

GERARDO LOPEZ JURADO\*

Las condiciones del suelo tienen un efecto notable sobre la supervivencia del Rhizobium y sobre la habilidad para infectar los pelos radicales (7).

#### IONES NITRITO Y NITRATO

Los iones nitrito y nitrato inhiben la formación del nódulo (2,4). Una explicación que se da es que el efecto del nitrógeno cambiando sobre la infección se debe a un cambio en la química de la superficie de los pelos radicales, de tal manera que más pocas lectinas son aprovechables para la unión del Rhizobium, mientras que los efectos sobre el desarrollo del nódulo y la actividad de la nitrogenasa se relacionan a un nivel más bajo de carbohidratos en las raíces (10).

Heichel y colaboradores (13) demostraron que la aplicación de nitrato de amonio al momento de la siembra de alfalfa resultó en una reducción significativa del número de nódulos, peso de los nódulos, y en la fijación biológica de nitrógeno, medida por el método de la reducción del acetileno.

Las leguminosas, como grupo, no difieren grandemente de las no leguminosas en sus requerimientos cualitativos o cuantitativos por los nutrimentos minerales.

Aparte de aquellos nutrimentos requeridos específicamente para la fijación simbiótica de nitrógeno (cobalto, molibdeno), los nutrimentos minerales influyen la asimilación del nitrógeno a través de sus efectos en el crecimiento de la leguminosa hospedera. Para muchos nutrimentos, sin embargo, el requerimiento para la función del

\* Profesor Asociado. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Nariño.

nódulo es menor que para el metabolismo en cualquier parte de la planta (19).

#### CALCIO, ALUMINIO Y MAGNESIO

La acidez, la deficiencia de calcio, y el exceso de aluminio y manganeso, tienden a ocurrir juntos en los suelos y a interactuar en sus efectos sobre la nodulación y sobre el crecimiento de la planta (16).

La interacción de calcio y pH sobre la nodulación ha sido demostrada con alfalfa, soya y trébol (15,21).

Se ha demostrado que la nodulación requiere más calcio y pH más alto que la fijación de nitrógeno y el crecimiento de las plantas con nódulos ya establecidos (15, 21).

En el género Medicago el estado críticamente sensitivo del proceso de la nodulación ocurre dentro de 1 a 3 días después de la inoculación, y corresponde con el estado de desarrollo de la planta en que comienza el encurvamiento de los pelos radicales y la infección. El crecimiento de la raíz, el desarrollo de los pelos radicales, la elongación del hilo de infección y el crecimiento del nódulo son todos menos sensitivos que la iniciación del hilo de infección (15).

Después de la iniciación de la infección, el desarrollo del nódulo puede proceder con concentraciones de calcio aún más bajas que aquellas requeridas para el crecimiento del hospedero (15). Una interpretación de esta observación es que la acidez y la deficiencia de calcio disminuyen la asociación de calcio con las paredes celulares, las membranas celulares, o las enzimas, por lo tanto previenen los procesos bioquímicos en la rizosfera, tal como la pectólisis que puede ser necesaria en la iniciación de la infección (15).

El calcio se requiere en cantidades mayores para la función del nódulo que para el metabolismo de la planta (15). El calcio también modera los efectos tóxicos de los iones de manganeso en las plantas leguminosas (20).

#### POSFORO, AZUFRE Y POTASIO

Se han establecido ampliamente papeles específicos en el

nódulo para el fósforo, como constituyente de los nucleótidos; para el azufre como constituyente de las F-S proteínas, y para el potasio por su papel en la regulación osmótica y en la activación enzimática (9).

Las deficiencias de fósforo, azufre y potasio también frecuentemente y severamente limitan la fijación del nitrógeno porque limitan el crecimiento de la planta hospedera. Aunque no hay demostraciones claras en condiciones controladas que estos elementos limitan directamente la nodulación o la fijación de nitrógeno, hay muchos datos que sugieren tales efectos en experimento de campo (16,19).

La aplicación de fósforo que incrementa el crecimiento, comúnmente incrementa también el volumen, número y peso de los nódulos (16). Este efecto generalmente puede ser explicado por efectos indirectos del fósforo en la nodulación asociados con respuestas de crecimiento por la leguminosa (19).

Las concentraciones de fósforo en los nódulos pueden exceder grandemente las concentraciones de fósforo en los tallos, o en las raíces. Sin embargo, no se ha demostrado que la función del nódulo tenga un más alto requerimiento interno por fósforo que el crecimiento de la planta hospedera (19).

#### BORO Y COBRE

Munns (16) reportó que la función del nódulo se previene por la deficiencia de boro, pero es poco afectada y no muy consistentemente por deficiencia de otros micro nutrientes, a menos que la deficiencia sea suficientemente severa para producir daño en las diferentes fases de la simbiosis.

La deficiencia de boro en las leguminosas produce síntomas similares a los que ocurren en otras plantas, tal como la no formación característica del meristemo. Esto sugiere que los requerimientos de boro para el crecimiento y diferenciación de la planta hospedera son similares a los requerimientos para el desarrollo del nódulo (16).

El cobre se requiere en mayores cantidades para la fun -

ción del nódulo que para el metabolismo de la planta (19). Nódulos de trébol (*Trifolium subterraneum*) deficientes en cobre, incorporaron el  $^{14}\text{C}$  en aminoácidos y proteínas más lentamente que los nódulos provenientes de plantas sin deficiencia en cobre. Así mismo los nódulos deficientes en cobre tenían menor número de bacteroides, más almidón y menos citocromo oxidasa (6).

#### ZINC, MANGANESO, CLORO, MOLIBDENO Y COBALTO

Los micronutrientes zinc, manganeso, cloro, hierro y cobalto afectan significativamente la nodulación, aunque todos son necesarios para el crecimiento del hospedero, la bacteria, o ambos (16).

Los requerimientos de molibdeno y de cobalto para la función del nódulo son mayores que los requerimientos en cualquier otra parte de la planta (19).

El molibdeno es un constituyente de la nitrogenasa y de la nitrato reductasa (9). Las plantas deficientes en molibdeno a menudo tienen nódulos pequeños, algunas veces en cantidades anormales (1).

El papel del cobalto dentro del nódulo parece estar asociado con él, siendo un componente de al menos tres sistemas de enzimas: metil malonil CoA mutasa, ribonucleotido reductasa y metionina sintetasa. El efecto primario del cobalto en la función del nódulo opera a través de los efectos sobre la ribonucleotido reductasa (19).

#### HIERRO

El hierro es un constituyente de la leghemoglobina, la cual es importante para la función del nódulo (3).

En la forma Fe-S, el hierro está íntimamente involucrado como un constituyente de ambos componentes de la nitrogenasa y de la ferredoxina bacteriana, la cual puede funcionar como un reductor de la nitrogenasa (3).

A pesar de estos requerimientos específicos dentro del nódulo, la limitación de la función del nódulo no parece ser el mayor efecto de las deficiencias de hierro o de

azufre. Esto indica, de acuerdo con Robson (19), que los requerimientos por hierro y azufre para el metabolismo fuera del nódulo son mayores que aquellos dentro del nódulo.

#### NODULACION Y FIJACION DE NITROGENO

Las observaciones sobre nodulación solo son informativas sobre la fijación de nitrógeno atmosférico. La presencia de nódulos pequeños, verdes, puede indicar la limitación de la fijación de nitrógeno por nitrógeno combinado, o deficiencias de molibdeno, fósforo o azufre (1).

La ausencia o presencia muy esparcida de los nódulos puede indicar alta concentración de nitrato del suelo, acidez del suelo, deficiencia de boro, así como carencia de bacterias infectivas. Variaciones menos extremas en el número de nódulos, sin embargo, no pueden tener influencia en la fijación de nitrógeno, debido a que la fijación depende más del volumen o masa de los nódulos y su contenido de leghemoglobina (1).

#### EFFECTOS DEL SUELO EN LA NODULACION

Los componentes del suelo, incluyendo los ácidos gálico y tánico, y ciertos exudados de la hoja y la raíz, se ha encontrado que limitan la nodulación en algunos casos (4).

Otros factores tales como temperatura y luz, deficiencia de agua e inundaciones, interacciones con micorrizas y las condiciones sanitarias de la raíz también influyen en la nodulación y la fijación de nitrógeno, bajo condiciones de campo.

Las condiciones adversas de suelo y de la siembra se pueden solucionar parcialmente por la aplicación de un gran número de bacterias para incrementar la probabilidad de que suficientes bacterias sobrevivan hasta que se desarrollen las raíces y pueda ocurrir la infección.

Cultivos preparados comerciales de inoculantes se encuentran en el mercado para cultivos específicos. Por tanto, se debe usar el inóculo correcto para la inoculación de cada tipo de semilla de leguminosa.

#### METODOS PARA MEDIR LA FIJACION DE NITROGENO

Se han utilizado muchos métodos para estimar la habilidad de los cultivos para fijar nitrógeno atmosférico. Entre estos métodos se incluyen la acumulación de nitrógeno, los métodos de diferencia, los métodos isotópicos, los métodos indirectos y la reducción del acetileno.

La detección de pequeños cambios de nitrógeno en sistemas naturales en el campo es difícil, y requiere técnicas de medición bastante sensitivas.

##### 1. ACUMULACION DE NITROGENO

La más simple estimación de la fijación de nitrógeno atmosférico es por la acumulación de nitrógeno total del cultivo. Este método se basa en la asunción de que todo el nitrógeno presente en el cultivo proviene del nitrógeno fijado simbióticamente (14).

El procedimiento estándar para el análisis de nitrógeno es la determinación por el método Kjeldahl (17). Este método se ha aplicado ampliamente para medir la fijación de nitrógeno (11).

##### 2. METODO DE DIFERENCIA

Una medida ajustada de fijación de nitrógeno atmosférico por la técnica de acumulación de nitrógeno se obtiene cuando se estima la contribución del nitrógeno del suelo al nitrógeno total de las leguminosas.

Este procedimiento se conoce como el método de diferencia (22), y tiene tres versiones: a.- comparación de una leguminosa con una no-leguminosa, b.- comparación de una leguminosa con una leguminosa que no nodule, y c.- comparación de leguminosas inoculadas y no-inoculadas (14).

##### 3. METODOS ISOTOPICOS

La fijación de nitrógeno  $^{15}$ , un método directo para medir la fijación de nitrógeno atmosférico, es el método para chequear la validez de otros métodos de fijación (5), y ha sido utilizado en muchas investigaciones (11,14).

La fijación de nitrógeno también puede ser estimada por dilución isotópica. En este método, tanto el cultivo que está fijando nitrógeno como el testigo, que no fija nitrógeno se cultivan en un suelo al que se le adiciona una pequeña cantidad de  $^{15}\text{N}_2$  como nitrato o amonio (13).

Otros métodos isotópicos se basan en la abundancia de isótopos naturales (14).

#### 4. METODOS INDIRECTOS

Se han usado muchos métodos indirectos para estimar la habilidad de las leguminosas de fijar nitrógeno atmosférico, tales como el índice de nodulación, número de nódulos, peso fresco o peso seco de los nódulos y concentración de leghemoglobina en los nódulos o la cantidad de leghemoglobina por planta (14).

#### 5. METODO DE LA REDUCCION DEL ACETILENO

El método de la reducción del acetileno, que tiene como ventajas sensibilidad, velocidad y economía, se basa en la propiedad universal y específica de la nitrogenasa de formar etileno a partir del acetileno. Ningún otro sistema biológico cataliza esta reacción (18).

La intensidad de producción de etileno es una medida de la nitrogenasa (2). Se han descrito muchas variaciones de este método (5, 11, 14).

Hardy y Holsten (11) dan una detallada descripción de la metodología y aplicación de la reducción del acetileno para la estimación de la fijación biológica de nitrógeno.

Las técnicas de la reducción del acetileno utilizan nódulos o sistemas de raíces decapitadas intactas, o el sistema de raíces de plantas intactas, los cuales se encierran en un recipiente impermeable a los gases. Las muestras de gas se toman sobre un período de varias horas para determinar la intensidad de reducción de acetileno.

Las aplicaciones iniciales de la reducción del acetileno para investigar la fijación del nitrógeno por las leguminosas empleaban nódulos separados de la planta, segmentos de raíz noduladas, o directamente la planta con el suelo (23).

Preferiblemente se deben usar plantas intactas, ya que los estudios han demostrado que este tipo de plantas tienen intensidades de reducción de acetileno 5 veces mayor que los nódulos separados y 2 veces mayor que los sistemas de raíces decapitados, lo que indica un efecto adverso de la mutilación de la planta sobre las intensidades de reducción de acetileno (23).

Los estudios sobre la actividad de la nitrogenasa se han incrementado grandemente por el desarrollo del método de reducción del acetileno. Este método se ha utilizado en cultivos tales como alfalfa, soya y frijoles para evaluar la actividad de la nitrogenasa para fijar nitrógeno.

#### ENERGIA PARA LA FIJACION BIOLOGICA DE NITROGENO

La fijación de nitrógeno atmosférico no solamente requiere nitrogenasa sino también energía en la forma de ATP, y ferredoxina y flavodoxina reducidas (2, 12).

El ATP y los reductores necesarios como soportes para la fijación de nitrógeno en asociaciones simbióticas provienen de los productos fotosintéticos producidos por la planta.

La conversión de una molécula de  $\text{N}_2$  en dos moléculas de  $\text{NH}_3$  requiere alrededor de 24 moléculas de ATP (8, 12, 18).

Parte de la energía requerida para la fijación biológica de nitrógeno se usa para romper la triple unión del  $\text{N}_2$  que es muy estable.

Experimentos con nitrogenasa, provenientes de varios organismos, han mostrado que aproximadamente el 75% del flujo de electrones a través de la nitrogenasa se utiliza en la reducción de  $\text{N}_2$  a  $\text{NH}_3$ , y el remanente, o sea el 25% se utiliza en la evolución del  $\text{H}_2$  (8, 14).

En la ausencia de  $\text{N}_2$  o de cualquier otro sustrato reducible que se adicione, todo el flujo de electrones a través de la nitrogenasa se utiliza en la reducción de protones a  $\text{H}_2$ , en un proceso que es dependiente del ATP (8). La pérdida de  $\text{H}_2$ , la cual requiere alrededor de 4 moléculas de ATP por mol de  $\text{H}_2$ , es importante porque hay evidencia que la cantidad de fotosintetizado aprovechable al nódulo puede ser un factor primario limitante de la fijación

de nitrógeno atmosférico (12).

### BIBLIOGRAFIA

1. ANDERSON, A. J. Molybdenum as a fertilizer. *Adv. Agron.* 8:163-202. 1956.
2. ATLAS, R. M. and BARTA, R. *Microbial ecology; fundamentals and applications.* London, 1981. Addison-Wesley Publishing Co., London, 1981. 560 p.
3. BERGENSEN, F. J. Biochemistry of symbiotic nitrogen fixation in legumes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 22: 121-140. 1971.
4. BURNS, R. C. and HARDY, R. W. F. Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. *Spring-Verlag, New York,* 1975. 189 p. *Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics* 21.
5. BURRIS, R. H. Methodology. p. 9-33. In A. Quispel (ed.). *The biology of nitrogen fixation.* North Holland Publish Co., Amsterdam, 1974. *Frontiers of Biology.* Vol. 33.
6. CARTWRIGHT, B. and HALLWORTH, E.G. Effects of copper deficiency on root nodules of subterranean clover. *Plant Soil* 33:685-698. 1970.
7. DATE, R. A. Physical factors affecting field nodulation and nitrogen fixation: nodulation difficulties related to low pH. p. 261-262. In A. H. Gibson, and W. E. Newton. (eds.). *Current perspectives in nitrogen fixation.* Proc. 4th Int. Symp. on Nitrogen Fixation. Amsterdam, 1981. Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
8. EMERICH, D. H. and EVANS, H. J. Biological nitrogen fixation with emphasis on the legumes. p. 117-145. In *Biochemical and photosynthetic aspects of energy production.* New York, 1980. Academic Press.
9. EVANS, H. J. and RUSSELL, S.A. *Physiological chemistry*

- of symbiotic nitrogen fixation by legumes. p. 191-244. In J. R. Postgate (ed.). *The chemistry and biochemistry of nitrogen fixation.* Plenum Press, London, 1971.
10. GIBSON, A. H. Physical factors affecting field nodulation and nitrogen fixation; combined nitrogen and legume nodulation. p. 263-264. In A. H. Gibson, and W. E. Newton (eds.) *Current perspectives in nitrogen fixation.* Proc. 4th Int. Symp. on Nitrogen Fixation. Amsterdam, 1981. Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
  11. HARDY, R. W. F., and HOLSTEN, R. D. Methods for measurement of dinitrogen fixation. p. 451-482. In R. W. F. Hardy and A. H. Gibson (eds.). *A treatise on dinitrogen fixation.* Sec. IV. Agron. and Ecol. New York, 1977. John Wiley.
  12. HARDY, R. W. F., and HAVELKA, U.D. Nitrogen fixation research: a key to world food?. *Science* 188:633 - 643. 1975.
  13. HEICHEL, G. H., BARNES, D. K. and VANCE, C. P. Nitrogen fixation of alfalfa in the seedling year. *Crop Sci.* 330-335. 1981.
  14. LARUE, T.A. and PATTERSON, G. How much nitrogen do legumes fix? *Adv. Agron.* 34-15-38. 1981.
  15. MUNNS, N. D. Nodulation of *Medicago sativa* in solution culture. V. Calcium and pH requirements during infection. *Plant Soil* 32:90-102. 1970.
  16. MUNNS, N. H. Mineral nutrition and the legume symbiosis. p. 353-391. In R. W. F. Hardy, and A. H. Gibson (eds.). *A treatise on dinitrogen fixation.* Sec. IV. Agron. and Ecol. New York, 1977. John Wiley.
  17. NELSON, D. W., and SUMMERS, L. E. Determination of total nitrogen in plant material. *Agron. J.* 65:109-112. 1973.
  18. POSTGATE, J. R. *The fundamentals of nitrogen fixation.* Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1982. 252 p.