

FIJACION Y ASIMILACION DE NITROGENO EN NODULOS DE *Lotus corniculatus*.

S. Gonnet¹, P. Díaz¹⁻² y O. Borsani¹

Recibido: 7 de julio de 1998. Aceptado: 2 de setiembre de 1998.

RESUMEN

Se estudió la variación de las actividades de las enzimas de asimilación de amonio en nódulos de *Lotus corniculatus* entre los 14 y 28 días después de la inoculación con *Rhizobium loti* cepa U226. En el mismo período se estudió la variación de la actividad nitrogenasa, el peso seco de las plantas y el peso fresco de nódulo. Las actividades de las enzimas glutamino sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT) y nitrogenasa aumentaron durante el desarrollo del nódulo. A catorce días después de la inoculación, las actividades de las enzimas GS y GOGAT del nódulo superaban en 30 veces a las actividades encontradas en raíz. Los valores máximos de las actividades de las enzimas en nódulos de *L. corniculatus* se alcanzaron 28 días después de la inoculación.

PALABRAS CLAVES: desarrollo del nódulo, glutamato sintasa, glutamino sintetasa, nitrogenasa, *Lotus corniculatus*

SUMMARY

NITROGEN FIXATION AND ASSIMILATION IN *Lotus corniculatus* NODULES

Ammonia assimilation enzymes were measured in nodules of *Lotus corniculatus* between 14 and 28 days after inoculation with *Rhizobium loti* U226 strain. Plant dry weight, nodule fresh weight and nitrogenase activity were also measured. *L. corniculatus* nodule glutamine synthetase (GS), glutamate synthase (GOGAT) and nitrogenase activities increased during nodule development. Fourteen days after inoculation nodule GS and GOGAT activities were 30-fold higher than in roots. The highest values of nodule enzymes in *L. corniculatus* were found in 28 days old plants.

KEY WORDS: glutamate synthase, glutamine synthetase, nitrogenase, nodule development, *Lotus corniculatus*.

INTRODUCCION

En Uruguay el género *Lotus* es usado en praderas y presenta ventajas respecto a otras leguminosas introducidas, tales como su capacidad de autosiembra y no producir meteorismo (Danso *et al.*, 1991). Si bien existen diversos estudios microbiológicos y genéticos sobre cepas de *Rhizobium* que nodulan *Lotus sp* (Cooper *et al.*, 1987; Jarvis *et al.*, 1982; Monza *et al.*, 1992; Irisarri *et al.*, 1996), la información sobre parámetros bioquímicos y fisiológicos de la simbiosis es menos abundante (Díaz *et al.*, 1995).

El amonio producido por fijación biológica de nitrógeno en los nódulos de las leguminosas es asimilado por las enzimas GS y GOGAT de la planta (Mifflin and Cullimore, 1984). Las enzimas GS y GOGAT son productos génicos que se inducen o aumentan en el nódulo al iniciarse la fijación biológica de nitrógeno (Egli *et al.*, 1989). Las actividades de estas enzimas, así como la actividad nitrogenasa y el contenido de leghemoglobina, aumentan durante el desarrollo del nódulo (Cullimore and Bennett, 1988; Vance and Griffith, 1990; Franssen *et al.*, 1992).

En este trabajo se estudió la evolución de la actividad de las enzimas de la fijación de nitrógeno y asimilación de amonio durante el desarrollo del nódulo en la simbiosis *L. corniculatus* - *R. loti*.

MATERIALES Y METODOS

Material biológico y condiciones de crecimiento

Se utilizó *L. corniculatus* cv La Estanzuela San Gabriel (AGROSAN S.A.) inoculado con *R. loti* cepa U226 (=B816,

¹ Laboratorio de Bioquímica. Facultad de Agronomía. ² Unidad Asociada Fijación Biológica de Nitrógeno. Facultad de Ciencias. Av. E. Garzón 780. CP12900 Montevideo - Uruguay.
Correspondencia: Susana Gonnet, Laboratorio de Bioquímica. Facultad de Agronomía. Av. E. Garzón 780. CP12900 Montevideo - Uruguay. Fax. 0598 2 3093004. E-mail: sgonnet@bioq.edu.uy

obtenida del Department of Microbiology, University of New South Wales, Kensington, Australia).

Las semillas fueron esterilizadas superficialmente según Vincent (1970) y pregerminadas sobre papel húmedo en placas de Petri. Las plantas se cultivaron en jarras Leonard con vermiculita y arena (3:1) como soporte y como solución nutritiva se usó la descrita por Rigaud y Puppo (1975), sin nitrógeno. Las plantas, a razón de 10 por jarra, se cultivaron en cámara de crecimiento con fotoperíodo de 16/8 h (luz/oscuridad), 500 $\mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ (400-700nm) de intensidad lumínica y 25/18°C de temperatura (día/noche). La inoculación se realizó con una suspensión de bacterias que contenía 10^9 UFC/mL, a razón de 1 mL por planta, 24 h después de la siembra.

Diseño experimental y cosecha de material

En 6 tiempos, entre los 14 y los 28 días después de la inoculación, se cosecharon las plantas y se separaron raíces de parte aérea. Parte de las raíces noduladas se utilizó para la determinación de la actividad nitrogenasa y el resto para separar los nódulos a efectos de preparar los extractos donde medir las actividades GS y GOGAT.

Extracción de enzimas

Los nódulos fueron macerados con un tampón fosfato 50mM pH 7.6 optimizado para ensayar simultáneamente GS y GOGAT, que contenía 2-mercaptoetanol 12.5mM, EDTA.Na₂ 5mM, sacarosa 14.6mM, KCl 100mM y 20% de polivinilpolipirrolidona. En el extracto, luego de filtrado con tela y centrifugado durante 20 min a 20000g, se midieron las actividades enzimáticas. Todo el procedimiento de extracción se realizó entre 0-4°C y la actividad GOGAT fue medida durante la primera hora luego de la extracción debido a la inestabilidad de esta enzima (Robertson *et al.*, 1975b; Boland *et al.*, 1978).

Ensayos enzimáticos

La actividad GS se midió por el método biosintético según Lea *et al.* (1990) y se expresó como μmol gama glutamilhidroxamato/gramo de peso fresco de nódulo. hora (μmol GH/gPFnód.h). La actividad NADH-GOGAT se midió siguiendo la disminución de absorbancia a 340nm por oxidación del NADH (Awonaike *et al.*, 1981) con el agregado de aminoacetoacetato para inhibir transaminasas (Anderson *et al.*, 1989) y se expresó como μmol NADH oxidado/gramo de peso fresco de nódulo. hora (μmol NADHox./gPFnód.h). La actividad nitrogenasa medida como actividad reductora del acetileno (ARA) se determinó por cromatografía gaseosa (Hardy *et al.*, 1973) y se expresó en μmol de C₂H₄/gPFnód.h.

Determinaciones analíticas

Las proteínas en los extractos vegetales se cuantificaron por el método de Bradford (1976) y el peso seco de las plantas se determinó luego de mantenerlas en estufa a 70°C hasta peso constante.

RESULTADOS Y DISCUSION

La evolución de los parámetros de crecimiento de las plantas entre los 14 y los 28 días después de la inoculación mostró que el peso seco de éstas, así como el peso fresco de nódulos por planta tuvieron un aumento continuo durante el período (Fig. 1).

La proteína soluble de los nódulos no presentó variaciones significativas entre los 14 y 28 días luego de la inoculación (Fig. 1). A partir del día 17 después de la inoculación la proteína soluble de los nódulos mostró una tendencia a descender. Un comportamiento similar observaron Reynolds *et al.*, (1982) a partir del día 19 en un estudio realizado con nódulos de *Glycine max.* *L. corniculatus* presenta nódulos determinados, que evolucionan de incoloros a rosados y se vuelven verdosos cuando son senescentes, pudiendo una misma planta presentar nódulos en todos los estadios (Vance *et al.*, 1981). En las condiciones de cultivo de nuestro ensayo, a partir de los 17 días luego de la inoculación, aparecieron algunos nódulos senescentes. La disminución de proteína soluble observada a partir de ese día podría explicarse por la desintegración de bacteroides que se produce en este tipo de nódulos (Vance *et al.*, 1981).

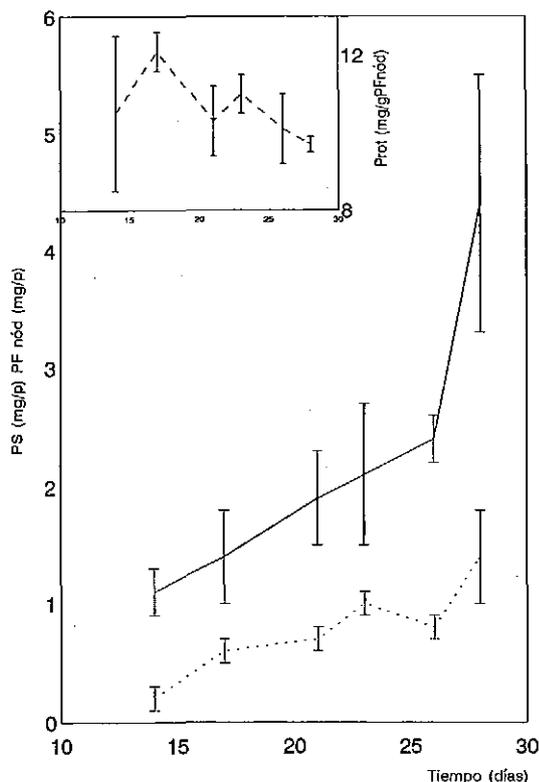


Figura 1. Evolución de peso seco de las plantas (línea continua), peso fresco de nódulo (línea punteada) y contenido de proteína de nódulos (recuadro superior) de *L. corniculatus* inoculado con *R. loti* cepa U226 entre los 14 y 28 días después de la inoculación.

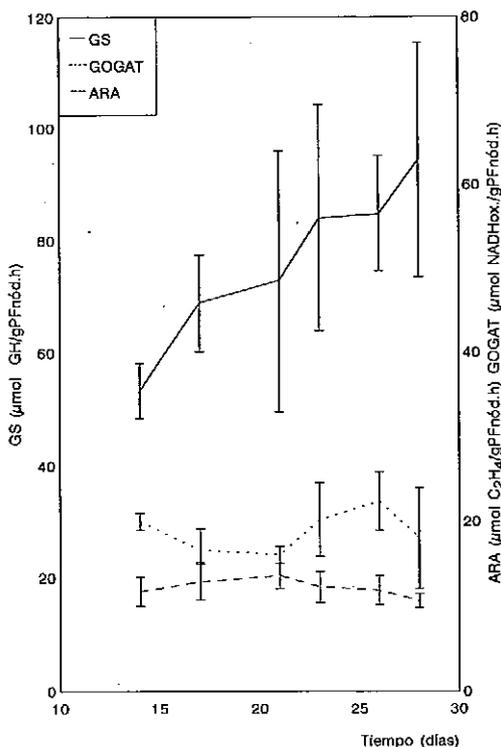


Figura 2. Evolución de las actividades GS, GOGAT y ARA de nódulos de *L. corniculatus* inoculado con *R. loti* cepa U226 entre los 14 y 28 días después de la inoculación.

Durante el período de desarrollo nodular estudiado en este trabajo, la actividad de la enzima GS presentó mayor variación que las actividades ARA y GOGAT (Fig. 2). La actividad GS medida en raíces no noduladas de plantas de *L. corniculatus* de 14 días fue de $1.3 \mu\text{mol GH/gPFnód.h}$ mientras que en nódulos de plantas de la misma edad la actividad GS fue 40 veces mayor (Fig. 2). Entre los 14 y los 28 días después de la inoculación, la actividad GS del nódulo se incrementó aproximadamente al doble (Fig. 2). La máxima actividad GS en *L. corniculatus* fue mayor que la encontrada en *Medicago sativa* (Groat and Vance, 1981) y en *Phaseolus vulgaris* (Lara et al., 1983), pero fue menor que la encontrada en *Vicia faba* (Caba J.M. 1991, Tesis doctoral).

Las actividades GOGAT y ARA (Fig. 2) no variaron significativamente durante el período estudiado. La actividad GOGAT se mantuvo en el orden de $20 \mu\text{mol NADHox./gPFnód.h}$. Sin embargo, considerando la actividad en las raíces no noduladas ($0.6 \mu\text{mol NADHox./gPFnód.h}$), la actividad GOGAT en nódulos de 14 días, fue 37 veces mayor. El máximo de actividad GOGAT de nódulos de *L. corniculatus* fue menor que el encontrado en nódulos de *M. sativa* (Jessen et al., 1987) y en *V. faba* (Caba J.M. 1991, Tesis doctoral). El valor máxi-

mo de ARA fue similar al obtenido para otras simbiosis de *L. corniculatus* con distintas cepas de *R. loti* (Gonnet S. 1994, Tesis maestría; Monza et al., 1997).

Según las variaciones de las actividades enzimáticas GS, GOGAT y ARA encontradas en otras leguminosas (Reynolds et al., 1982; Robertson et al., 1975ab; Bennett and Cullimore, 1989; Chen and Cullimore, 1988; Egli et al., 1989; Werner et al., 1980), se definen en nuestro trabajo tres etapas en el desarrollo del nódulo. En la primera etapa, las tres actividades enzimáticas se incrementan entre 5 y 20 veces en un período de 6 a 9 días de duración. Este aumento comienza alrededor de los 11 días después de la inoculación, aunque en *M. sativa* comienza a los 7 días y en *G. max* comienza a los 15 días. En la segunda etapa, de unos 13 días de duración, la actividad GS aumenta hasta 2.5 veces mientras que las actividades GOGAT y ARA, se mantienen constantes. En la tercera etapa, se produce una disminución en las tres actividades enzimáticas que es más o menos pronunciada según la leguminosa.

La variación de las actividades GS, GOGAT y ARA observada en este trabajo, así como los valores de GS y GOGAT medidos en raíces no noduladas, permiten afirmar que en *L. corniculatus* la primera etapa es anterior a los 14 días después de la inoculación y que el período estudiado entre los 14 y los 28 días corresponde a la definida como segunda etapa. Los resultados de estudios similares al presente en períodos de hasta 60 días luego de la inoculación que se realizaron con *L. corniculatus* inoculado con U226 y cepas nativas, mostraron que las actividades GS, GOGAT y ARA descienden a partir de los 28 días (datos no mostrados) lo que correspondería a la tercera etapa anteriormente definida. El tamaño de los nódulos condicionó la elección del período para este estudio. Antes de los 14 días después de la inoculación, los nódulos de *L. corniculatus* eran demasiado pequeños para ser cosechados.

A los 28 días se alcanzaron los máximos de las actividades de las enzimas estudiadas en este par simbiótico. El mismo resultado se encontró con *L. corniculatus* inoculado con cepas nativas de *R. loti* (Gonnet S. 1994, Tesis maestría).

Los pares simbióticos seleccionados por su alta tasa de fijación de nitrógeno muchas veces no son los que producen mayor rendimiento en peso seco de la planta y por eso en algunas leguminosas se han estudiado las enzimas de asimilación de amonio como parámetros a ser considerados en la selección de genotipos (Jessen et al., 1987). A partir de los datos obtenidos en este trabajo se podría estudiar esta posibilidad en *L. corniculatus*.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Swedish Agency for Research Cooperation with Developing Countries (SAREC) por el financiamiento de este trabajo. S.G. agradece al Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA).

BIBLIOGRAFIA

- ANDERSON M., VANCE C., HEICHEL G. and MILLER S. 1989. Purification and characterization of NADH glutamate synthase from alfalfa root nodules. *Plant Physiol.* 90:351-358.
- AWONAIKE K., LEA P. and MIFLIN B. 1981. The location of enzymes of ammonia assimilation in root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Sci. Lett.* 23:189-195.
- BENNETT M. and CULLIMORE J. 1989. Glutamine synthetase isoenzymes of *Phaseolus vulgaris* L. subunits composition in developing root nodules and plumules. *Planta* 179:433-440.
- BOLAND M.J., FORDYCE A.M. and GREENWOOD R.M. 1978. Enzymes of nitrogen metabolism in legume nodules: A comparative study. *Aust. J. Plant Physiol.* 5:553-559.
- BRADFORD M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- CHEN F. and CULLIMORE J. 1988. Two isoenzymes of NADH-dependent glutamate synthase in root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. Purification properties and activity changes during nodule development. *Plant Physiol.* 88:1411-1417.
- CABA J.M. 1991. Variabilidad genotípica del metabolismo simbiótico en *Vicia Faba*: efecto del nitrato. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada.
- COOPER J.E., BJORSON A.J. and THOMPSON J.K. 1987. Identification of *Lotus* rhizobia by direct DNA hybridization of crushed root nodules. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:1705-1707.
- CULLIMORE J.V. and BENNETT M.J. 1988. The molecular biology and biochemistry of plant glutamine synthetase from root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. and other legumes. *J. Plant Physiol.* 132:387-393.
- DIAZ P., BORSANI O. and MONZA J. 1995. Effect of inoculation and nitrate on nitrate reductase activity and acetylene reduction activity in *Lotus* sp.-*Rhizobium loti* symbiosis. *Symbiosis* 19:53-63.
- DANSO S., CURBELO S., LABANDERA C., and PASTORINI D. 1991. Herbage yield and nitrogen fixation in a triple-specie mixed sward of white clover, lotus and fescue. *Soil Biol. Biochem.* 23:65-70.
- EGLI M.A., GRIFFITH S.M., MILLER S.S., ANDERSON M.P. and VANCE C.P. 1989. Nitrogen assimilating enzyme activities and enzyme protein during development and senescence of effective and plant gene-controlled ineffective alfalfa nodules. *Plant Physiol.* 91:898-904.
- FRANSSEN H.J., NAP J-P. and BISSELING T. 1992. Nodulins in root nodule development. In: *Biological Nitrogen Fixation*. Stacey G. Burris R.H. and Evans H.J. Eds. *Biological Nitrogen Fixation*, pp. 598-624 Chapman and Hall.
- GROAT R.G. and VANCE C.P. 1981. Root nodule enzymes of ammonia assimilation in alfalfa (*Medicago sativa* L.). Developmental patterns and response to applied nitrogen. *Plant Physiol.* 67:1198-1203.
- GONNET M.S. 1994. Asimilación de amonio y eficiencia simbiótica en nódulos de *Lotus corniculatus*. Tesis Maestría, PEDECIBA, Universidad de la República.
- HARDY R., BURNS R., and HOLSTEIN R. 1973. Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biol. Biochem.* 5:47-81.
- IRISARRI P., MILNITSKY F., MONZA J. and BEDMAR E.J. 1996. Characterization of rhizobia nodulating *Lotus subbiflorus* from Uruguayan soils. *Plant Soil* 180:39-47.
- JARVIS B., PANKHURST C. and PATEL J. 1982. *Rhizobium loti*, a new specie of legume root nodule bacteria. *Int. J. Syst. Bact.* 32:378-380.
- JESSEN D.L., BARNES D.K., VANCE C.P. and HEICHEL G.H. 1987. Variation for activity of nodule nitrogen and carbon assimilating enzymes in alfalfa. *Crop Sci.* 27:627-631.
- LARA M., CULLIMORE J.V., LEA P.J., MIFLIN B.J., JOHN-SON A.W.B. and LAMB J.W. 1983. Appearance of a novel form of plant glutamine synthetase during nodule development in *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 157:254-258.
- LEA P.J., BLACKWELL R.D. CHEN F-L. and HECHT U. 1990. Enzymes of ammonia assimilation. In: *Enzymes of primary metabolism*. P.J. Lea (Ed.). pp 257-276, Academic Press Limited.
- MIFLIN B.J. and CULLIMORE J.V. 1984. Nitrogen assimilation in the legume - *Rhizobium* symbiosis: A joint endeavour. In: *Genes involved in Microbe - Plant Interactions*. Verma D.P.S. and Hohn T. (Eds.). pp 129-196, Springer Verlag, Wien.
- MONZA J., DIAZ P., BORSANI O., RUIZ-ARGÜESO T. and PALACIOS J. 1997. Evaluation and improvement of the energy efficiency of nitrogen fixation in *Lotus corniculatus* nodules induced by *Rhizobium loti* strains indigenous to Uruguay. *World J. Microb. Biotech.* 13:565-571.
- MONZA J., FABIANO E. and ARIAS A. 1992. Characterization of an indigenous population of rhizobia nodulating *Lotus corniculatus*. *Soil Biol. Biochem.* 24:241-247.
- REYNOLDS P., BOLAND M.J., BLEVINKS D.G., SHUBERT K.R., and RANDALL D.D. 1982. Enzymes of amide and ureide biogenesis in developing soybean nodules. *Plant Physiol.* 69:1334-1338.
- RIGAUD J. and PUPPO A. 1975. Indole-3-acetic catabolism by soybean bacteroids. *J. Gen. Microbiol.* 88:223-228.
- ROBERTSON J.G., FARNDEN K.J.F., WARBURTON M.P. and BANKS J-A.M. 1975a. Induction of glutamine synthetase during nodule development in lupin. *Aust. J. Plant Physiol.* 2:265-272
- ROBERTSON J.G., WARBURTON M.P. and FARNDEN K.J.F. 1975b. Induction of glutamate synthase during nodule development in lupin. *FEBS Lett.* 55:33-37.
- VANCE C. and GRIFFITH S. 1990. The molecular biology of N metabolism. In: *Plant Physiology, Biochemistry and Mole-*

- cular Biology. D. Dennis and Turpin D (Eds.) pp. 373-388. Longman Scientific & Technical.
- VANCE C., JOHNSON L., STASE S. and GROAT G. 1981. Birds-foot trefoil (*Lotus corniculatus*) root nodules: morphogenesis and the effect of forage harvest on structure and function. Can. J. Bot. 60:505-518.
- VINCENT J. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. I.B.P. Handbook N°15 Blackwell, Oxford.
- WERNER D., MORSCHER E., STRIPF R. and WINCHENBACH B. 1980. Development of nodule of *Glycine max* infected with an ineffective strain of *Rhizobium japonicum*. Planta 147:320-329.