proceso de formación del hilo de infección que es de base celulósica. Dentro del hilo de infección las escasas bacterias que penetran pueden multiplicarse y llegar hasta capas celulares subcorticales donde por invaginación de la propia pared del hilo colonizan el citoplasma celular. La invaginación hace que el procarionta se cubra de una pared-membrana de origen vegetal denominada membrana peribacteroidal (pbm); esto puede verse en los gráficos D y E de la figura 3 (Brewin 2004; Broughton, 2000; Mylona, 1995; Lodeiro et al., 2003; Perret, 2000).

**Figura 3. Deformación de la raíz secundaria por presencia del rhizobio.**

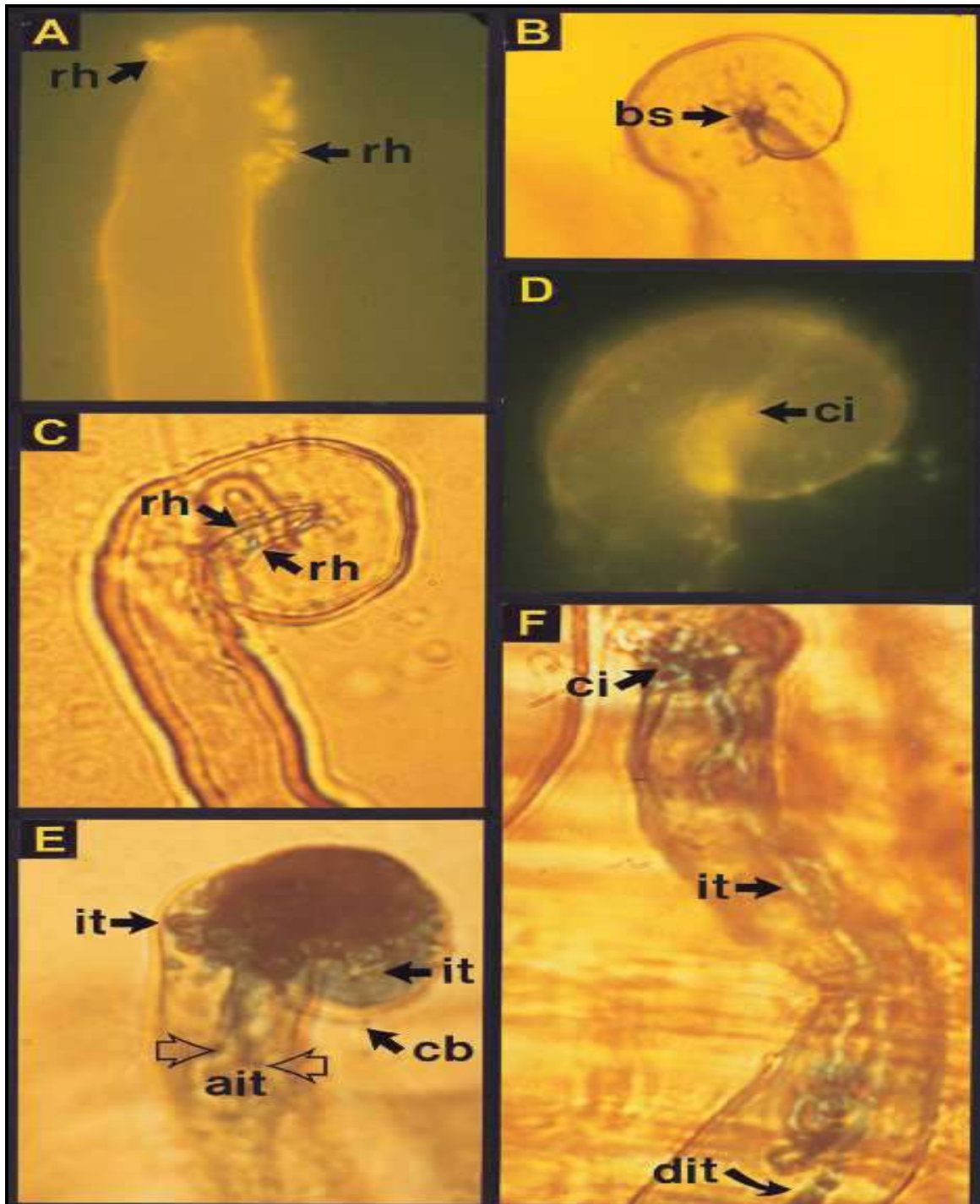


Fuente: Brewin, 2004.

Lo descrito anteriormente, acerca del proceso de infección, se puede ver en la figura 4 donde se muestra la fotografía con microscopio electrónico de dicho proceso en forma real. Una vez cubiertos por esta estructura se prosigue con la multiplicación y diferenciación, donde principalmente se inhiben los genes de la nodulación para pasar a estimularse los de la fijación de nitrógeno, llegando a un estado fisiológico conocido como bacteroides. Los grupos de bacteroides rodeados de la membrana peribacteroidal se denominan

simbiosomas y es en estos donde se fijará el nitrógeno. Los nódulos pueden ser determinados o indeterminados. Los determinados se dan en Soja, Lotus y Poroto siendo de forma redondeada. Los nódulos indeterminados se dan en alfalfa, arvejas y trébol, con una estructura alargada cilíndrica con cuatro zonas: meristemática, simbiosomas en diferenciación, simbiosomas fijadores y simbiosomas senescentes (Lodeiro et al., 2003).

Figura 4. Proceso de infección.

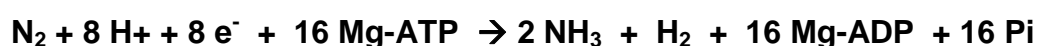


Fuente: Perret, 2000.

La cantidad de nódulos que se formarán esta determinado por la planta. Cuando la planta dispone de una fuente de nitrógeno más accesible como el nitrato inhibe la nodulación y utiliza la asimilación de nitrógeno que presenta un menor costo energético que la FBN. El control del número de nódulos lo ejercen los nódulos tempranos, que inhiben el desarrollo de nuevos, aunque también participan procesos bioquímicos de la parte aérea de la planta, como la fotosíntesis (Taiz and Zeiger; 2002).

### 1.3.3.3 Procesos enzimáticos

Los simbiosomas formados regulan la expresión de la nitrogenasa. Esta enzima se compone de dos proteínas distintas denominadas dinitrogenasa y reductasa de la dinitrogenasa. Ambas proteínas contienen hierro (Fe) y pero la dinitrogenasa también contiene molibdeno (Mo). En la proteína dinitrogenasa el cofactor es un grupo de Fe-Mo, de composición  $\text{MoFe}_7\text{S}_9$  homocitrato, que se presenta por duplicado en cada proteína y es donde ocurre la reducción del nitrógeno. En la reducción del  $\text{N}_2$  hasta  $\text{NH}_3$  se requieren 8 electrones donde 2 se utilizan para formar una molécula de  $\text{H}_2$  por cada  $\text{N}_2$  reducido y entre 4 y 5 ATPs por par de electrones (Berrière, 2003). La reacción básica es la siguiente:

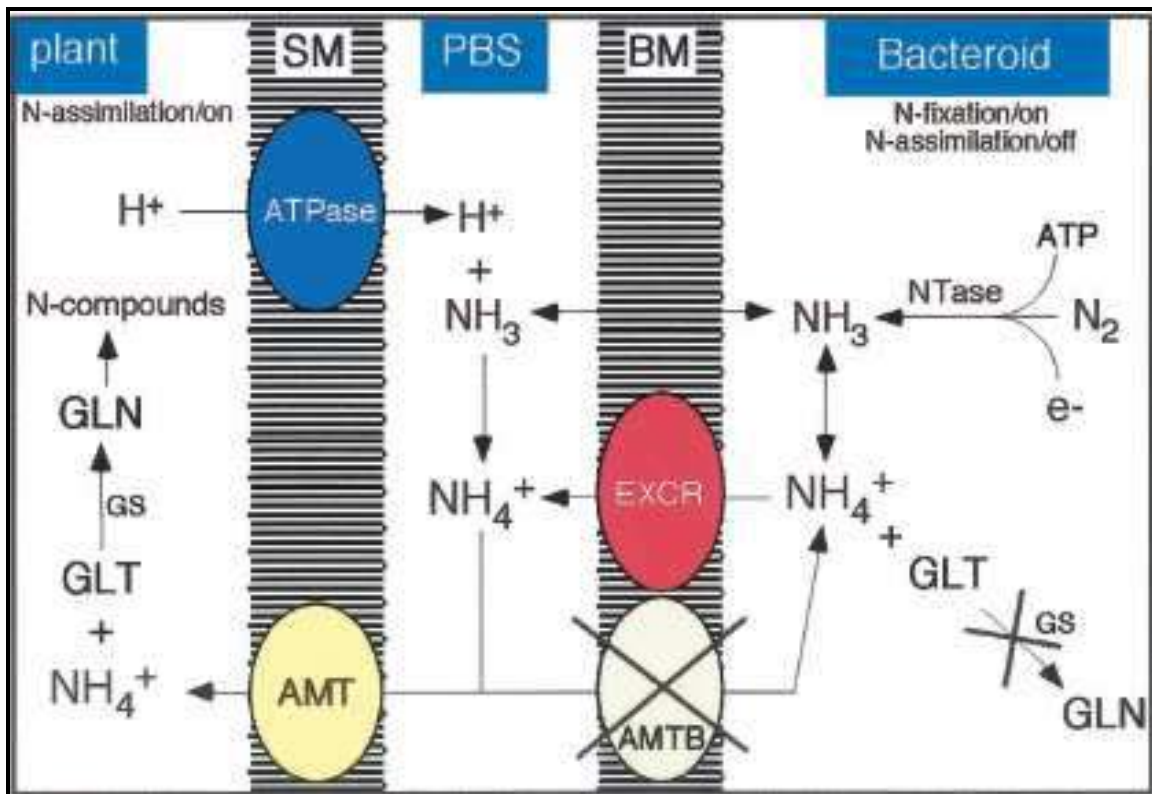


La nitrogenasa posee un potencial redox muy bajo siendo muy sensible al oxígeno y sustancias reactivas de oxígeno, por lo que se desnaturaliza rápidamente bajo estas condiciones. Por esto se desarrollaron estrategias como la de mantener un medio con potencial redox bajo, pudiéndose lograr mediante un buffer redox en óptimas condiciones como el establecido por el par glutatión (GSH) - glutatión oxidado (GSSG) y ácido ascórbico - ácido dehidroascórbico, entre los más importantes. Otra estrategia es la reducción de la  $\text{pO}_2$  al generar un transportador de oxígeno denominado Leghemoglobina (Lb) de estructura similar a la hemoglobina humana. Esta proteína cuando se fija al oxígeno adquiere una coloración rojiza que es característica de los nódulos fijadores de nitrógeno. La membrana peribacteroidal ejerce un efecto



protector a reducir la difusión del oxígeno al simbiosoma (Lodeiro et al., 2003) además de ejercer un efecto regulador del tránsito de metabolitos entre el simbionte y la planta. En el desarrollo de la fisiología fijadora de nitrógeno se expresan y reprimen genes de manera que el amonio producido por el bacteroide no sea incorporado a estructuras carbonadas como tampoco pueda incorporarse al bacteroide. Además se expresa un transportador de amonio a pesar de que el amoníaco puede difundir a través de la membrana de manera libre. Una ATPasa en la membrana externa acidifica el espacio intermembrana generando desplazamiento del equilibrio  $\text{NH}_3 / \text{NH}_4^+$  a favor del  $\text{NH}_4^+$  que nuevamente es excretado pero ahora al citoplasma celular, esto puede verse en la figura 5.

**Figura 5. Intercambio de N entre bacteroide y planta.**

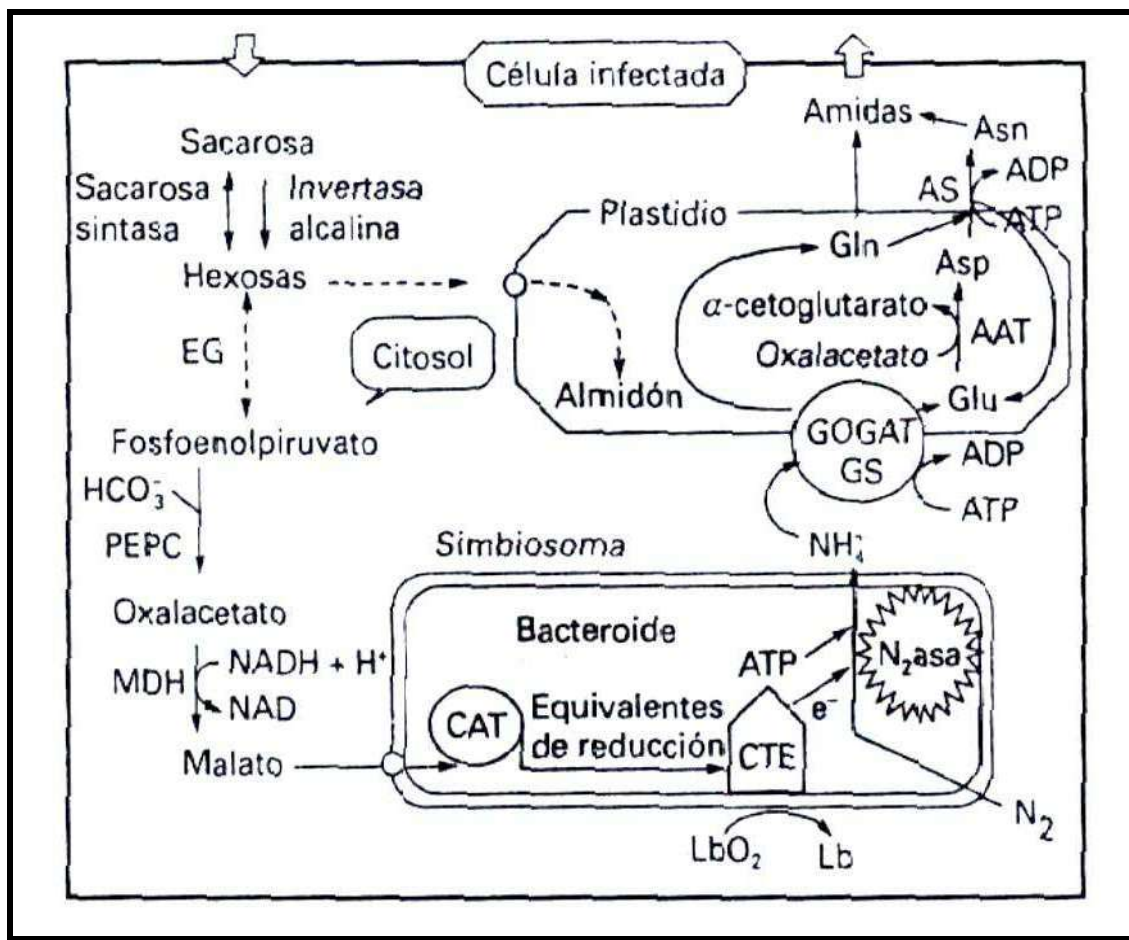


Fuente: Patriarca et al., 2002.

El bacteroide fijador de nitrógeno presenta un alto consumo energético debido a la acción de la nitrogenasa. La energía requerida se mantiene mediante un flujo de carbono proveniente de los fotosintatos de la planta. El bacteroide presenta transportadores de ácidos dicarboxílicos, como malato, que es oxidado en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) para generar

ATP. El malato se genera en el CAT de la planta a partir de la sacarosa proveniente de la fijación del carbono. El amonio es incorporado a estructuras carbonadas para generar glutamina (Gln) y asparagina (Asp) mediante el ciclo enzimático GS / GOGAT. Este ciclo produce la organificación del nitrógeno fijado, presente en el citoplasma celular del vegetal, y genera compuestos de alta densidad en nitrógeno que sirven como translocadores de este elemento a tejidos en crecimiento, via xilema; esto puede verse en la figura 6.

Figura 6. Flujo de carbono y nitrógeno en el nódulo.



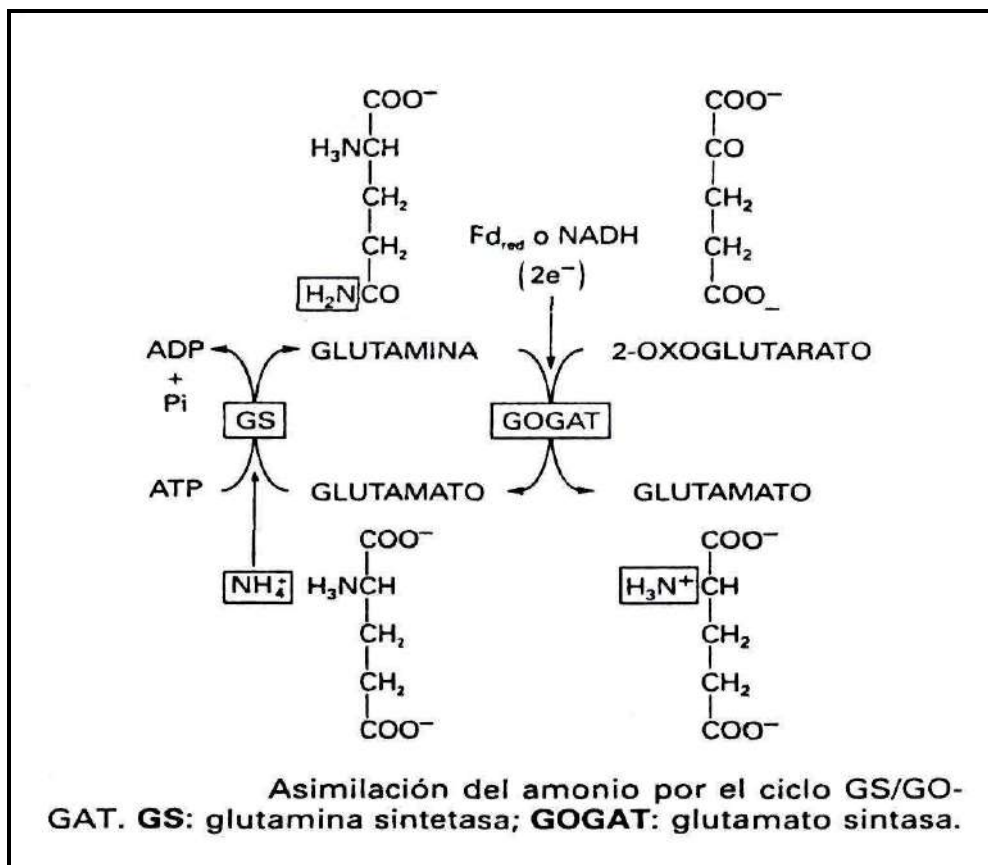
Fuente: Madigan et al., 2002; pag: 572.

En la primera etapa la enzima Glutamina Sintetasa (GS) incorpora amonio a la posición  $\gamma$ -ceto del glutamato para formar glutamina (Gln) que reacciona con  $\alpha$ -cetoglutarato para dar 2 moléculas de glutamato mediante una reacción catalizada por la enzima Glutamato Sintasa o  $\alpha$ -cetoglutarato glutamina aminotransferasa (GOGAT) que puede ser exportada o ser utilizado en la síntesis de asparagina. Este tipo de fijación de nitrógeno se realiza básicamente en nódulos indeterminados ya que en los determinados se

exporta el nitrógeno como ureidos, alantoína y ácido alantoico (Lodeiro et al., 2003; Patriarca et al., 2002; Smith and Gallon, 1993). Una mayor aproximación del ciclo GS / GOGAT se puede tener al observar la figura 7.

La glutamina sintetasa, GS es una proteína octamérica de masa molecular de 320-360 kDa y con alta afinidad por el amonio  $K_m = 3-5 \mu M$ . Existen varias isoformas que se diferencian en localización y subunidades, denominadas  $GS_1$ ,  $GS_r$ ;  $GS_{n2}$ ;  $GS_{n1}$  y  $GS_{n2}$ .

Figura 7. Ciclo GS - GOGAT



Fuente: Azcón-Bieto y Talón, 2000: 239.

La  $GS_2$  se presenta en hojas verdes y cotiledones con ubicación cloroplástica, participando en la asimilación del nitrato y del amonio de la fotorespiración, aunque también se detecta actividad GS en el citoplasma. La  $GS_r$  se encuentra en las células de la raíz y es de estructura similar a la citosólica de las células de la hoja. Las isoformas  $GS_{n1}$  y  $GS_{n2}$  se encuentran en las células del nódulo. Los diferentes polipéptidos que forman las GSs son codificados por una familia de genes nucleares,  $gln-\alpha$ ,  $gln-\beta$ ,  $gln-\gamma$  y  $gln-\delta$ . La regulación de la GS se ejerce principalmente sobre la transcripción diferencial

de los distintos genes de la familia. La expresión depende del tipo de célula, el grado de desarrollo del tejido y factores ambientales y nutricionales. La luz, nitrato y amonio activan en las hojas la transcripción del *gln-δ*, aumentando la isoforma cloroplástica. Durante la senescencia foliar se activan los genes *gln-α*, *gln-β* y disminuye el *gln-δ*, dando aumento de la actividad GS<sub>1</sub> que participa en la formación de glutamina para el transporte de nitrógeno hacia órganos en desarrollo. En el proceso de nodulación se produce la estimulación de los genes *gln-β*, *gln-γ* de las células del nódulo para aumentar la actividad GS en éstas estructuras (Woodall J. et. al, 1996).

La glutamato sintasa o GOGAT de plantas superiores es una enzima monomérica que cataliza la transferencia reductiva de amonio desde la glutamina hacia el  $\alpha$ -cetogluatarato para formar dos moléculas de ácido glutámico. Esta presenta dos isoformas la Fd-GOGAT y la NADH-GOGAT. La Fd-GOGAT utiliza como grupo prostético el flavin adenin dinucleótido (FAD) y flavin mononucleótido (FMN) y se encuentra en los cloroplastos de las hojas, junto a la GS asimila el amonio que produce la nitrito y nitrato reductasa y/o la fotorespiración. La actividad de ésta acompaña a la actividad de la GS en la inducción por la luz en las hojas verdes. La NADH-GOGAT es una flavoproteína con un grupo sulfoférrico y constituida por un polipéptido de 200 kDa. Esta isoforma esta presente fundamentalmente en tejidos no fotosintéticos como raíz y nódulos (Azcón-Bieto y Talón, 2000; Lea et al., 1990).

Antes del descubrimiento de la GS se postulaba que la incorporación del amonio se realizaba mediante la enzima Glutamato deshidrogenada (GDH). Sin embargo determinaciones de parámetros enzimáticos como la constante de Michaelis – Menten (Km) para amonio arrojo valores altos en comparación con la GS indicando esto que la GDH actúa principalmente en situaciones donde la concentración de  $\text{NH}_4^+$  es grande. Esto puede presentarse en situaciones como la senescencia foliar o nodular. La disyuntiva entre la incorporación del amonio mediante el ciclo GS / GOGAT o la GDH se aclara en base ha inhibiciones enzimáticas selectivas de GS, GDH o GS – GOGAT mostrando que se produce asimilación en nódulos activos principalmente via GS / GOGAT (Ohyama and Kumazada, 1980).

Las enzimas del ciclo GS - GOGAT acompañan las variaciones de actividad de la nitrogenasa (Groat and Vance, 1981).

## 1.4 FOSFORO

### 1.4.1 Disponibilidad del fósforo del suelo

El fósforo (P) es uno de los seis (6) macro nutrientes (N, P, K, Ca, Mg y S) esenciales requeridos por la planta. Este nutriente es deficiente en grandes extensiones de tierras cultivables, siendo en este aspecto el segundo luego del nitrógeno. El contenido de fósforo en los suelos suele ser muy alta encontrándose en forma orgánica en porcentajes que van desde el 20-80% como ácido fítico (Richardson, 1994) y el resto en forma mineralizada como fosfatos solubles ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ) e insolubles al formar sales con cationes del suelo como el calcio. Teniendo en cuenta que el pKa de la primera y segunda ionización del ácido fosfórico es de 2.1 y 7.2 respectivamente a pH 6.0 la especie predominante es  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , siendo la especie captada por las raíces de las plantas.

### 1.4.2 Asimilación y funcionalidad metabólica del fósforo

En general, la baja disponibilidad de fósforo en los suelos lleva a que la raíz optimice la performance de la captación tendiendo a altas relaciones de superficie a volumen. Las micorrizas juegan un rol central en el aspecto de mejorar la disponibilidad de fósforo, como también lo hace la planta al invertir cerca de 20 % de los fotosintatos en forma de exudados de la raíz como son ácidos orgánicos que también quelan metales necesarios para el crecimiento. La captación por las células de la raíz se produce a través de transportadores estructurales de baja afinidad e inducibles de alta afinidad según la teoría mas aceptada. En situaciones donde el fósforo es deficiente se observa un aumento de la actividad de transportadores de alta afinidad. El requerimiento energético de la captación del fósforo se pone en evidencia frente a inhibidores del metabolismo energético. La concentración de fósforo intercelular debe permanecer constante teniendo en cuenta su participación en innumerable reacciones enzimáticas (Schachtman et al., 1998).

El fósforo participa en biomoléculas a través de enlaces fosfodiésteres como en fosfolípidos, ácidos nucleicos y en enlaces anhídrido de alta energía como ATP. Una fracción importante del fosfato de la planta permanece libre ubicándose en vacuolas y el 25% restante en el citoplasma y demás orgánulos. Este elemento participa en la fotosíntesis, respiración y metabolismo energético en general (Azcón-Bieto y Talón, 2000).

Cuando se somete a la planta a una situación de estrés en fósforo, esta responde maximizando el área exploratoria y aumentando como consecuencia la cantidad de fósforo disponible. El aumento de la relación superficie / volumen de raíz se debe a un marcado aumento del número de raíces secundarias y su longitud mientras la raíz primaria reduce su elongación (Lynch and Brown, 2001; Williamson et al., 2001; Linkohr et al., 2002; Hodge, 2004). Se propone que el remodelado del tejido de la raíz está asociado a un cambio en los factores de crecimiento (PGRs), en particular auxinas, etileno y citocinas, pudiendo deberse a cambios en el metabolismo primario y secundario. La adquisición de fósforo también puede aumentar por la modificación de la rizosfera que causa la planta al modificar el exudado celular, algo observado bajo deficiencias de fósforo, como el aumento de ácidos orgánicos. También puede aumentar la disponibilidad de fósforo en el suelo intimo a la raíz por la secreción de enzimas fosfatasas, algo que también se ha probado bajo estrés de fósforo por deficiencia. En cuanto al metabolismo, se puede decir que la actividad enzimática en general tiende a aumentar a favor de la formación de energía y de esqueletos carbonados. Se encuentra una fuerte expresión de fosfatasas y nucleasas, que parecen participar en la movilización de fósforo entre tejidos, aunque las primeras también participan en señales en cascada que modifican el metabolismo, bajo deficiencia de fósforo. Esta situación también altera la relación de fosfolípidos a sulfolípidos en la membrana del tilacoide, algo que se apoya por aumento de la expresión de los genes SQD1 y SQD2 que participan en la síntesis de los sulfolípidos (Hammond et al., 2004).

El análisis energético de la FBN y la asimilación de nitrógeno muestra que la FBN es un proceso más caro desde este punto de vista. Esto lleva a proponer mayores demandas de fósforo cuando se realiza FBN. Los bacteroides resuelven esto, en parte, aumentando la captación del medio fosfato soluble como  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  y  $\text{HPO}_4^{2-}$  a través de transportadores inducibles de

mayor afinidad que además se asocia a la síntesis de enzimas que tienen la capacidad de hidrolizar grupos fosfatos de moléculas del citoplasma de la célula infectada. Estas enzimas se denominan en conjunto fosfatasa (Taiz and Zeiger, 2002).

## **1.5 AZUFRE**

### **1.5.1 Asimilación del azufre en plantas**

El azufre de las plantas proviene, en zonas con escasa polución ambiental, fundamentalmente del suelo. En regiones industrializadas el dióxido de azufre ( $\text{SO}_2$ ) puede ser captado por la planta a través de las hojas (Leustek et al, 2000; citado por Kopriva, 2006). En suelos bien oxigenados el azufre se encuentra fundamentalmente como ion sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ )(S: +6). Este es captado por las células de la raíz mediante transportadores. Estos se clasifican en 5 grupos, donde el 1 incluye a los transportadores de alta afinidad que son los responsables primarios de la captación del sulfato del suelo, el grupo 2 incluye a los de baja afinidad que se encuentran en la membrana de las células del xilema – floema y por tanto participan en la distribución del sulfato en la planta, los del grupo 4 se ubican en la membrana de la vacuola y tienen como fin regular la concentración de sulfato de la célula. Menos conocidos son los del grupo 3 y 5., aunque uno del grupo 3 se ha asociado a las células vegetales de los nódulos fijadores de nitrógeno (Kopriva, 2006).

El sulfato es transportado vía xilema a las hojas donde es reducido y asimilado, utilizando el elevado contenido de ATP y poder reductor derivado de la fotosíntesis. El átomo de azufre reducido se encuentra formando grupos tioles (-SH) (S:-2) de moléculas orgánicas, siendo las más importantes: metionina y cisteína que forman las proteínas, glutatión (GSH) que participa como protector de procesos oxidativos y fuente de azufre, coenzimas como Tiamina, Biotina y Coenzima A que participan en el metabolismo de los lípidos y de la respiración celular. Una parte queda sin reducir y pasa a formar sulfolípidos y heteropolisacáridos (Azcón-Bieto y Talón, 2000). La cisteína es el primer producto de la vía de asimilación del sulfato en las plantas, siendo luego

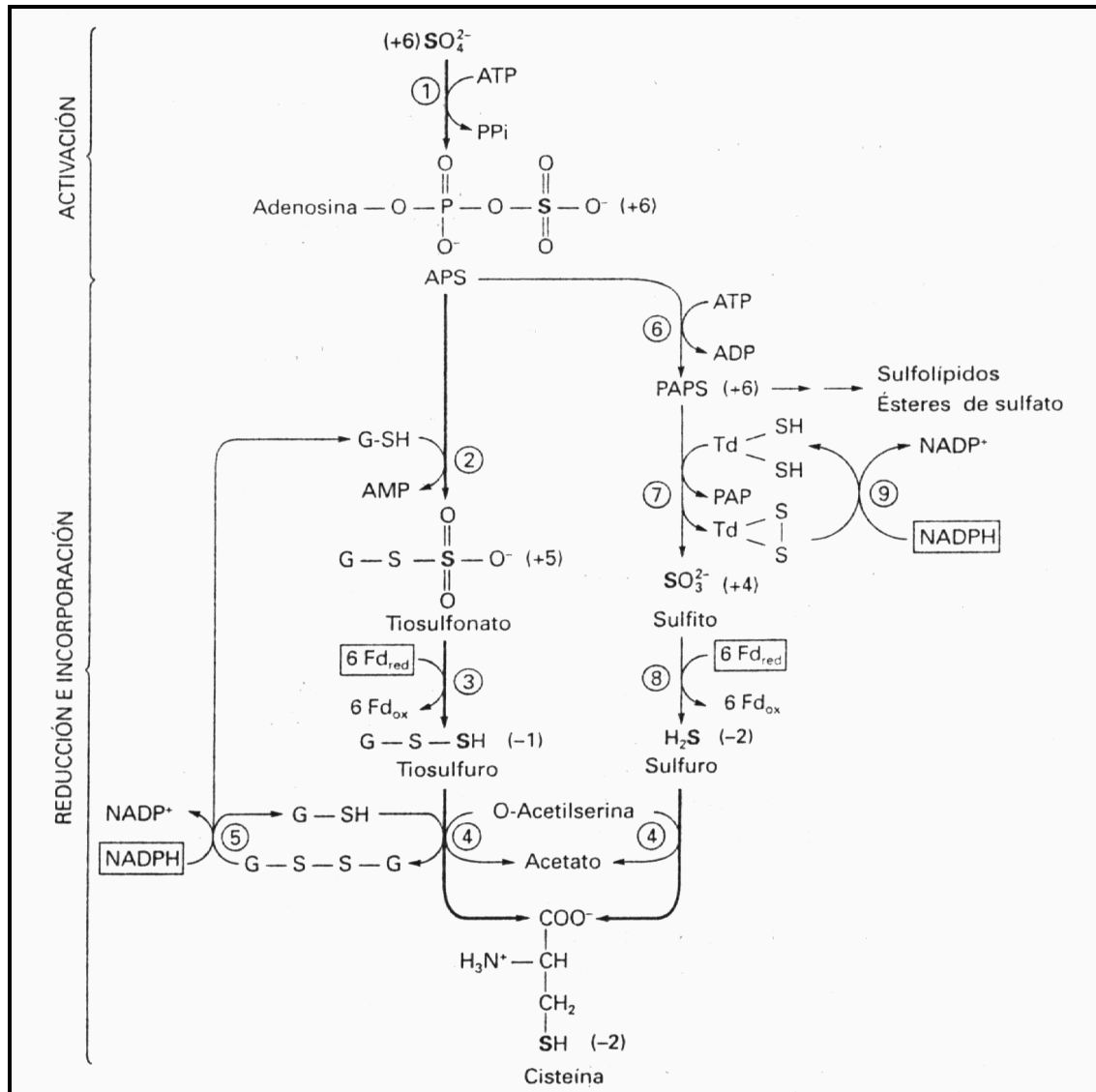
metabolizado a GSH, principalmente. Ambos metabolitos son producto de una estrecha interrelación entre la fotosíntesis, la asimilación del nitrógeno, y la de azufre (Leustek et al, 2000; Brunold et al, 2003; citado por Kopriva and Rennenberg, 2004). El sulfato captado del medio es activado por ATP mediante la enzima ATP-sulfurilasa y formar 5'-denosinfosulfato (APS), siendo este reducido a sulfito por la APS reductasa (APR) siendo el GSH el donador de los electrones (tiosulfonato (S: +5)). El sulfito es reducido por una sulfito reductasa dep-ferridoxina (SiR) a un tiosulfuro que nuevamente reacciona con el GSH para formar cisteína y GSSG. En esta vía se consumen ocho (8) electrones, 6 aportados por la ferredoxina y 2 por NADPH para reducir el glutatión oxidado. Esta vía opera en organismos superiores, mientras que en los procariontes y hongos, se tiene una reducción por intermediarios libre. El azufre del APS se activa mediante ATP para formar fosfoadenosin fosfosulfonato (PAPS) que actúa como donador de grupos sulfato en sulfolípidos y ésteres de sulfato o reducirse para pasar de sulfato a sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) y liberar PAP, seguidamente el sulfito pasa a sulfuro ( $\text{H}_2\text{S}$ ) para luego reaccionar con la o-acetilserina (OAS) para formar cisteína (Azcón-Bieto y Talón, 2000, Kopriva, 2006). La figura 8 muestra la asimilación del sulfato. La cisteína es utilizada para la síntesis de metionina, participando en la síntesis de proteínas; glutatión (GSH), un péptido que participa en procesos redox, como molécula transportadora y donador de azufre reducido.

### **1.5.2 Funcionalidad metabólica del azufre**

La cisteína es metabolizada para actuar como fuente de azufre reducido para la síntesis de metionina, centros de hierro – azufre (nitrogenasa, etc), metabolitos secundarios y cofactores como la coenzima-A. El sulfito intermediario de la vía de asimilación puede ser utilizado para la síntesis de sulfolípidos que son esenciales componentes de las membranas del cloroplasto (Sanda et al., 2001; citado por Kopriva, 2006). Aunque la reducción del sulfato es generada en los plastos, la síntesis de cisteína se produce en todo compartimiento donde se produzca síntesis de proteínas, mitocondria, citoplasma y plastos como cloroplasto (Leustek et al., 2000).



Figura 8. Asimilación del sulfato.

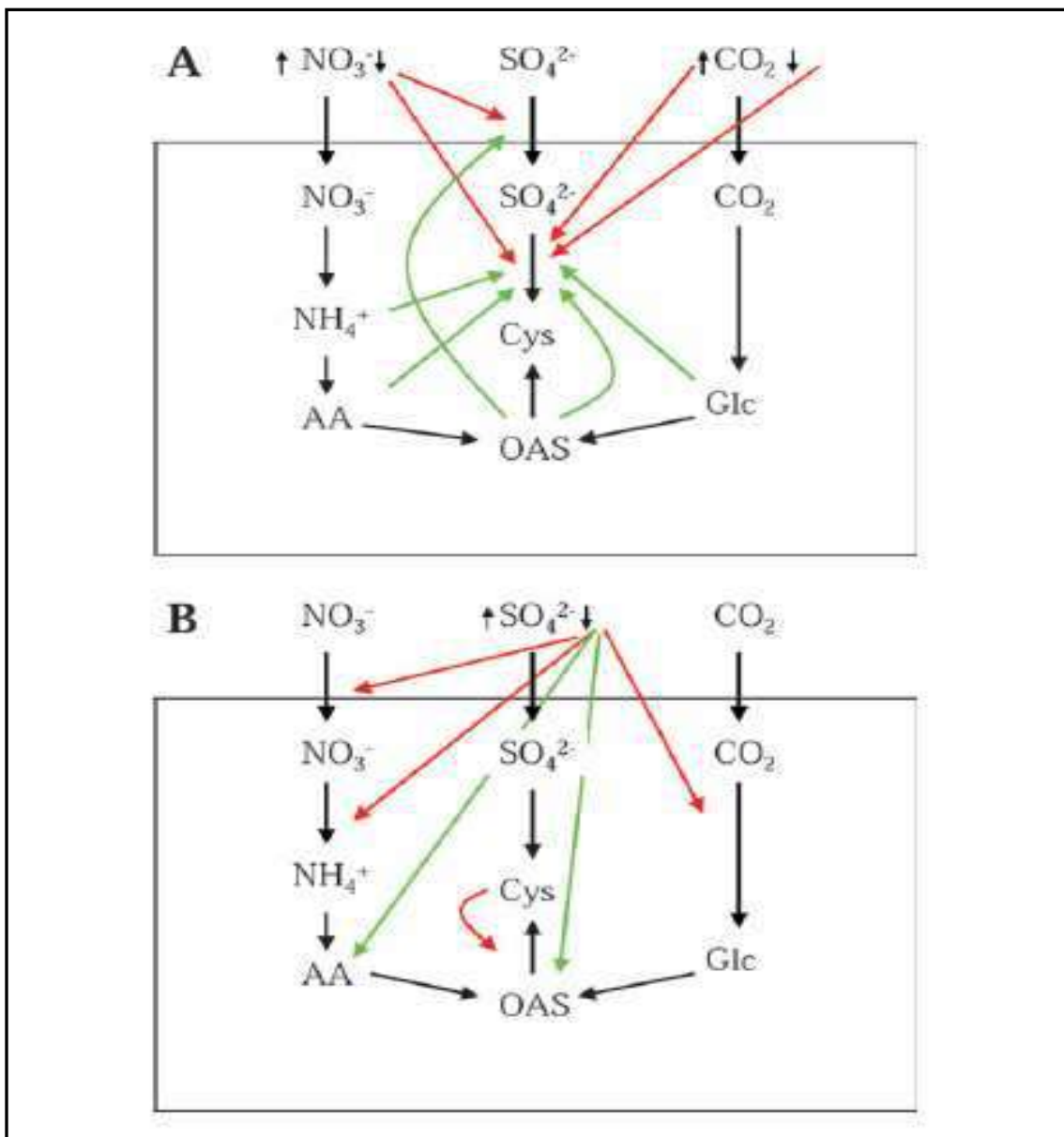


Fuente: Azcón-Bieto y Talón, 2000.

La intervención de compuestos con nitrógeno y carbono en la asimilación del azufre plantea la necesidad de evaluar interregulaciones entre los metabolismos de estos elementos. En el esquema de la figura 9 se representa la interacción entre la asimilación de S, N y C. La figura 9-A muestra la regulación de la captación y asimilación del sulfato por la asimilación del N y C. Los aumentos de nitrógeno en forma de nitrato plantea aumentos de la asimilación del azufre al igual que el aumento de la concentración de carbono reducido como glucosa proveniente de la fijación del carbono. Uno de los principales reguladores de la asimilación del sulfato es la o-acetilserina, siendo

razonable pensar esto al evaluar su biosíntesis, ya que participan compuestos provenientes del metabolismo del nitrógeno y carbono. La figura 9-B muestra la regulación de la captación y asimilación del C y N por la disponibilidad de azufre y compuestos derivados. La flecha roja se representa la vía metabólica reprimida y las verdes marcan la inducción del proceso o incremento del metabolito (AA aminoácidos libres; Glc, glucosa). Cuando el sulfato está en baja concentración se reprime la captación de nitrato y su reducción, como también la fijación del carbono.

Figura 9. Interacción regulatoria entre los metabolismos el C, N y S.

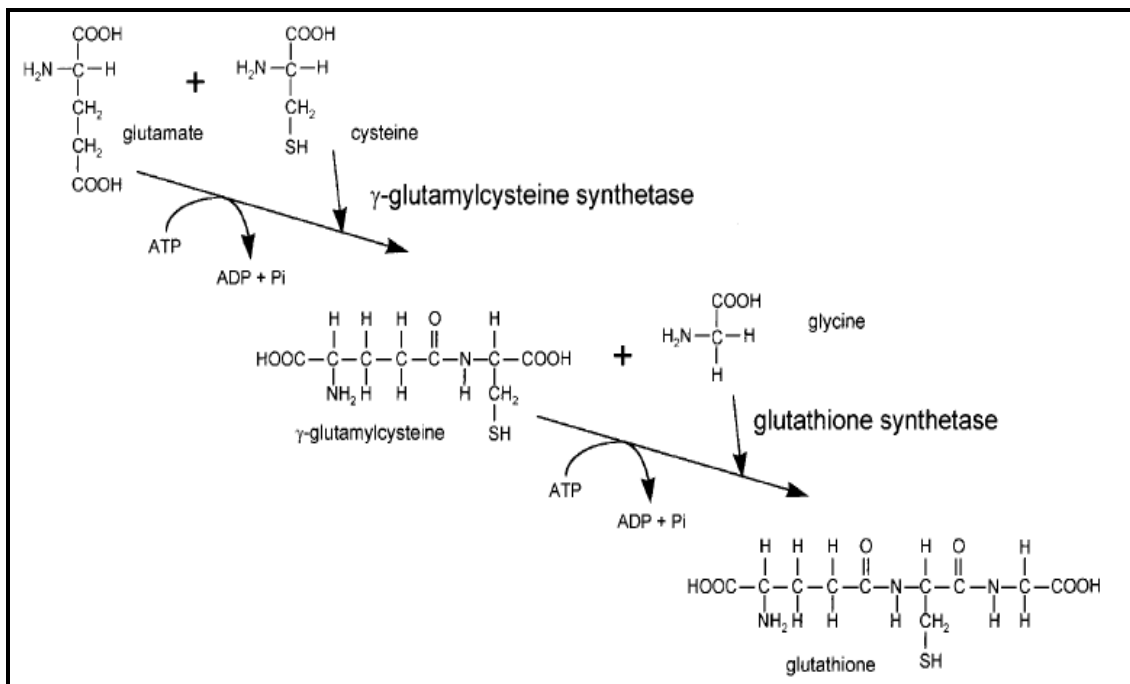


Fuente: Kopriva and Rennenberg, 2004.

### 1.5.3 Síntesis y regulación del glutatión

El GSH es encontrado tanto en células procariontas y eucariotas, siendo el mayor pool de azufre reducido no proteico (Kunert and Foyer, 1993). La forma reducida del GSH es un tiol tripéptido con fórmula  $\gamma$ -glu-cys-gly. La vía biosintética se muestra en la figura 10 donde se tienen dos reacciones en secuencia que utilizan ATP para formar primero  $\gamma$ -glutamilcisteína al reaccionar L-glutamato con L-cisteína y en la segunda reacción se incorpora la L-glicina al resto ácido del dipéptido  $\gamma$ -glu-cys (Meister, 1988). Estas reacciones son catalizadas por  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa ( $\gamma$ -ECS) y glutatión sintetasa (GS) (citado por Graham et al, 1998).

**Figura 10. Síntesis del glutatión (GSH)**

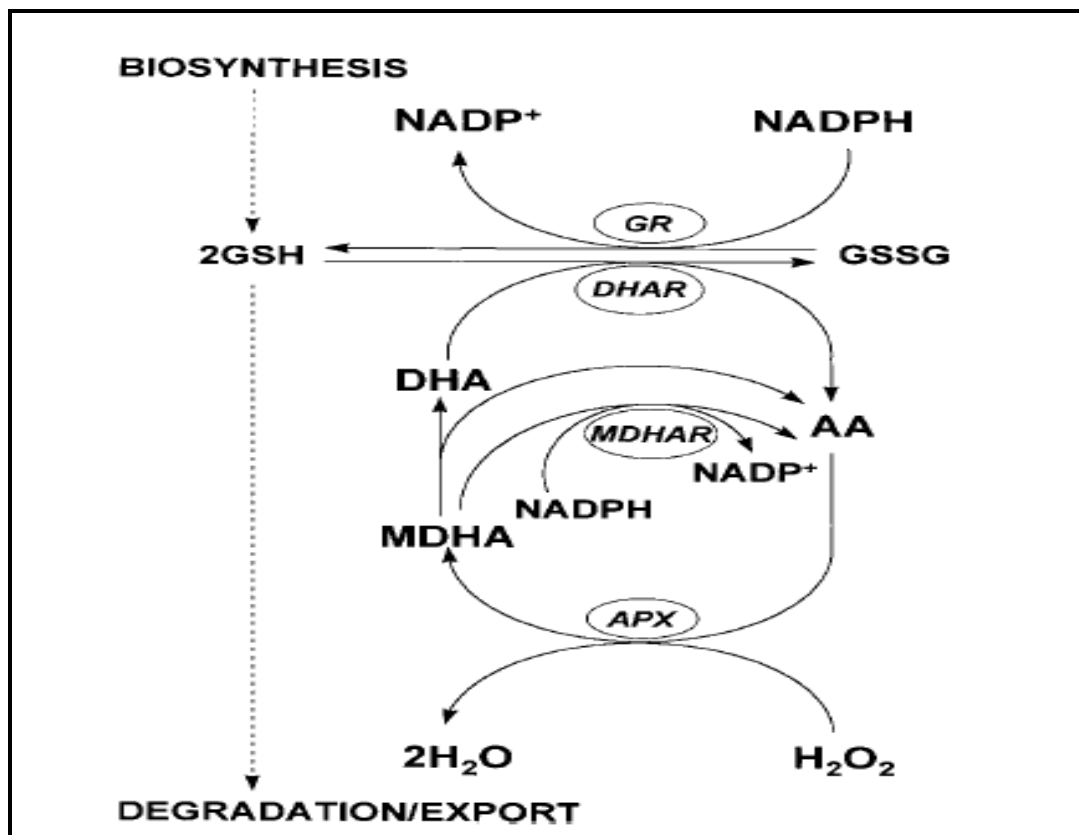


Fuente: Graham et al.; 1998.

El GSH posee numerosas funciones fisiológicas entre las que se encuentran ser una forma de almacenar el azufre reducido. El glutatión regula la expresión génica, es precursor de fitoquelatinas, que ligan metales pesados a concentraciones superiores de las óptimas, y es sustrato de las GSH S-transferasas, que catalizan la conjugación del GSH con xenobioticos tales como herbicidas. GSH puede estar involucrado en la regulación redox de los procesos celulares. Mediante el grupo tiol con propiedades redox, GSH se

considera que juega un rol muy importante en procesos oxidativos que se desarrollan en la planta. En todas las células el GSH se encuentra en forma oxidada como un dímero de GSH donde un puente disulfuro liga los tripeptidos (glutathion disulfuro: GSSG). Mediante la glutatión reductasa (GR) que usa NADPH se reduce el GSSG a GSH, vasta cantidad de radicales libres pueden oxidar al GSH a GSSG (Fig. 11). Siendo la concentración del GSH en el estroma del cloroplasto alrededor de 5 mM, el GSH puede funcionar como un buffer redox, previniendo la inactivación de enzimas al poseer grupos tioles reactivos. Se ha demostrado que el GSH presenta especificidad para mantener el pool de ascorbato mediante la reducción de dehidroascorbato (DHA) que se forma en procesos redox celulares. En los tejidos celulares la reacción es catalizada por la dehidroascorbato reductasa (DHAR). Existen otros tipos de enzimas que catalizan la reducción del DHA, como son la glutarredoxinas (tioltransferasas) y disulfuroisomerasas. Durante el estrés oxidativo desarrollado por inhibición o deficiencias de la catalasa y/o exposición a ozono, se acumula GSH (Graham et al, 1998).

Figura 11. Sistema redox GSH-NADH-AA



Fuente: Graham et al; 1998.

#### 1.5.4 Funcionalidad metabólica del azufre en la simbiosis

El azufre y compuestos azufrados juegan un rol muy importante en el establecimiento y funcionalidad de la simbiosis. La adición de azufre al suelo aumenta de manera importante el crecimiento y FBN en arveja. Las leguminosas son las únicas plantas que contienen cantidades significativas de homoglutación (hGSH), molécula análoga a GSH, que contiene  $\beta$ -alanina sintetizada por la enzima hGSH sintasa distinta a la GSHS. Los nódulos son órganos donde se encuentran altas cantidades de GSH y/o hGSH debido a que cumplen el rol de proteger a la nitrogenasa de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Matamoros et al., 2003). Sin embargo GSH y hGSH son importantes para establecer la simbiosis. Al reducir el contenido de GSH y/o hGSH por el uso de anticuerpos contra las enzimas que los producen o por inhibición mediante el uso de butionina silfoximina se reduce drásticamente la formación de nódulos. Además las bacterias requieren de GSH. Mutantes de *Sinorhizobium* para  $\gamma$ -ECS fueron incapaces de nodular plantas huésped al no expresar GSHS, llevando a un reducido crecimiento, retardando y deformando el desarrollo de los nódulos y reduciendo la capacidad para fijar nitrógeno. Por otra parte, mutantes de *Rhizobium* incapaces de reducir sulfato y nitrato debido a la falta de expresión del gen de sirohemo sintasa y con disfuncional sulfito y nitrato reductasa, son capaces de crecer en el suelo pero si de formar nódulos funcionales. Por lo tanto esto parece indicar que los rizobios son capaces de tomar y utilizar cisteína pero no GSH. La importancia de azufre para la funcionalidad del nódulo fue posteriormente corroborada por análisis de mutantes de *Lotus sym* con nódulos no funcionales. La clonación de genes mutantes para sym13 y sym81 muestra síndrome de deficiencia de nitrógeno bajo simbiosis pero no en forma libre en el crecimiento, formando nódulos pequeños con reducida cantidad de nitrogenasa y capacidad nitrogenasa. En ambos casos existe deficiencia del transportador SST1, transportador del grupo 3 expresado en nódulos específicos y localizados en la membrana del simbiosoma. Así, de manera interesante se detecta un transportador de sulfato que es esencial para el metabolismo del nitrógeno pero no para la nutrición del azufre. Sin embargo este potente fenotipo sym del mutante sst1 es suprimido a un mínimo por la expresión de un transportador específico de sulfato de

nódulos de *Lotus*. En suma, la reducción del contenido total de azufre de 20-25% en el tipo mutante comparado con el silvestre puede difícilmente explicar la drástica disminución de la fijación de nitrógeno en plantas pudiendo reducir el contenido de azufre por arriba del 70 % por fuera de cambios en el fenotipo (Kopriva, 2006).

## 1.6 BORO

### 1.6.1 Boro en el suelo y su participación fisiológica en la planta

El boro del suelo se presenta como ácido bórico ( $H_3BO_3$ ) y borato ( $H_2BO_3^-$ ), siendo ambas formas absorbibles por la raíz. En solución acuosa de  $pH < 7$  se presenta como ácido bórico ( $H_3BO_3$ ) mientras que a  $pH$  mayores aumenta la concentración de la especie  $H_2BO_3^-$ . El mecanismo de absorción aún no está totalmente claro. Se reconocen tres áreas de acción del boro: organización celular, funcionalidad de la membrana celular y metabólica (Bolaños, 2004). El boro participa en el metabolismo de la glucosa al regular la conexión entre la glucólisis y la vía de las pentosas fosfato; la deficiencia favorece esta última (Azcón-Bieto y Talón, 2000). Este elemento no es constituyente de enzimas ni afecta directamente la actividad de enzimas. El ácido bórico forma complejos muy estables con compuestos orgánicos que tienen grupos hidroxilos (-OH) en configuración *cis*, grupos *cis-diol*. Entre los compuestos que participan se encuentran varios glúcidos, ácidos urónicos u o-difenoles. La participación del boro en fuertes complejos en la pared celular explica las diferencias en requerimientos de las diferentes especies de plantas. Esto ha llevado a considerar a este elemento como un nutriente externo a la célula. Sin embargo, actualmente se estudian posibles funciones más directas en el interior celular. Las deficiencias de Boro se asocian con cambios químicos y estructurales de la pared celular. La pared celular del meristema apical de las raíces muestra un engrosamiento y se caracteriza por un incremento de la hemicelulosa y pectina, y una deposición irregular de agregados vesiculares

que contienen fracciones de membrana celular. Además, gran proporción de glucosa es incorporada al polímero  $\beta$ -1, 3-glucano, calosa.

La formación de complejos de boro con ciertos glúcidos y fenoles puede explicar cambios en las vías metabólicas de tejidos deficientes en boro, tales como aumentar el flujo de metabolitos a través de la vía de las pentosas fosfato, aumento de la formación de quinonas e inhibición de la síntesis de lignina. Así, se acumulan quinonas, semiquinonas y radicales libres a expensas de precursores de síntesis de lignina. Esto puede explicar la rápida disminución de la elongación celular durante el crecimiento en deficiencia en boro. La inhibición del crecimiento celular en tejidos deficientes de boro puede deberse a una alteración de la funcionalidad de la membrana por quinonas reactivas o disminución del ácido indol acético (AIA) que difunde por aumento de la oxidación (Bolaños et al., 2004). En contraste con el proceso anterior la inhibición del crecimiento puede deberse a un aumento del AIA. Esto se sostiene por la observación de los similares efectos que se tienen por la deficiencia de boro y niveles superiores a los óptimos del AIA. Sin embargo los cambios en la ultraestructura de la célula son diferentes en las dos situaciones precedentes. La deficiencia de boro disminuye la actividad de la ATPasa unida a membrana y se reestablece por adición del elemento. El boro también es importante para el transporte de potasio (K) que protege a la célula, por ejemplo en la funcionalidad estomática. Los solutos se difunden a través de la membrana celular por deficiencia del elemento. Así, la deficiencia de boro afecta la integridad de la membrana y su potencial (Römheld and Marschner, 1991).

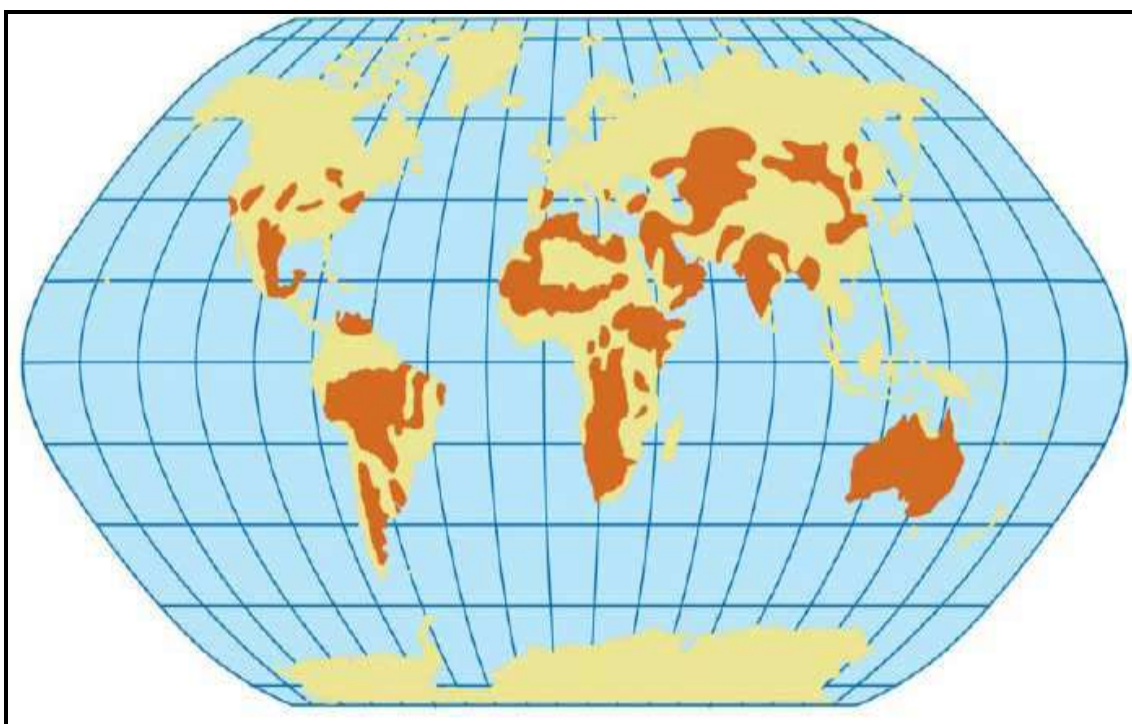
Se ha demostrado la esencialidad de este elemento en el desarrollo y funcionalidad de la simbiosis leguminosa-rhizobium. La deficiencia de boro se correlaciona con una disminución de la actividad nitrogenasa, explicándose por la alteración de la estructura de la pared y membranas de las células que causa la deficiencia del boro aumentando la permeabilidad al oxígeno (O<sub>2</sub>) que inhibe la nitrogenasa (Bolaños et al., 1994). Rogério de Azevedo *et al.* determinaron máxima actividad nitrogenasa y masa fresca de nódulo a nivel de 200 ppb de B en la solución de riego para *P. sativum*. Teniendo en cuenta la relación que existe entre la actividad nitrogenasa y actividad GS-GOGAT se puede pensar en una disminución de la actividad de estas enzimas de forma indirecta.

## 1.7 ZINC

### 1.7.1 El zinc en el suelo y su absorción por la planta

El zinc se encuentra en el suelo como  $Zn^{2+}$  en suelos ácidos mientras que en básicos como óxido de zinc ( $ZnO$ ), hidróxido de zinc ( $Zn(OH)_2$ ), carbonato de zinc ( $ZnCO_3$ ) y complejado con ácidos orgánicos del suelo, diferentes especies de fosfatos y óxidos del hierro, entre las formas más importantes. Estas especies establecen un equilibrio dinámico con el  $Zn^{2+}$  donde la posición es función de diferentes factores como el pH, concentración de ligandos y materia orgánica del suelo, alterando la concentración del ion libre. La figura 12 muestra la deficiencia del zinc a nivel mundial por combinación de diferentes factores, lo que asociado a la reducción de la contaminación mundial en países industrializados o transporte de nutrientes por exportación de agroalimentos en países con economía de base agroalimentaria hacen que los suelos queden más desprovistos de este elemento.

Figura 12. Distribución mundial de suelos asociados con deficiencias de zinc.



Fuente: Alloway, 2004.



El zinc parece que se absorbe a través de la raíz primaria como  $Zn^{2+}$  mediante la unión a una proteína de alta afinidad. También se ha propuesto la formación de quelatos de zinc con aminoácidos no proteicos denominados fitosideroforos o fitometaloforos que lo transportan a través de la membrana de las células de la raíz. La disponibilidad del zinc en suelos ácidos. Cuando la concentración de zinc en la solución del suelo es baja la captación es controlada por el metabolismo. Existe una intensa interacción entre el zinc y otros nutrientes como el cobre donde existe una mutua inhibición indicando que ambos deben ser absorbidos por un transportador similar.

## **1.7.2 Funcionalidad metabólica del zinc en la planta**

### **1.7.2.1 Metabolismo de los carbohidratos**

El zinc afecta indirectamente al metabolismo de los carbohidratos a través de su relación con la fotosíntesis y transformaciones de los azúcares. La deficiencia de zinc reduce la fotosíntesis entre un 50 – 70 % dependiendo del tipo de planta y de la severidad de la deficiencia, siendo explicado por la participación de este elemento en la actividad enzimática de la anhidrasa carbónica. Las plantas C3 como alfalfa suelen presentar menor sensibilidad a las deficiencias de Zinc, al parecer debido a un mecanismo de fotosíntesis y fijación del  $CO_2$  más básico, ciclo de Calvin – Benson solamente, que las C4. El zinc también participa en la actividad de enzimas como la ribulosa 1,5 bifosfatocarboxilasa (RuBPC) que cataliza la etapa inicial de la fijación del  $CO_2$ . La reducción de la fotosíntesis también puede deberse al funcionamiento anormal de la molécula de clorofila por la deficiente estructura del cloroplasto. En relación a la formación del almidón y sacarosa las deficiencias de zinc causan una caída de la actividad de la sacarosa sintetasa llevando a una acumulación de precursores en la hoja y reducción del flujo de sacarosa desde los tejidos fotosintéticos hacia los no fotosintéticos como raíz y nódulos, también parece estar afectado por la alteración de las membranas de las células del floema (Alloway, 2004; Broadley et al., 2007).

### **1.7.2.2 Metabolismo de las proteínas**

La síntesis de proteína se ve afectada negativamente por la deficiencia de zinc debido a la reducida cantidad de ácido ribonucleico (ARN), malformación y reducida cantidad de ribosomas. La reducida cantidad de ARN puede deberse a una reducida actividad de la enzima RNA polimerasa como al efecto protector de este efecto sobre el ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) del ataque de la ribonucleasa, siendo la actividad ribonucleasa un buen indicador la deficiencia de zinc. En tejidos de platas cultivadas en deficiencias de zinc se ha encontrado hasta siete veces mas cantidad de aminoácidos que en plantas control donde el zinc está en niveles normales y en forma inversa para la cantidad de proteína, revirtiéndose cuando se suplementa con zinc (Alloway, 2004; Azcón-Bieto y Talón, 2000; Taiz and Zeiger, 2002; Broadley et al., 2007).

### **1.7.2.3 Integridad de la membrana**

El zinc cumple un rol fisiológico en la integridad y funcionalidad de la membrana, algo probado mediante las determinaciones de exudados de raíz. El zinc establece interacciones entre grupos polares de fosfolípidos y entre grupos sulfidrilos de las proteínas de la membrana, contribuyendo así a la estabilidad de ésta (Römheld and Marschner, 1991). Este elemento también puede participar en la protección de la membrana al eliminar especies reactivas de oxígeno. Las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa son zinc dependientes y participan en la protección de la célula frente a especies reactivas de oxígeno. El Zinc es componente de las isoenzimas SOD que participan en la detoxificación de radicales superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) a través de la formación de agua oxigenada ( $H_2O_2$ ) y junto a la catalasa, otra enzima Zinc dependiente que transforma el  $H_2O_2$  en agua ( $H_2O$ ), reduce los niveles de este oxidante que por reacciones estabilizantes genera el radical hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ ). Ambos radicales tienen la capacidad de iniciar la peroxidación lipídica de componentes grasos insaturados de las membranas biológicas alterando su integridad y selectividad en cuanto al flujo de metabolitos. Disminuidos niveles de actividad de estas dos enzimas se encuentran en situaciones de deficiencias de zinc. Otros elementos que ayudan a mantener la estabilidad de la membrana celular son el fósforo, boro, manganeso y calcio; junto al calcio

son dos elementos que en estados de deficiencia no pueden ser revertidos (Alloway, 2004; Broadley et al., 2007).

#### **1.7.2.4 Metabolismo de las hormonas**

El zinc participa en la síntesis y degradación de los factores de crecimiento auxinas, básicamente el ácido indol acético (AIA). Sin embargo el aumento de la concentración de triptofano, precursor de esta hormona, se asocia con la inhibición de la síntesis proteica más que por un deterioro del metabolismo del AIA. Además, el metabolismo de las giberelinas (GA) se muestra deteriorado en deficiencias de Zinc (Alloway, 2004).

#### **1.7.2.2 El zinc en la simbiosis rizobio - leguminosa**

Se ha reportado la acción de este elemento en la organogénesis del desarrollo del nódulo (Frugier et al., 2000) y en el crecimiento de la raíz de la planta y control de factores de tolerancia (Wissuwa M y col, 2006).

## **1.8 Deficiencia de los suelos**

Los aumentos de los rendimientos originados por los mejoramientos genéticos como nuevas técnicas de labranza han generado no menos de un aumento del 40% en la producción de alfalfa. Si esto se asocia a la exportación de la producción ya sea en forma de fardos o a la producción intensiva como tambos, feed-lots o semi feed-lots que no devuelve al campo los nutrientes, sino que los concentra en el área de producción, es de esperar que los suelos comiencen a presentar carencias en micronutrientes como alguna vez paso con los macronutrientes que hoy se deben resolver con fertilización. De hecho actualmente se investiga la fertilización con micronutrientes en otros cultivos (Melgar RJ et al., 2001).

El nitrógeno necesario para incrementar la productividad de los cultivos puede incorporarse en forma de nitratos, pero la alta solubilidad en agua y carga negativa, lo que le impide ser adsorbido a las partículas de arcilla del suelo, hace que se pierda en mantos de aguas superficiales y subterráneas generando problemas de eutrofización y de riesgos para la salud al llegar a

aguas de consumo. A demás, el proceso de fijación industrial requiere considerables cantidades de energía. Así, asociando la crisis energética y la problemática de contaminación mundial se justifica la investigación en favor de la fijación biológica de nitrógeno (Madigan et al., 2004; Taiz and Zeiger, 1998).

## 2 OBJETIVOS

El objetivo de esta tesis es establecer las relaciones existentes entre fósforo, azufre, boro y zinc para la cual se logra la mayor respuesta en la simbiosis *Sinorhizobium meliloti-Medicago sativa*. Las cuales serán evaluadas mediante la cuantificación de la expresión de las enzimas GS-GOGAT, mecanismo que media el transporte del producto de la fijación de nitrógeno:  $\text{NH}_4^+$  y que como se deduce de la introducción depende de un amplio numero de factores, entre ellos los macro y micronutrientes, y su disposición adecuada para su asimilación por la planta mediante los mecanismos funcionales que los regulan.

### 3 MATERIALES Y METODO

#### 3.1 Desarrollo y cultivo de las plantas.

##### 3.1.1 Esterilización y germinación de las semillas.

Se utilizarán semillas de alfalfa PALAVERSICH grupo 7 estériles. Para lograr la esterilidad se sumergieron las semillas por 30 s en alcohol a 70%, luego 3-4 min. en HgCl<sub>2</sub> al 10% y finalmente cinco (5) lavados con agua estéril. Estas semillas estériles se germinaron en oscuridad sobre papel de filtro humedecido con agua estéril en placa de petris a 20 °C durante 72 h.

##### 3.1.2 Desarrollo del inóculo.

Se utilizo la cepa de Shizobium meliloti - B399, oficial de INTA en el momento del ensayo. La composición del medio de inoculación se presenta en la tabla 6.

Tabla 6. Composición del medio de cultivo para *S. meliloti* B399.

| Nutriente                            | Concentración  |
|--------------------------------------|----------------|
| Sacarosa                             | 5.00 g/L       |
| Extracto de Levadura                 | 2.00 g/L       |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      | 0.50 g/L       |
| MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O | 0.20 g/L       |
| NaCl                                 | 0.50 g/L       |
| KNO <sub>3</sub>                     | 0.80 g/L       |
| MnSO <sub>4</sub> 4 H <sub>2</sub> O | 0.10 mL (10 %) |
| FeCl <sub>3</sub>                    | 0.10 mL (10 %) |
| pH                                   | 6.8            |

Fuente: elaboración propia.

El medio se esterilizó en autoclave por 20 min a 121 °C. Se prepararon dos inóculos de 50,00 mL en erlenmeyer de 250 que se inocularon con una

anzada de *S. meliloti* B399 de medio de mantenimiento. Esto inóculos se mantuvieron por 48 h en agitador rotatorio a 250 rpm y 2.5 cm de excentricidad, en cuarto termostatzado a 28-30 °C.

### 3.1.3 Desarrollo de Medio de cultivo para hidroponía controlando la concentración de azufre, boro, fósforo y zinc.

Para el cultivo en hidroponia se utilizó el medio de Norris y Date (1976) para leguminosas forrajeras según CIAT. La composición de este medio se presenta en la tabla 7.

Tabla 7. Composición del medio de cultivo para cultivo en hidroponía de plantas de alfalfa.

| Reactivo  | Concentración (g/L) | Conc. Nutr. (ppm) | mL de Slc. Stock |
|---|---------------------|-------------------|------------------|
| <b>MACRONUTRIENTES</b>  |                     |                   |                  |
| KCl   | 29.8                | -----             | 2.5              |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>   | 69.6                | 12.386            | 2.5              |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O  | 98.6                | 12.811            | 2.5              |
| <b>MICRONUTRIENTES</b>  |                     |                   |                  |
| Cu SO <sub>4</sub> 5 H <sub>2</sub> O   | 0.078               | 20                | 0.50             |
| <b>Zn</b> SO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O                                      | 0.22                | 50                | 0.50             |
| Mn SO <sub>4</sub> 4 H <sub>2</sub> O   | 2.03                | 500               | 0.50             |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>  | 1.43                | 250               | 0.50             |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> 4H <sub>2</sub> O | 0.01                | 0.78              | 0.50             |
| CaCl <sub>2</sub>   |                     | 80                |                  |
| Citrato de Hierro(III)  | 1.795               |                   | 1.00             |

Fuente: elaboración propia.

Se preparo una solución que contenía los micronutrientes Cobre (Cu), Manganeso (Mn) y Molibdeno (Mo) en las concentraciones estipuladas por el medio de Norris. Los restantes nutrientes (Zn, B, P y S) se prepararon en forma individual. Todas las soluciones se esterilizaron a 121 °C – 20 min.

### 3.1.4 Diseño experimental

Para analizar la interacción de los nutrientes a analizar se desarrollo un ensayo de 16 tratamientos de acuerdo a un análisis factorial de cuatro (4) factores y dos (2) niveles, indicándose como máxima (+) y mínima (-). El nivel de máxima para azufre y fósforo corresponde a un agregado de un 100 % mas y los de mínima corresponden a un 80% de lo que se establece en el medio de base utilizado para el cultivo en hidroponia. Para boro y zinc se establecen niveles de maxima que no causen toxicidad y los de mínima corresponden a no adición de este nutriente en el medio de cultivo de hidroponía. Los tratamientos a desarrollar presentan una combinación de los nutrientes en estudio como la que puede observarse en la tabla 8.

**Tabla 8. Tratamientos a realizar de acuerdo a las combinaciones de cuatro factores a dos niveles cada uno.**

| <b>Tratamiento</b> | <b>P</b> | <b>S</b> | <b>B</b>  | <b>Zn</b> |
|--------------------|----------|----------|-----------|-----------|
| <b>1</b>           | + 45 ppm | + 45 ppm | + 179 ppb | + 36 ppb  |
| <b>2</b>           | + 45 ppm | + 45 ppm | + 179 ppb | -         |
| <b>3</b>           | + 45 ppm | + 45 ppm | -         | + 36 ppb  |
| <b>4</b>           | + 45 ppm | + 45 ppm | -         | -         |
| <b>5</b>           | + 45 ppm | - 17 ppm | + 179 ppb | + 36 ppb  |
| <b>6</b>           | + 45 ppm | - 17 ppm | + 179 ppb | -         |
| <b>7</b>           | + 45 ppm | - 17 ppm | -         | + 36 ppb  |
| <b>8</b>           | + 45 ppm | - 17 ppm | -         | -         |
| <b>9</b>           | - 17 ppm | + 45 ppm | + 179 ppb | + 36 ppb  |
| <b>10</b>          | - 17 ppm | + 45 ppm | + 179 ppb | -         |
| <b>11</b>          | - 17 ppm | + 45 ppm | -         | + 36 ppb  |
| <b>12</b>          | - 17 ppm | + 45 ppm | -         | -         |
| <b>13</b>          | - 17 ppm | - 17 ppm | + 179 ppb | + 36 ppb  |
| <b>14</b>          | - 17 ppm | - 17 ppm | + 179 ppb | -         |
| <b>15</b>          | - 17 ppm | - 17 ppm | -         | + 36 ppb  |
| <b>16</b>          | - 17 ppm | - 17 ppm | -         | -         |

Fuente: elaboración propia.

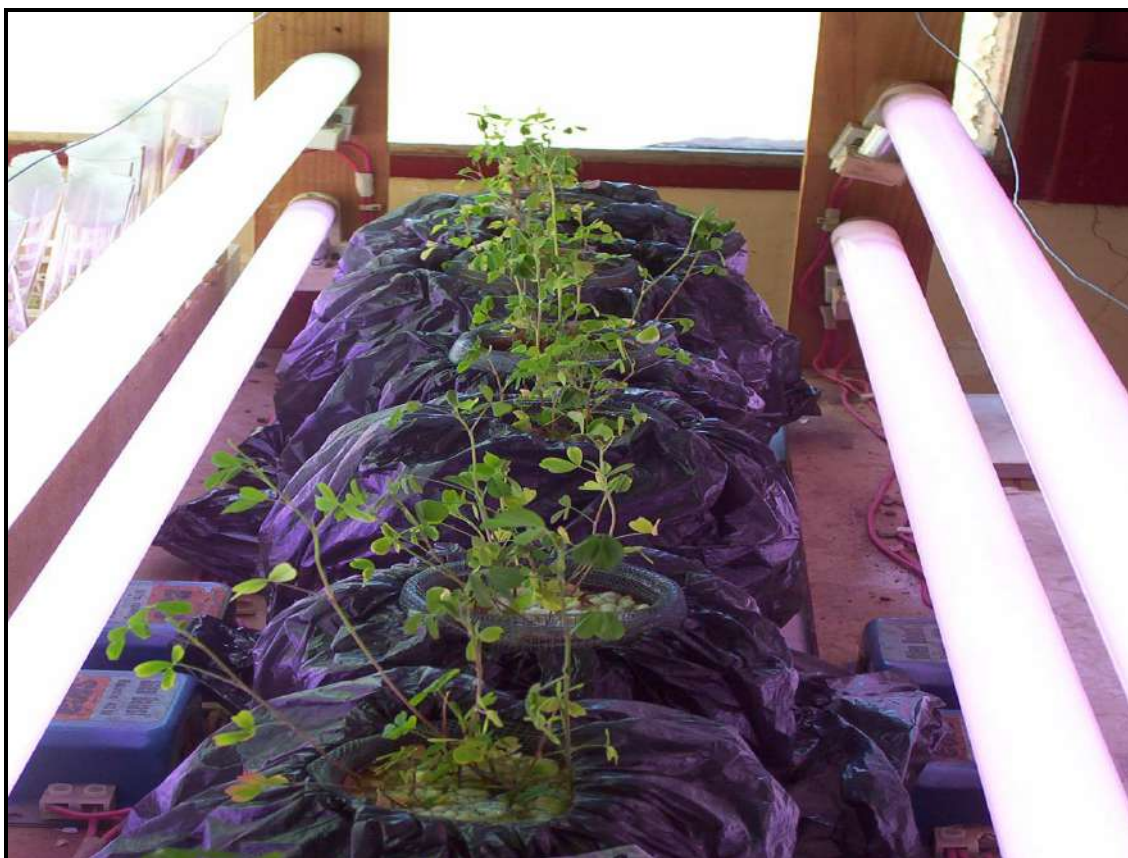


### 3.1.5 Cultivo de las plántulas y recolección.

Las plántulas se transfirieron a mayas plásticas (colador) a razón de 10 por maya sobre un soporte sólido de vermiculita estéril. Los tratamientos se mantuvieron en cámara con fotoperiodo de 16 h y temperatura de 20 y 25 °C para noche y día respectivamente. Como fuente de iluminación se utilizaron lámparas fluorescentes Growlux de 250 Watt.

El sistema de cultivo en hidroponía se puede apreciar en la figura 13.

Figura 13. Sistema de cultivo.



Fuente: elaboración propia

La inoculación se realizó el mismo día del transplante a los coladores, utilizándose 500  $\mu\text{L}$  de inóculo ( $10^8$  cel / mL) de *S. meliloti* B399 por plántula. La solución de cada tratamiento se renovó totalmente cada siete (7) días.

A los cuarenta y cinco (45) días de inoculado los tratamientos se descalzaron las plantas para proceder a recolectar los nódulos de cada

tratamiento. La masa de nódulo obtenida de cada tratamiento se mantuvo sobre papel de filtro húmedo a una temperatura de cuatro grados centígrados (4 °C) para luego proceder a determinar su masa fresca y posteriormente conservarlos en nitrógeno líquido (-40 °C) hasta el momento de la preparación del extracto enzimático o procesarlos de inmediato para obtener una solución de ensayo a partir de la cual se realizan las determinaciones enzimáticas y de proteína soluble.

La parte aérea de las plantas de cada tratamiento se colocó en sobres de papel masados previamente para luego proceder a determinar materia seca.

## **3.2 Determinación de actividades enzimáticas GOGAT – GS y proteína soluble.**

### **3.2.1 Preparación del extracto enzimático.**

La masa de nódulos de un tratamiento, mantenida en nitrógeno líquido (-40 °C) hasta el momento del procesamiento u obtenida hace instantes, se coloca en un mortero junto a la solución extractiva (SExt) y polivinilpirrolidona insoluble (PVPP) en relación 1 / 10 / 5 de Nd / SExt / PVPP respectivamente. Esta mezcla se macera con pilón hasta desmenuzamiento y luego se filtra a través de cuatro (4) gasas humedecidas en buffer de extracción. El filtrado obtenido se centrifuga a 32.000 g o máxima posible a 4 °C para lograr la solución de ensayo. Este procedimiento se repite con la masa nodular de cada tratamiento. El mortero, pilón, embudo, gasas y SExt se refrigeran para lograr mantener el macerado y filtrado a una temperatura de 4 °C durante el desarrollo del proceso. La composición de la solución extractiva (SEExt) se muestra en la tabla 9. La solución ensayo es utilizada para las determinaciones enzimáticas (Gonnet, 1994).

**Tabla 9. Composición de la solución extractiva.**

| <b>Componente</b>          | <b>Concentración</b> |
|----------------------------|----------------------|
| Buffer de fosfato potasico | 50 mM-pH 7.5         |
| Na-EDTA                    | 5 mM                 |
| KCl                        | 100 mM               |
| Sacarosa                   | 14.6 mM              |
| $\beta$ -mercaptoetanol    | 0.2 %                |
| pH                         | 7.6                  |

Fuente: Gonnet, 1994.

### **3.2.2 Determinación de proteína soluble**

El contenido de proteína soluble en las soluciones ensayo se realizo según lo propuesto por Bradford, 1976. Para esto preparó una curva de calibrado con 10 patrones de tres repeticiones cada uno, utilizando como proteína patrón la fracción IV de seroalbúmina bovina.

### **3.2.3 Determinación de la actividad GOGAT nodular**

La determinación de la actividad enzimática se realizó sobre un extracto enzimático siguiendo las propuestas por Gonnet, 1994.

La actividad NADH-GOGAT se basa en la siguiente reacción:



La actividad se evaluará mediante espectrometría UV-Visible siguiendo el decaimiento de la absorbancia de  $\beta$ -NADH a 340 nm. Para esto se realizan dos blancos, uno sin  $\alpha$ -cetoglutarato y otro sin glutamina, para utilizarse como blanco final aquel que presente mayor decaimiento.

Las soluciones de cada reactivo se preparan en los buffer de extracción sin  $\beta$ -mercaptoetanol. Este buffer se muestra en la tabla 10.

**Tabla 10. Soluciones para la determinación de la actividad GOGAT.**

| <b>Buffer de Ext.</b>     | <b>200 µL</b> |                  |
|---------------------------|---------------|------------------|
| α-cetoglutarato (12.5 mM) | 200 µL        | 0,0913 g /50 mL  |
| Aminoxiacetato (5 mM)     | 200 µL        | 0,0273 g / 50 mL |
| β-NADH (Abs = 0.8-0.6)    | 20 µL         | 6 mg / 2 mL      |
| Extracto Ez.              | 200 µL        |                  |
| Glutamina (25 mM)         | 200 µL        | 0,0365 g / 10 mL |

Fuente: Gonnet, 1994.

Las soluciones se mantienen en baño termostático a 30 °C y la actividad absoluta GOGAT se puede calcular mediante la siguiente expresión.

$$ACT = \frac{\{(\Delta \text{ Abs} / \text{ min}) - (\Delta \text{ Abs o} / \text{ min})\}}{6.22 \times 10^{-6} \cdot b \cdot \text{Vest.}}$$

Sin embargo, al contar con un espectrofotómetro METROLAB 1700, se procedió a determinar la actividad enzimática con el programa que dispone el equipo.

### 3.2.4 Determinación de la actividad GS nodular

La actividad GS se determinará por la técnica *SINTETASA* que se fundamenta en la siguiente reacción:



La cuantificación del GHA se realiza espectroscópicamente mediante la formación de un compuesto coloreado que forma con  $\text{Fe}^{3+}$ , a 540 nm. Estas determinaciones se realizaron antes de las 4 h de realizado el extracto nodular. Para realizar el cálculo cuantitativo de GHA formado se utilizó la curva patrón realizada para tal fin mediante reactivo puro.

### **3.3 Determinación de materia seca**

Para determinar el rendimiento en materia seca de la parte aérea de la planta se procedió a secar en estufa a 65 °C hasta peso constante mediante balanza analítica de precisión 0.1 mg.

### **3.4 Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los resultados obtenidos para las enzimas analizadas, se realizó mediante la técnica de análisis factorial de cuatro (4) efectos y dos niveles (2) mediante el programa GNU Octave 2.1.73.

## 4 RESULTADOS

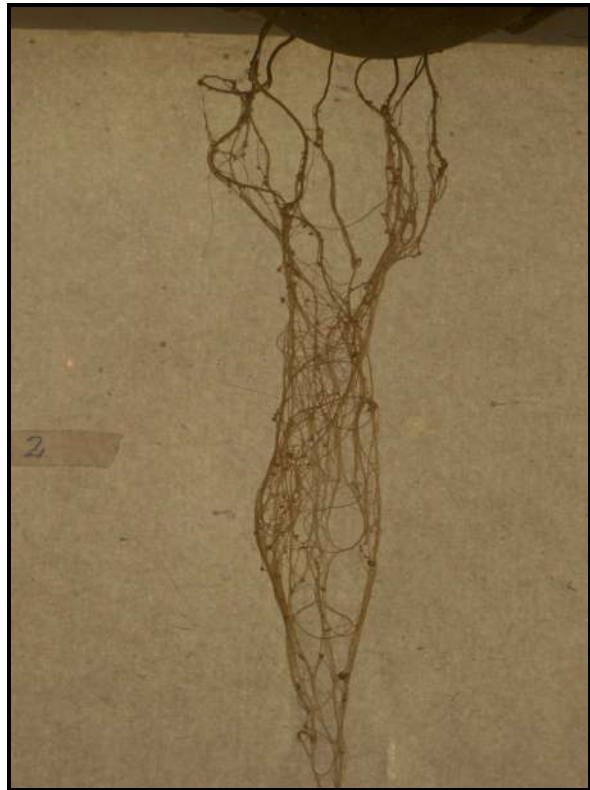
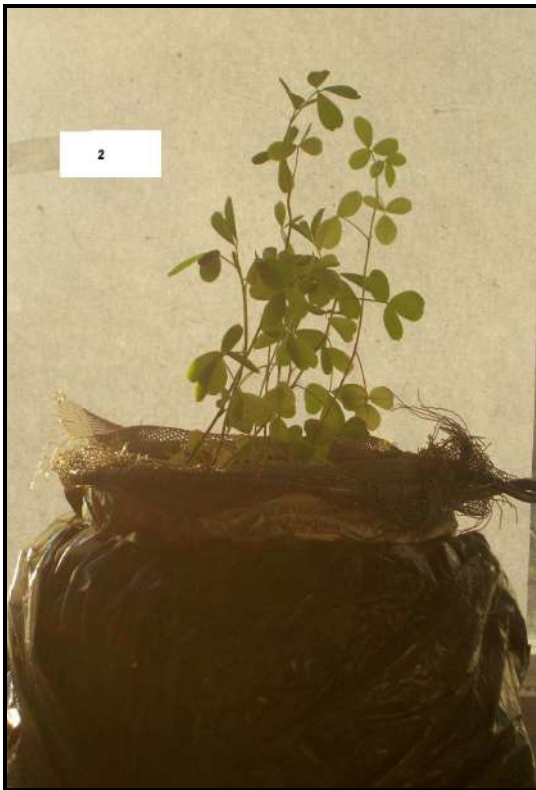
### 4.1 Características cualitativas del ensayo

La siguiente serie de fotografías muestra el estado de desarrollo de los distintos tratamientos al momento de finalizar el ensayo en cámara climatizada. En las mismas se muestran las características de la masa foliar y la nodulación sobre las que se determinó materia seca y actividad de las enzimas GS y GOGAT respectivamente.

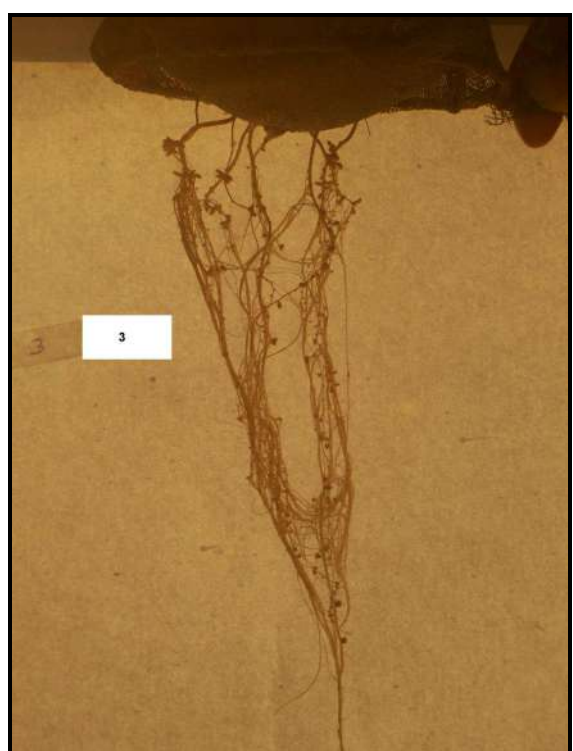
#### Tratamiento 1



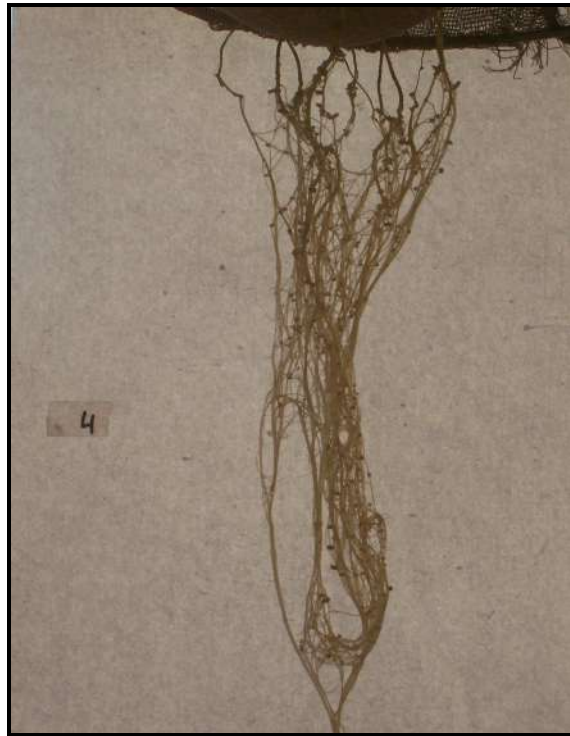
## Tratamiento 2



## Tratamiento 3



### Tratamiento 4

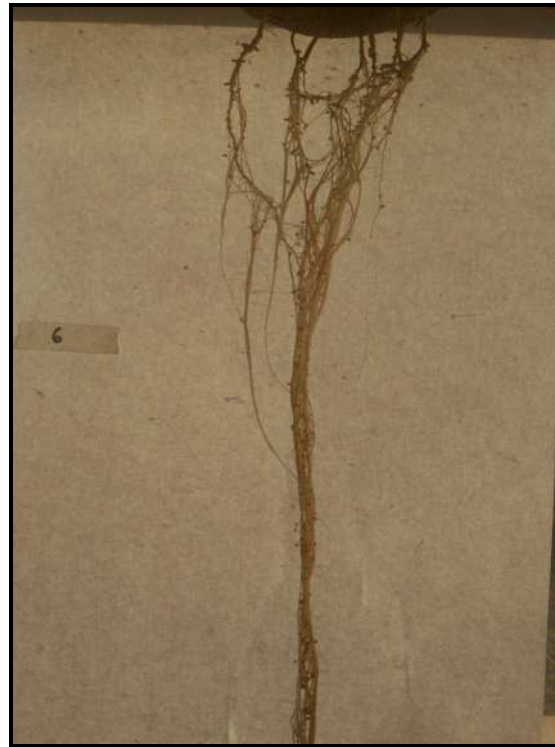


### Tratamiento 5

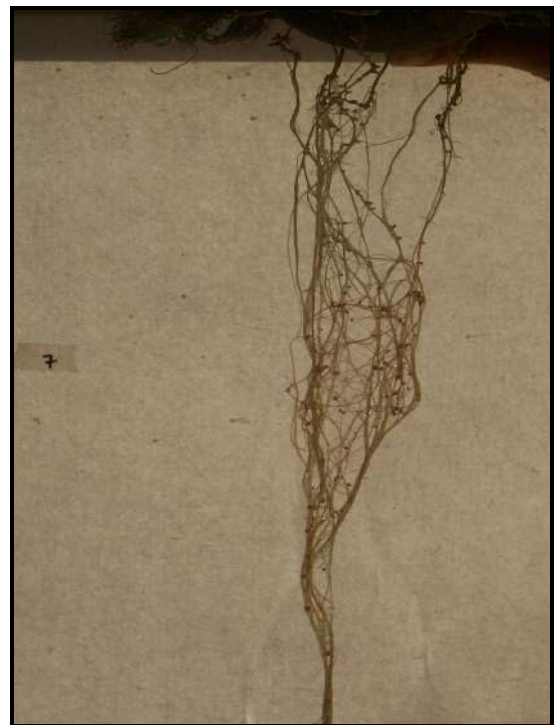




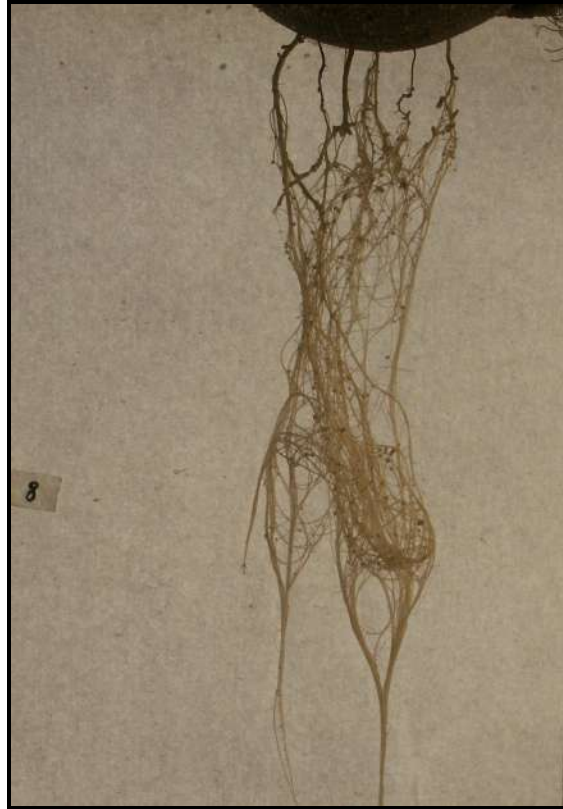
### Tratamiento 6



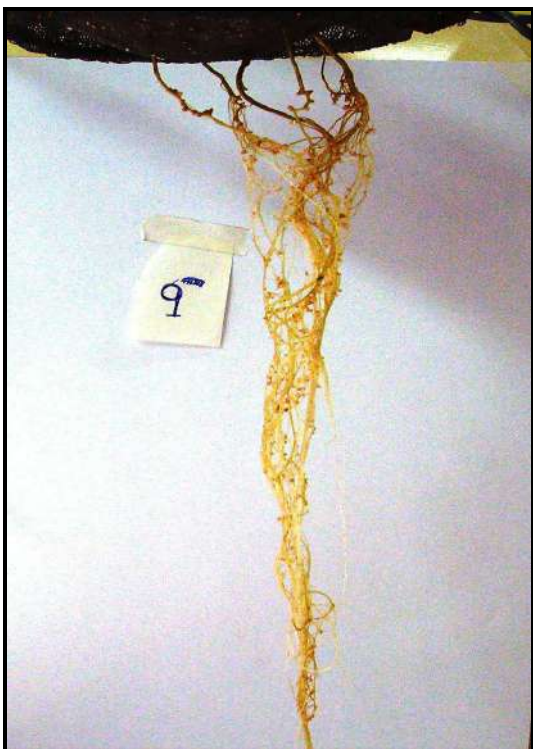
### Tratamiento 7



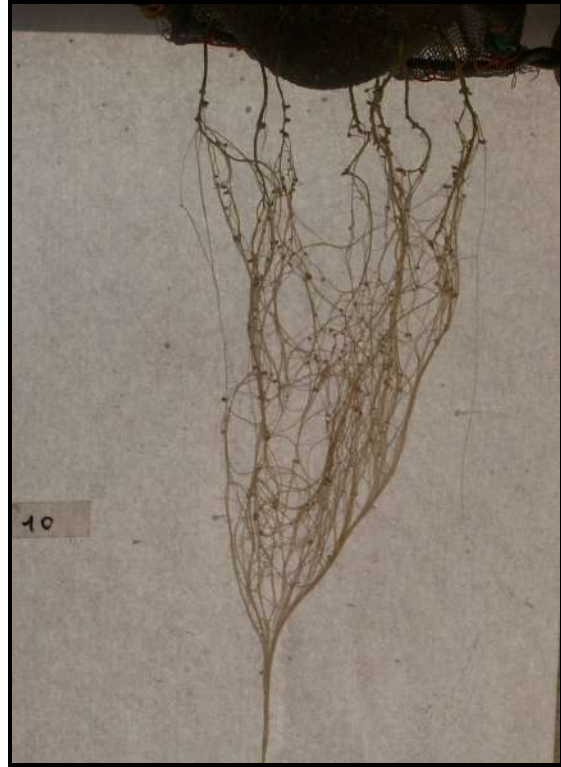
### Tratamiento 8



### Tratamiento 9



**Tratamiento 10**



**Tratamiento 11**



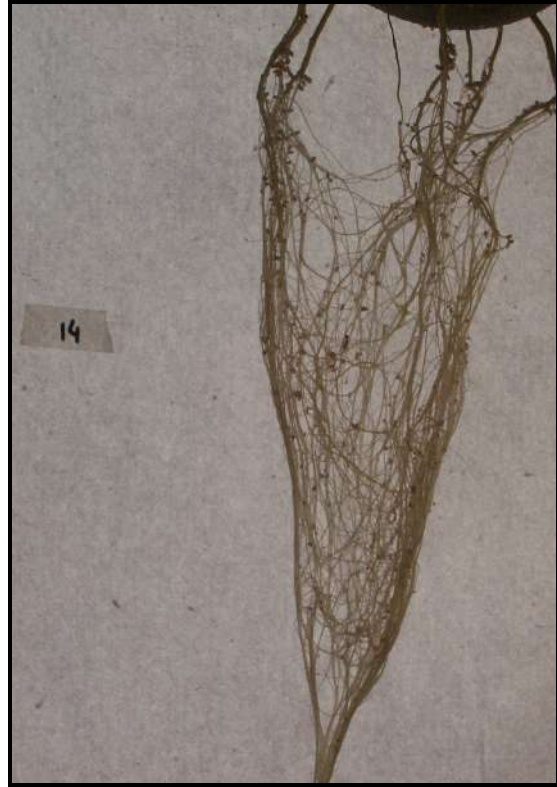
**Tratamiento 12**



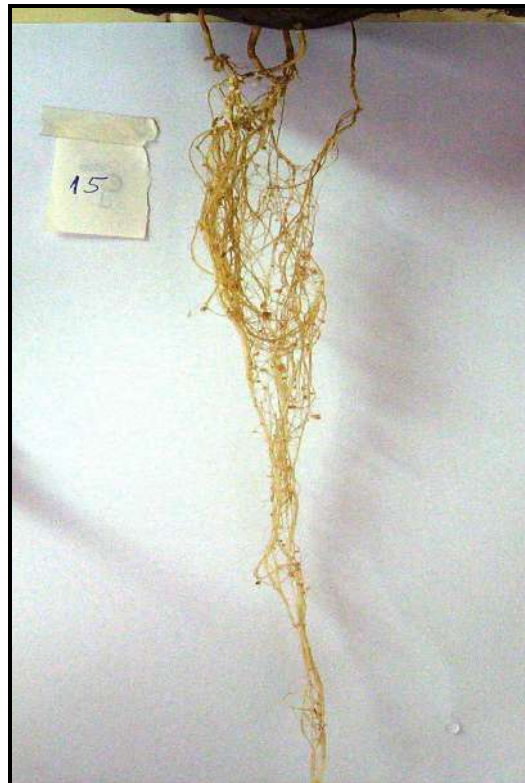
**Tratamiento 13**



### Tratamiento 14



### Tratamiento 15



## Tratamiento 16



Todas las fotos fueron tomadas al momento de levantar el ensayo.

### 4.2 Resultados de proteína soluble

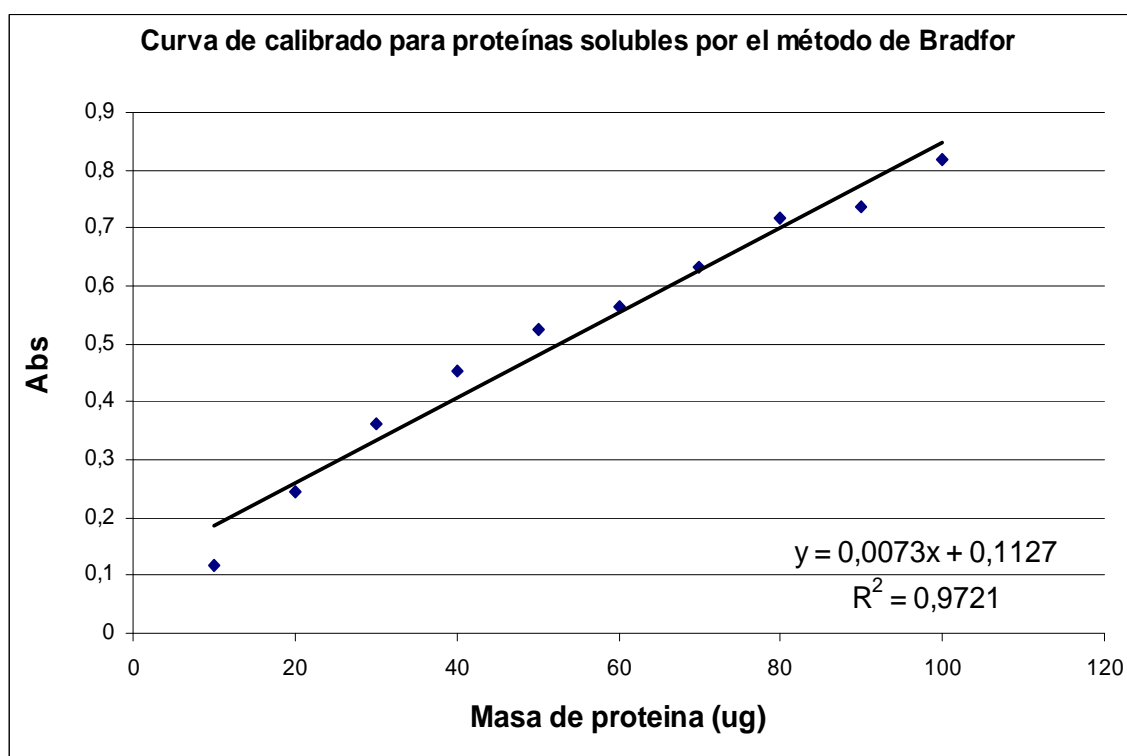
Para la determinación de proteína soluble en el extracto nodular se realizó una curva de calibración según lo descrito en 3.3 mostrándose los resultados se muestran en la tabla 11 y figura 14:

Tabla 11. Curva de calibrado para proteína soluble.

| $\mu\text{g}$ de Proteína / 0,1 mL | Abs. (promedio de las tres repeticiones) |
|------------------------------------|--|
| 10                                 | 0,116                                    |
| 20                                 | 0,243                                    |
| 30                                 | 0,362                                    |
| 40                                 | 0,453                                    |
| 50                                 | 0,524                                    |
| 60                                 | 0,564                                    |
| 70                                 | 0,631                                    |
| 80                                 | 0,716                                    |
| 90                                 | 0,737                                    |
| 100                                | 0,817                                    |

Fuente: elaboración propia.

Figura 14. Curva de calibración para proteína soluble



Fuente: elaboración propia.

Utilizando la curva de calibrado y su respectiva ecuación de regresión se determinó el contenido de proteína soluble que se utilizaron para determinar la actividad específica en cada uno de los extractos enzimáticos.

### 4.3 Resultados de la actividad GOGAT

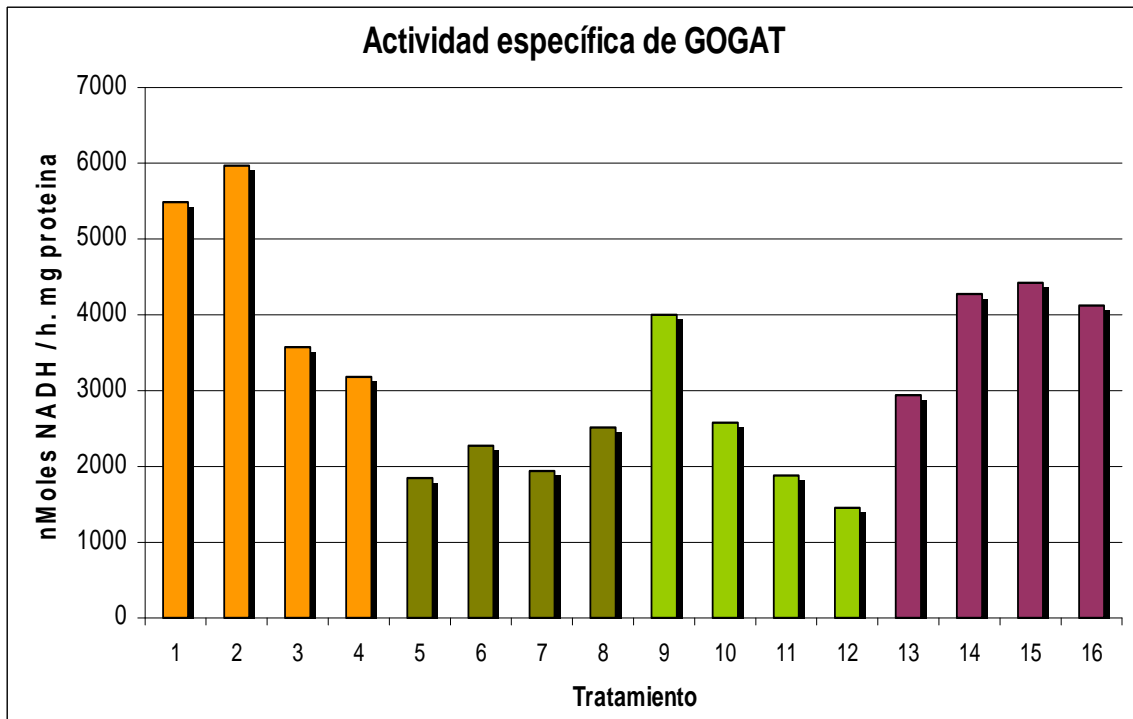
En la tabla 12 se muestran los valores obtenidos de la actividad GOGAT ensayada sobre extracto nodular de cada tratamiento y su correspondiente representación en el gráfico 15.

Tabla 12. Resultados de la determinación de la actividad específica GOGAT.

| Tratamiento | Act. esp. GOGAT |
|-------------|-----------------|
| 1           | 5480            |
| 2           | 5980            |
| 3           | 3565            |
| 4           | 3169            |
| 5           | 1856            |
| 6           | 2281            |
| 7           | 1944            |
| 8           | 2516            |
| 9           | 4005            |
| 10          | 2587            |
| 11          | 1885            |
| 12          | 1456            |
| 13          | 2954            |
| 14          | 4260            |
| 15          | 4433            |
| 16          | 4122            |

Fuente: elaboración propia.

Figura 15. Distribución de la actividad específica de GOGAT respecto al tratamiento:



Fuente: elaboración propia.



### 4.3.1 Análisis estadístico de la actividad GOGAT

Con este diseño se trata de estudiar la influencia que tienen los elementos azufre, boro, fósforo y zinc sobre la actividad enzimática de la enzima glutamato sintasa (GOGAT) presente en plantas de alfalfa. Para este análisis se consideró niveles de nutrientes y respuesta que se consignan en las tablas 13 y 14. Con estos datos podemos calcular la media global y 15 efectos: 4 efectos principales, 6 interacciones de dos factores, 4 interacciones de tres factores y una interacción de cuatro factores.

**Tabla 13. Factores analizados y niveles utilizados.**

| <b>Factores</b> | <b>( - )</b> | <b>(+)</b> |
|-----------------|--------------|------------|
| 1 - zinc        | ---          | 36 ppb     |
| 2 - boro        | ---          | 179 ppb    |
| 3 - azufre      | 17 ppm       | 45 ppm     |
| 4 - fósforo     | 17 ppm       | 45 ppm     |

Fuente: elaboración propia.

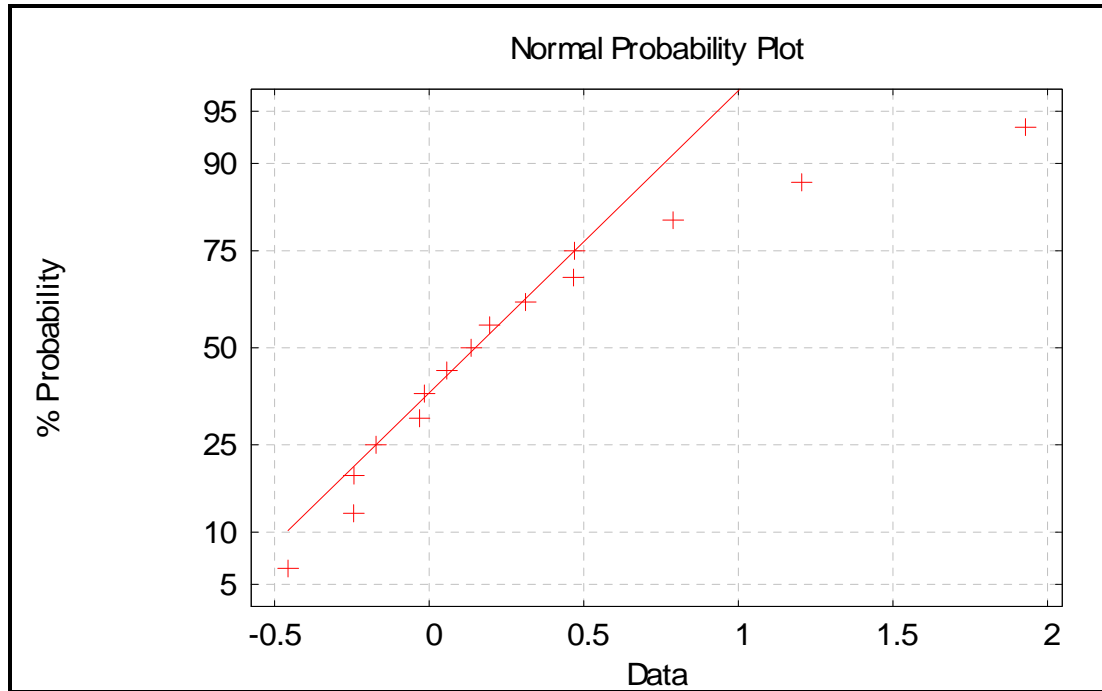
**Tabla 14. Factores analizados y niveles utilizados.**

| <b>Ensayo</b> | <b>Factores</b> |          |          |          | <b>Respuesta</b> |
|---------------|-----------------|----------|----------|----------|------------------|
|               | <b>Zn</b>       | <b>B</b> | <b>S</b> | <b>P</b> |                  |
| 1             | -               | -        | -        | -        | 4.122            |
| 2             | +               | -        | -        | -        | 4.433            |
| 3             | -               | +        | -        | -        | 4.260            |
| 4             | +               | +        | -        | -        | 2.954            |
| 5             | -               | -        | +        | -        | 1.456            |
| 6             | +               | -        | +        | -        | 1.885            |
| 7             | -               | +        | +        | -        | 2.587            |
| 8             | +               | +        | +        | -        | 4.005            |
| 9             | -               | -        | -        | +        | 2.516            |
| 10            | +               | -        | -        | +        | 1.944            |
| 11            | -               | +        | -        | +        | 2.281            |
| 12            | +               | +        | -        | +        | 1.845            |
| 13            | -               | -        | +        | +        | 3.169            |
| 14            | +               | -        | +        | +        | 3.565            |
| 15            | -               | +        | +        | +        | 5.980            |
| 16            | +               | +        | +        | +        | 5.480            |

Fuente: elaboración propia.

Para el cálculo de los efectos se inicia con la matriz de la distribución factorial y se carga la matriz respuesta. Para obtener el vector de los efectos multiplicamos la transpuesta de la matriz de la distribución factorial con la de respuesta. Se divide la primer fila de la matriz b para obtener el efecto medio:  
 $\bar{b}(1) = b(1)/16$  y  $\bar{b}(2:16) = b(2:16)/8$

**Figura 16. Probabilidad Normal**



Fuente: elaboración propia.

En la figura 16 de probabilidad normal se puede observar los efectos 0.789125, 1.205125 y 1.929125 correspondientes al factor 2 (boro) y a las interacciones 24 y 34 (boro – fósforo y azufre – fósforo) respectivamente.

Como no hay repeticiones para cada experimento, no se puede calcular el error experimental por medio de una  $s$  conjunta. Pero como la importancia de las interacciones decrecen con el número de factores involucrados, se pueden utilizar los 5 últimos efectos para obtener una estimativa del error experimental:  
 $S_E = \sqrt{\text{mean}(\text{error}^2)} = 0.24862$ .

Multiplicando  $S_E$  por el  $t_{(0,05; 5)} = 2.571$  se obtiene el intervalo de confianza (IC), el que deberá sumarse y restarse a cada uno de los efectos. Si el cero está contenido dentro del intervalo, se considera que dicho efecto no es significativo.

$$IC = S_E * t_{(5, 95\%)} = 0.24862 * 2.571 = 0.63921$$

**Tabla 15. Efecto e interacciones obtenidos para zinc, boro, azufre y fósforo.**

|                                       |                          |
|---------------------------------------|--------------------------|
| Media:                                | 3.280813                 |
| <b>Efectos Principales</b>            |                          |
| 1                                     | -0.031125 ± 0,6392       |
| <b>2</b>                              | <b>0.789125 ± 0,6392</b> |
| 3                                     | 0.470125 ± 0,6392        |
| 4                                     | 0.136125 ± 0,6392        |
| <b>Interacciones de dos factores</b>  |                          |
| 12                                    | -0.172125 ± 0,6392       |
| 13                                    | 0.466875 ± 0,6392        |
| 14                                    | -0.244125 ± 0,6392       |
| <b>23</b>                             | <b>1.205125 ± 0,6392</b> |
| 24                                    | 0.311625 ± 0,6392        |
| <b>34</b>                             | <b>1.929125 ± 0,6392</b> |
| <b>Interacciones de tres factores</b> |                          |
| 123                                   | 0.195376 ± 0,6392        |
| 124                                   | -0.015125 ± 0,6392       |
| 134                                   | -0.243625 ± 0,6392       |
| 234                                   | 0.057125 ± 0,6392        |
| <b>Interacción de cuatro factores</b> |                          |
| 1234                                  | -0.456125 ± 0,6392       |

Comparando los resultados presentados en la tabla 15 con la figura 16 de probabilidad normal, se puede observar que el factor 2, el Boro en concentración de 179 ppm favorece la actividad de la enzima GOGAT. También las interacciones (2-3) Boro-Azufre y (3-4) Azufre-Fósforo, respectivamente generan una mayor actividad enzimático.

#### **4.4 Resultados de la actividad GS**

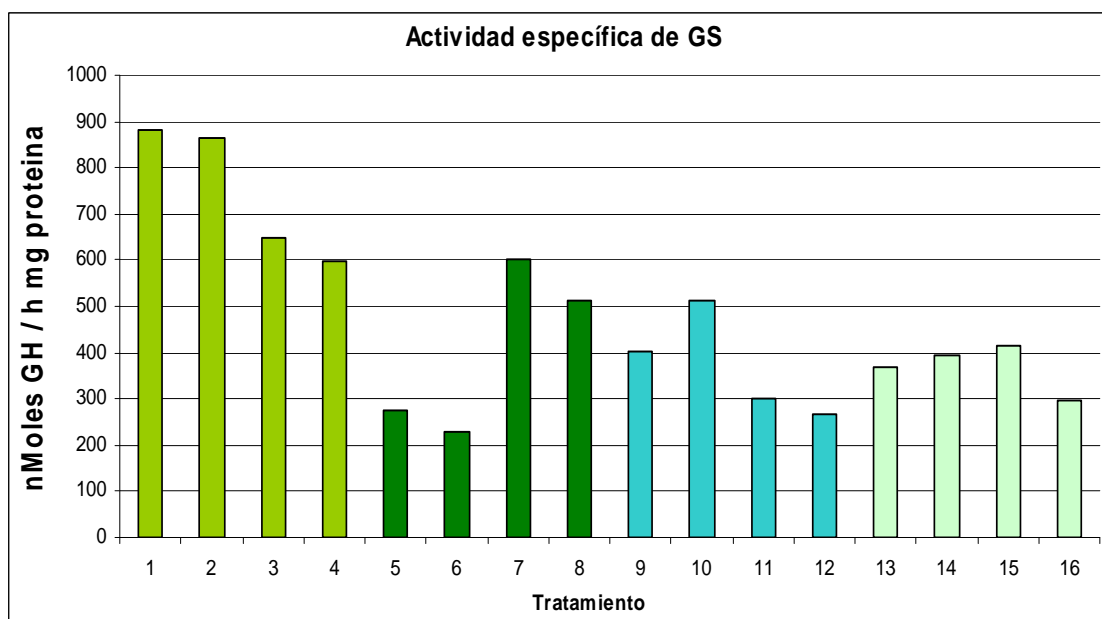
En la tabla 16 se muestran los valores obtenidos de la actividad GS ensayada sobre extracto nodular de cada tratamiento y su correspondiente representación en la figura 17.

**Tabla 16: resultados de la determinación de la actividad específica GS.**

| Tratamiento | Act. Esp. GS |
|-------------|--------------|
| 1           | 879          |
| 2           | 866          |
| 3           | 648          |
| 4           | 598          |
| 5           | 275          |
| 6           | 228          |
| 7           | 603          |
| 8           | 512          |
| 9           | 403          |
| 10          | 511          |
| 11          | 303          |
| 12          | 268          |
| 13          | 367          |
| 14          | 395          |
| 15          | 416          |
| 16          | 299          |

Fuente: elaboración propia.

**Figura 17: Distribución de la actividad específica de GS respecto al tratamiento:**



Fuente: elaboración propia.

#### 4.4.1 Análisis estadístico de la actividad GS

Con este diseño se trata de estudiar la influencia que tienen los elementos azufre, boro, fósforo y zinc sobre la actividad enzimática de la enzima glutamina sintetasa (GS) presente en plantas de alfalfa. Para este

análisis se consideró niveles de nutrientes y respuesta que se consignan en las tablas 17 y 18. Con estos datos podemos calcular la media global y 15 efectos: 4 efectos principales, 6 interacciones de dos factores, 4 interacciones de tres factores y una interacción de cuatro factores.

**Tabla 17: factores analizados y niveles utilizados.**

| <b>Factores</b>   | <b>(-)</b> | <b>(+)</b> |
|-------------------|------------|------------|
| <b>1: zinc</b>    | 0 ppm      | 36 ppm     |
| <b>2: boro</b>    | 0 ppm      | 179 ppm    |
| <b>3: azufre</b>  | 17 ppm     | 45 ppm     |
| <b>4: fósforo</b> | 17 ppm     | 45 ppm     |

Fuente: elaboración propia.

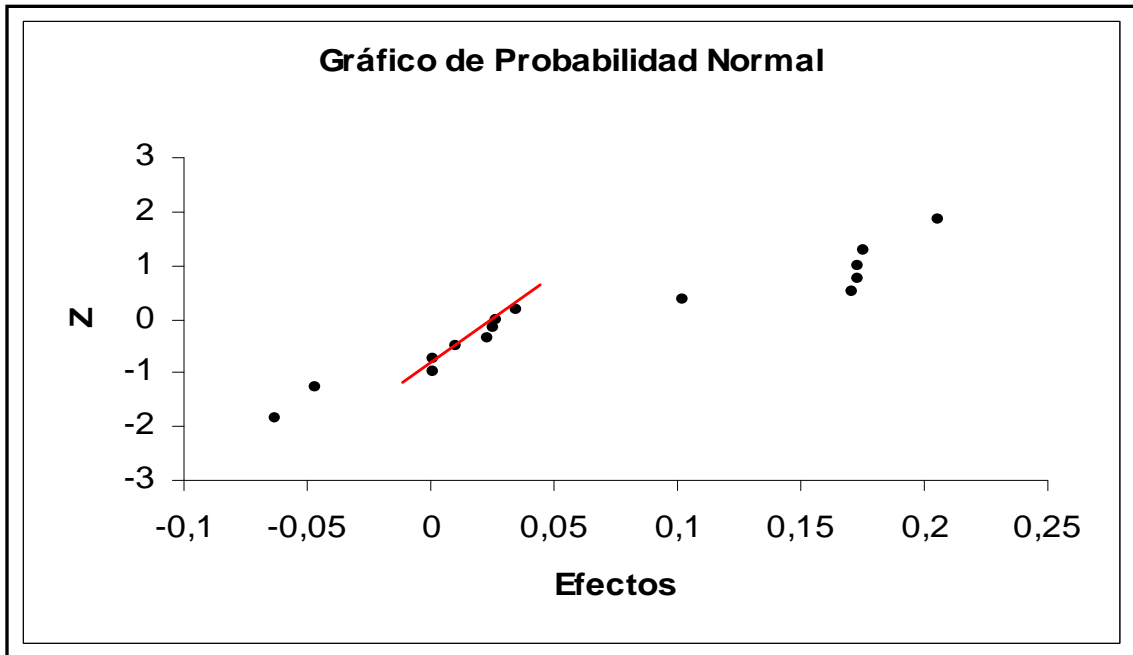
**Tabla 18: factores analizados y niveles utilizados.**

| <b>Ensayo</b> | <b>Factores</b> |          |          |          | <b>Respuesta</b> |
|---------------|-----------------|----------|----------|----------|------------------|
|               | <b>1</b>        | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>4</b> |                  |
| 1             | -               | -        | -        | -        | 0.299            |
| 2             | +               | -        | -        | -        | 0.416            |
| 3             | -               | +        | -        | -        | 0.395            |
| 4             | +               | +        | -        | -        | 0.367            |
| 5             | -               | -        | +        | -        | 0.268            |
| 6             | +               | -        | +        | -        | 0.303            |
| 7             | -               | +        | +        | -        | 0.511            |
| 8             | +               | +        | +        | -        | 0.403            |
| 9             | -               | -        | -        | +        | 0.512            |
| 10            | +               | -        | -        | +        | 0.603            |
| 11            | -               | +        | -        | +        | 0.228            |
| 12            | +               | +        | -        | +        | 0.275            |
| 13            | -               | -        | +        | +        | 0.598            |
| 14            | +               | -        | +        | +        | 0.648            |
| 15            | -               | +        | +        | +        | 0.866            |
| 16            | +               | +        | +        | +        | 0.879            |

Fuente: elaboración propia.

Para el cálculo de los efectos se inicia con la matriz de la distribución factorial y se carga la matriz respuesta. Para obtener el vector de los efectos multiplicamos la transpuesta de la matriz de la distribución factorial con la de respuesta. Se divide la primer fila de la matriz b para obtener el efecto medio:  $\bar{b}(1)=b(1)/16$  y  $\bar{b}(2:16)=b(2:16)/8$

Figura 18. probabilidad normal para los factores analizados en GS.



Fuente: elaboración propia.

Primero calculamos el error de estos valores:  $S_E = \sqrt{\text{mean}(\text{error.}^2)}$   
 $= 0.0473$ . Si multiplicamos este valor por el valor de t de la distribución Student con 5 grados de libertad, obtenemos el intervalo de confianza al 95% para cada uno de los valores de los efectos calculados, esto es

$$t_{(5, 95\%)} = 2.571$$

$$I.C = S_E \times t = 0.0473 \times 2.571 = 0.122$$

En general podemos esperar que la importancia de una interacción para un modelo disminuya con el número de factores involucrados en su definición. La siguiente tabla muestra claramente que algunos efectos son más significativos que otros.

|                                       |                      |
|---------------------------------------|----------------------|
| <b>Media</b>                          | 0.473                |
| <b>Efectos Principales</b>            |                      |
| 1                                     | 0.027 ± 0.122        |
| 2                                     | 0.035 ± 0.122        |
| <b>3</b>                              | <b>0.173 ± 0.122</b> |
| <b>4</b>                              | <b>0.206 ± 0.122</b> |
| <b>Interacciones de dos factores</b>  |                      |
| 12                                    | -0.046 ± 0.122       |
| <b>13</b>                             | <b>0.173 ± 0.122</b> |
| 14                                    | 0.023 ± 0.122        |
| <b>23</b>                             | <b>0.176 ± 0.122</b> |
| 24                                    | -0.063 ± 0.122       |
| <b>34</b>                             | <b>0.171 ± 0.122</b> |
| <b>Interacciones de tres factores</b> |                      |
| 123                                   | 0.001 ± 0.122        |
| 124                                   | 0.026 ± 0.122        |
| 134                                   | 0.011 ± 0.122        |
| 234                                   | 0.102 ± 0.122        |
| <b>Interacción de cuatro factores</b> |                      |
| 1234                                  | 0.0006 ± 0.122       |

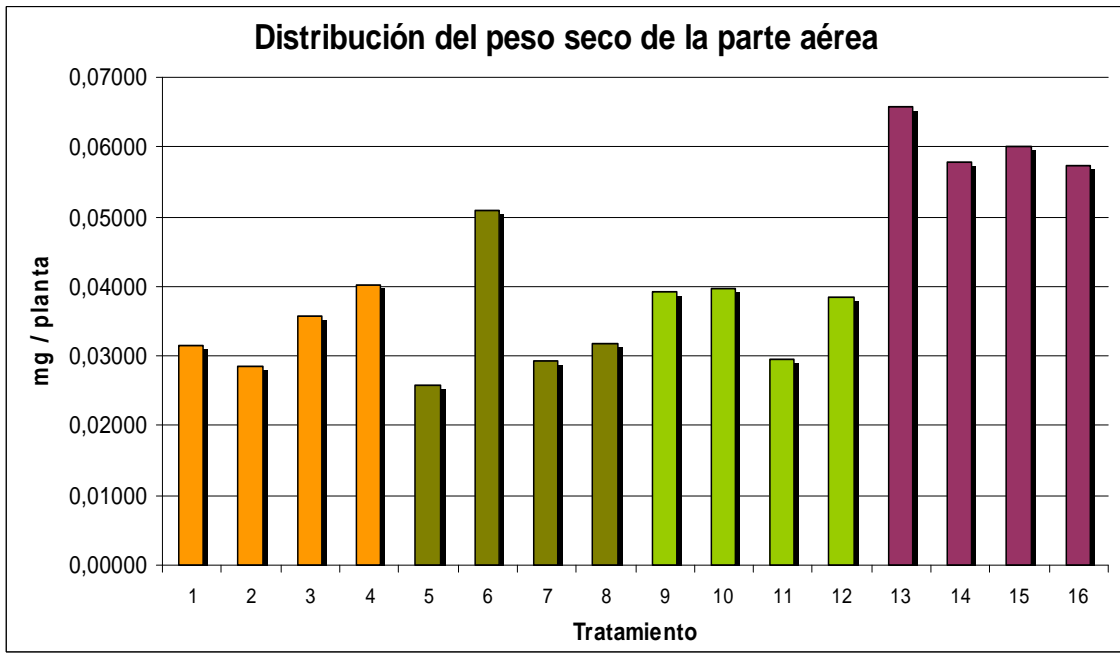
Fuente: elaboración propia.

Esto significa que solamente los efectos principales de los factores 3 (S), 4(P) y las interacciones 1-3 (zinc - azufre), 2-3 (boro - azufre) y 3-4 (azufre - fósforo) son significativas a ese nivel de confianza. Como queremos obtener una mayor actividad enzimática debemos hacer el ensayo a niveles (+) de S (45 ppm) y P (45 ppm).

## 4.5 Resultados de Peso seco en parte aérea

La determinación de peso seco por unidad de planta se muestra en la figura 19.

Figura 19. Distribución de peso seco de parte aérea



Fuente: elaboración propia.



## 5 Discusión

Del análisis estadístico factorial puede inferirse que existe una interacción entre los nutrientes analizados.

La actividad GOGAT es mayor con presencia de Boro y en las interacciones Boro-Azufre y Azufre-Fósforo.

Para GS se encuentra mayor actividad a altas concentraciones de Azufre y Fósforo, y en las interacciones entre Zinc-Azufre, Boro-Azufre y Azufre-Fósforo.

La concentración y relación de macro y micronutrientes evaluados afectan al ciclo GS-GOGAT en la simbiosis *M. sativa* – *S. meliloti* y por tanto a la fijación biológica de nitrógeno.

Si bien del análisis de las actividades GS - GOGAT y rendimiento de parte aérea no se observa una estricta correspondencia esto podría deberse a que se está cuantificando en un único estadio de desarrollo.

## **6 Conclusiones**

Se confirma la hipótesis de interrelaciones entre los nutrientes evaluados a distintos niveles. Deberían realizarse determinaciones en distintos estadios del desarrollo del cultivo para evaluar con mayor rigurosidad la interrelación de los nutrientes y su acción en la simbiosis.

## 7 BIBLIOGRAFIA

1. Alloway Brian J. 2004. Zinc In Soils and Crop Nutrition. Ed. International Zinc Association (IZA). [http://www.zincworld.org/Documents/Communications/Publications/ALLOY\\_PRINT.pdf](http://www.zincworld.org/Documents/Communications/Publications/ALLOY_PRINT.pdf)
2. Azcón-Bieto J. y Talón M.. 2000. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Edicions Universitat de Barcelona. McGraw-Hill/Interamericana de España, S. A. U.
3. Barrière Frédéric. 2003. Modeling of the molybdenum center in the nitrogenase FeMo-cofactor. *Coordination Chemistry Reviews*, 236: 71-89.
4. Bolaños Luis, Krystyna Lukaszewski, Idefonso Bonilla, Dale Blevins. 2004. Why boron?. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 907–912.
5. Bolaños Luis, Elvira Esteban, Cristina de Lorenzo, Mercedes Fernandez-Pascual, Maria R. de Felipe, Agustin Gárate, and Idefonso Bonilla. 1994. Essentiality of Boron for Symbiotic Dinitrogen Fixation in Pea (*Pisum sativum*) Rhizobium Nodules. *Plant Physiol.* 104: 85-90.
6. Brewin Nicholas J. 2004. Plant Cell Wall Remodelling in the Rhizobium–Legume Symbiosis. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 23(4): 293–316.
7. Brewin Nicholas J. 2002. Pods and nods: a new look at symbiotic nitrogen fixing. *Biologist* 49 (3): 1-5.
8. Broadley Martin R., Philip J. White, John P. Hammond, Ivan Zelko and Alexander Lux. 2007. Zinc in plants. *New Phytologist* 173:4, 677–702.
9. Broughton, W. J. 2000. Roses by other names: taxonomy of the *Rhizobiaceae*. *J. Bacteriol.* 185: 2975–2979.
10. Brunold C, Von Ballmoos P, Hesse H, Fell D, Kopriva S. 2003. Interactions between sulfur, nitrogen and carbon metabolisms. In:

- Davidian JC, Grill D, De Kok LJ, Stulen I, Hawkesford MJ, Schnug E, Rennenberg H, eds. Sulfur transport and assimilation in plants: Regulation, interaction, and signaling. Leiden, The Netherlands: Backhuys Publishers, 45–56.
11. Cohen MN. 1977. The Food Crisis in Prehistory: Overpopulation and the Origins of Agriculture. Yale University Press, New Haven, CT.
  12. de Farias SM, Lewis GP, Sprent JI, Dutheland JM. 1989. Occurrence of nodulation in the leguminosae. *New Phytol.* 111: 607-619.
  13. D`Haeze Wim and Marcelle Holsters. 2002. Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology*, 12(6):79-105.
  14. Simbiosis Leguminosa – Rizobio. 1987. ed. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
  15. Forde Brian G. 2000. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1465:219-235.
  16. Fred EB, Baldwin IL, McCoy E. 1932. Root nodule bacteria and leguminous plants. University of Wisconsin Press, Madison.
  17. Frugier Florian, Simone Poirier, Béatrice Satiat-Jeunemaitre, Adam Kondorosi, and Martin Crespi. 2000. A Kruppel-like Zinc finger protein is involved in nitrogen-fixing root nodule organogenesis. *Ges and Development* 14: 475-482.
  18. Gonnet Susana. 1994. Tesis de Maestria. Facultad de Agronomía Universidad de la Republica, Montevideo Uruguay.
  19. Graham PH, Vance CP. 2000. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. *Field Crops Res* 65: 93–106.
  20. Graham, PH, and CP Vance. 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* 131: 872-877.

21. Graham Noctor, Ana-Carolina M. Arisi, Lise Jouanin, Karl J. Kunert, Heinz Rennenberg and Christine H. Foyer. 1998. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *Journal of Experimental Botany*, 49(321): 623–647.
22. Groat Gene R. and Carroll P. Vance. 1981. Root nodule enzymes of ammonia assimilation in alfalfa. *Plant Physiol.*, 67: 1198-1203.
23. Hammond J. P., Martin R. Broadley and Philip J. White. 2004. Genetic responses to phosphorus deficiency. *Annals of Botany* 94: 323-332.
24. Hodge A. 2004. The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients. *New Phytologist* 162: 9–24.
25. Hymowitz T, Singh RJ. 1987. Taxonomy and speciation. *In* JR Wilcox, ed, *Soybeans: Improvement, Production and Uses*. Agronomy Monograph 16. American Society of Agronomy, Madison, WI, pp 23–48.
26. Kaplan L, Lynch TF. 1999. *Phaseolus* (Fabaceae) in archeology: AMS radiocarbon dates and their significance in pre-Colombian agriculture. *Econ Bot* 53: 261–272.
27. Kopriva Stanislav and Heinz Rennenberg. 2004. Control of sulphate assimilation and glutathione synthesis: interaction with N and C metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 55(404): 831–1842.
28. Kopriva Stanislav. 2006. Regulation of sulphate assimilation in *Arabidopsis* and Beyond. *Annals of Botany* 97: 479-495.
29. Kunert KJ, Foyer CH. 1993. Thiol/disulphide exchange in plants. *In*: De Kok LJ, ed. *Sulfur nutrition and assimilation in higher plants*. The Hague, The Netherlands: SPB Academic Publishing bv, 139–51.

30. Linkohr BI, Williamson LC, Fitter AH, Leyser HMO. 2002. Nitrate and phosphate availability and distribution effects on root system architecture of *Arabidopsis*. *Plant Journal* 29: 751–760.
31. Lea, P.J., Robinson, S.A. and Stewart, G.R. The enzymology and metabolism of glutamine, glutamate and asparagine. In the *Biochemistry of Plant, Intermediary Nitrogen Metabolism*. Vol. 16, 1990, pp 121-159 B.J. eds, Miflin and P.J. Lea, San Diego: Academic Press.
32. Leustek T, Martin MN, Bick JA, Davies JP. 2000. Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51, 141–165.
33. Lodeiro et al. Aníbal R., Silvana L. Lopez Garcia, Elias Mongiardini, Juan Inácio Quelas y Alejandro Peticari. 2003. *Los rizobios y la inoculación de las leguminosas para la fijación simbiótica de nitrógeno*. *Microbiología Agrícola, Un aporte de la investigación argentina*, UNSE. pp: 159-177.
34. Lynch JP, Brown KM. 2001. Topsoil foraging – an architectural adaptation of plants to low phosphorus availability. *Plant and Soil* 237: 225–237.
35. Madigan Michael T, Martinko John M and Parker Jack. 2004. *Biología de los microorganismos* 10.<sup>a</sup> ed. Prentice Hall Iberia.
36. Matthyse, A. G. and Kijne, J. W. 1998. Attachment of *Rhizobiaceae* to plant cells. In: *The Rhizobiaceae*, pp. 235–249. Spaink, H. P., Kondorosi, A., and Hooykaas, P. J. J., Eds., Kluwer, Dordrecht.
37. Melgar RJ, J Lavandera, M Torres Duggan, L Ventimiglia. 2001. Respuesta a la fertilización con Boro y Zinc en sistemas intensivos de producción de Maiz. *Ciencia del suelo*, 19(2): 109-114.

38. Meister A. 1988. Glutathione metabolism and its selective modification. *Journal of Biological Chemistry* 263, 17 205–8.
39. Mylona Panagiota, Katharina Pawlowski, and Ton Bisseling. 1995. Symbiotic Nitrogen Fixation. *The Plant Cell*, 7: 869-885.
40. Ohyama T and Kamazuda K. 1980. Nitrogen assimilation in soybean nodules. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 26(1): 109-115.
41. Perret, X., Staehelin, C., and Broughton, W. J. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. and Mol. Biol. Rev.* 64: 180–201.
42. Polhill RM, Raven PH, Stirton CH. 1981. Evolution and systematics of the Leguminosae. *In* RM Polhill, PH Raven, eds, *Advances in Legume Systematics Part 1*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK, pp 1–26.
43. Richardson A. E. 1994. Soil microorganisms and phosphorus availability. *Soil Biota* 50- 62.
44. Romero Néstor. Alfalfa: Limitantes productivas en la región pampeana. E.E.A. Anguil “Ing. Agr. G.Covas”. C.C. 11. (6326) Anguil, La Pampa. Argentina.
45. Rogério de Azevedo Watson, Valdemar Faquin, Fátima Maria de Souza Moreira, Antônio Claret de Oliveira Júnior e Carolina Cardoso Lisboa, 2002. Efeito do boro na nodulação da ervilha cultivada em solos de várzea. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 37(8): 1137-1143.
46. Römheld and Marschner, *Function of Micronutrients in Plants*, in *Micronutrients in Agriculture (Second Edition)* Ed. J J Mortvedt et al, Manag. Ed. S H Mickelson, Ed. In Chief SSSA R J Luxmoore in the *Soil Science Society of America Book Series*, Pub. by: Soil Science Society of America, Inc. Madison, Wisconsin, USA. 1991.

47. Sanda S., Leustek T, Theisen M J, Garavito R M, Benning C. 2001. Recombinant Arabidopsis SQD1 converts UDP-sulfoquinovose in vitro. *Journal Biological Chemistry* 276: 3941-3946.
48. Schachtman Daniel P., Robert j. Reid, and S. M. Ayling. 1998. Phosphorus uptake by plant: from soil to cell. *Plant Physiol.*, 116: 447-453.
49. Smith RJ and Gallon JR. 1993. Nitrogen Fixation in Plant Biochemistry and Molecular Biology. Edited by Lea P.J. and Leegood Richard C., Wiley.
50. Spaink, H. P., Kondorosi, A., and Hooykaas, P. J. J. 1998. *The Rhizobiaceae*. Kluwer, Dordrecht.
51. Sprent, J. I. 2001. *Nodulation in Legumes*. Royal Botanical Gardens, Kew, London.
52. Taiz L. and Zeiger E. 2002. *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts.
53. van Rhijn, P., Fujishige, N. A., Lim, P. O., and Hirsch, A. M. 2001. Sugarbinding activity of pea lectin enhances heterologous infection of transgenic alfalfa plants by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Plant Physiol.* 126: 133–144.
54. Vance CP, Graham PH, Allan DL. 2000. Biological nitrogen fixation. Phosphorus: a critical future need. In FO Pedrosa, M Hungria, MG Yates, WE Newton, eds, *Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 506–514.
55. Vance Carrollo P. 2001. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. *Plant nutrition in a world of declining renewable resources*.



56. Vance C P, Uhde-Stone C, Allan DL. 2003. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist* 157: 423–447.
57. Williamson LC, Ribrioux SPCP, Fitter AH, Leyser HMO. 2001. Phosphate availability regulates root system architecture in arabidopsis. *Plant Physiology* 126: 875–882.
58. Woodall J, Jon G. Boxall, Brian G. Forde and John Pearson. 1996. Changing perspectives in plant nitrogen metabolism: the central role of glutamine synthetase. *Science Progress*, 79(1), 1 – 26.