

# Revisión bibliográfica INFLUENCIA DE LA SEQUÍA SOBRE EL METABOLISMO DEL NITRÓGENO FIJADO DURANTE LA SIMBIOSIS *Bradyrhizobium*-SOYA

J. A. Freixas<sup>✉</sup>, Inés M. Reynaldo y María C. Nápoles

**ABSTRACT.** Soybean (*Glycine max* L. Merr.) establishes symbiosis with N<sub>2</sub>-fixing bacteria of the Rhizobia group, such as *Bradyrhizobium* sp. Specific molecules secreted by *Bradyrhizobium*, named nodulation factors, play a pivotal role in the development of root nodule. Inside nodules, rhizobia are differentiated into bacteroids, which reduce atmospheric nitrogen into ammonia. The major part of ammonia is assimilated into glutamine, which participates indirectly in nodule ureide synthesis. Among the leguminous family, soybean is one of the most sensitive to drought stress, which leads to a significant decrease in the biological nitrogen fixation (BNF). Drought-sensitive soybean genotypes accumulate ureides during drought stress; however, drought-tolerant genotypes have lower shoot ureide concentrations, which seem to alleviate drought stress on BNF. Researches based on new tools to increase BNF have been a priority during the last decade. Manganese fertilization under moderate drought conditions increases the catabolism of ureides and N<sub>2</sub> fixation in soybean. The enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase in *Rhizobium* cleaves ACC, the immediate precursor of ethylene in plants, decreasing the inhibitory effect of ethylene on nodulation. Induction of nodulation genes in *Bradyrhizobium* has positive effects on soybean growth under moderate drought stress. The aim of this review is focused to enclose new molecular targets that allow improving BFN in soybean under drought stress conditions.

**RESUMEN.** La soya (*Glycine max* L. Merr.) establece simbiosis con bacterias fijadoras del nitrógeno de la familia de los rizobios; específicamente con bacterias del género *Bradyrhizobium*. Los rizobios secretan moléculas específicas denominadas factores Nod, que juegan un papel importante en el desarrollo del nódulo radicular. En el nódulo, los rizobios son diferenciados en bacteroides, donde ocurre la fijación biológica del nitrógeno (BNF) y se produce amonio. La mayor parte del amonio es asimilado en glutamina, que participa indirectamente en la síntesis de ureidos. La soya se considera una de las plantas leguminosas más sensibles al estrés por sequía, con una disminución significativa en la BNF. Los ureidos se acumulan en plantas de soya sensibles a la sequía durante el déficit hídrico, mientras que las plantas tolerantes presentan bajas concentraciones de ureidos que pueden reducir el estrés sobre la BNF. Se han realizado investigaciones dirigidas a incrementar la BNF en condiciones de estrés por sequía. La fertilización con manganeso en condiciones moderadas de déficit hídrico incrementa la degradación de los ureidos y la BNF. La enzima ACC desaminasa en los rizobios degrada el ACC, precursor inmediato del etileno en las plantas, y disminuye los efectos inhibitorios del etileno en la nodulación. La inducción de los genes de la nodulación en *Bradyrhizobium* sp. ha mostrado efectos positivos en el crecimiento de la soya en condiciones moderadas de sequía. El objetivo de esta revisión bibliográfica está dirigido a relacionar nuevos blancos moleculares que permitan incrementar la BNF en condiciones de estrés por sequía.

**Key words:** soybeans, *Bradyrhizobium*, drought stress, nodulation, enzymes, nitrogenase, ureides

**Palabras clave:** soya, *Bradyrhizobium*, estrés de sequía, nodulación, enzimas, nitrogenasa, ureidos

## Abreviaturas:

Ácido abscísico (ABA; del inglés *abscissic acid*), fijación biológica del nitrógeno (BNF, del inglés *Biological Nitrogen Fixation*), 1-Aminociclopropano-1-Ácido Carboxílico (ACC, del inglés 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate), factores de la nodulación (factores Nod), DMI3 (del inglés *Doesn't Make Infection*), Glutamina Sintetasa (GS), Glutamato Sintetasa (GOGAT, del inglés *Glutamine Oxoglutarate Aminotransferase*), Isoforma Citosólica de la Enzima Glutamina Sintetasa (GS1), Glutamato Deshidrogenasa (GDH), Trifosfato de Adenosina (ATP, del inglés *Adenosine Triphosphate*) y Difosfato de Adenosina (ADP, del inglés *Adenosine Diphosphate*).

J. A. Freixas, Reserva Científica, Dra.C. Inés M. Reynaldo y Dra.C. María C. Nápoles, Investigadoras Titulares del departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), gaveta postal 1, San José de las Lajas, La Habana, CP 32 700.

✉ freixas@inca.edu.cu

## INTRODUCCIÓN

La interacción simbiótica entre las bacterias fijadoras de nitrógeno y las plantas leguminosas se establece a través de un intenso intercambio de señales entre ambos simbioses, donde se destaca la liberación de compuestos isoflavonoides por la raíz, que inducen la síntesis de los factores de la nodulación en la bacteria (1, 2). Como resultado tiene lugar en la raíz la formación del nódulo especializado, que garantiza

la reducción del nitrógeno atmosférico a través de la enzima nitrogenasa y el suministro adecuado de amonio a la planta en forma de ureidos y amidas (1, 3). La fijación biológica del nitrógeno en la soya es un proceso metabólico altamente sensible al estrés por déficit hídrico (3). Por tanto, un aumento en la fijación biológica del nitrógeno, en estas condiciones de estrés, podría constituir un indicativo de tolerancia a la sequía.

Hay adaptaciones en genotipos de soya tolerantes a la sequía, que permiten un mayor catabolismo de los ureidos en presencia de manganeso (3, 4). La acumulación de estos compuestos nitrogenados en condiciones de déficit hídrico tiene lugar en las hojas y los nódulos, y constituyen los principales inhibidores de la fijación biológica del nitrógeno (3). Se ha demostrado que los factores de la nodulación pueden inducir tolerancia al estrés en condiciones moderadas de déficit hídrico (5, 6). Otras investigaciones apuntan a la presencia de mecanismos en los rizobios, que disminuyen los efectos inhibitorios del etileno en la nodulación (7, 8).

En los últimos años, ha tenido prioridad la búsqueda de nuevas herramientas moleculares, que permitan estudiar la tolerancia al estrés por déficit hídrico. El objetivo de este trabajo consiste en relacionar los posibles mecanismos de inducción de tolerancia al estrés por sequía, con el incremento de la fijación biológica del nitrógeno en variedades de soya.

## RELACIÓN SIMBIÓTICA *Bradyrhizobium*-SOYA

La soya (*Glycine max* L. Merr.) se incluye dentro de la familia de las Fabaceae y es capaz de establecer simbiosis con bacterias fijadoras del nitrógeno de la familia de los rizobios (9, 10). Durante el crecimiento de la soya, los rizobios son capaces de detectar isoflavonas secretadas por la raíz de la planta, las cuales inducen los genes de la nodulación en la bacteria (9, 11, 12). Los genes de la nodulación codifican aproximada-

mente 25 proteínas requeridas para la síntesis y secreción de los factores de la nodulación (1). La estructura básica de los factores Nod en diferentes especies de rizobios es muy similar. En general, consiste en un esqueleto de  $\alpha$ -1,4-*N*-acetil-D-glucosamina con 4 ó 5 residuos, en los cuales el extremo no reductor es sustituido en el carbono 2 por una cadena acilada (10, 12). En dependencia de la especie de rizobio, la estructura de la cadena acilada puede variar y también las sustituciones tanto en el extremo reductor como en el no reductor de la molécula (11, 13).

Los factores Nod inducen respuestas en las plantas a concentraciones picomolares (14). Por tanto, se considera que estas moléculas sean reconocidas por receptores de alta afinidad (12, 14, 15). La primera respuesta que se ejecuta, cuando se unen los factores Nod a sus receptores, se basa en la apertura de canales de calcio, que permiten la entrada del calcio al medio interno celular, provocando la despolarización de la membrana citoplasmática (16). El papel preciso de estas oscilaciones iónicas no ha sido demostrado, pero ha sido útil para dilucidar la función fisiológica de los factores Nod en leguminosas como la soya (14, 17). Estudios bioquímicos demuestran que luego de la percepción de los factores Nod, se inducen vías de señalización mediadas por proteínas G y señales de naturaleza lipídica, cuya respuesta se ejecuta en el núcleo y se traduce en la formación del nódulo radicular (10, 16).

Las bacterias del género *Bradyrhizobium* inducen la morfogénesis del nódulo en la soya (9). Para ello, las células bacterianas se diferencian cuando alcanzan la célula vegetal hospedera y forman el bacteroide, que en su conjunto con la membrana de la célula vegetal dan lugar al simbiosoma del nódulo (10, 17). Existen dos clasificaciones para los nódulos de las leguminosas según su crecimiento: determinados e indeterminados (1). Los nódulos de la soya se incluyen dentro del grupo de los determinados, cuya estructura

ha sido bien caracterizada (18). La región simbiótica del nódulo se identifica fácilmente por el color rojo de una proteína específica denominada leghemoglobina (Lb) (19). Su función principal se basa en la unión al oxígeno para formar un complejo, que disminuye la presión parcial de este gas alrededor de la enzima nitrogenasa (18). Esta enzima es la responsable de la fijación biológica del nitrógeno y se desnaturaliza irreversiblemente por el oxígeno. Por tanto, la proteína Lb garantiza el óptimo funcionamiento de la enzima nitrogenasa (20).

La interacción simbiótica *Bradyrhizobium*-soya es un proceso altamente regulado por un mecanismo inhibitorio, donde el etileno juega un papel importante. La proteína DMI3, aunque está involucrada en la transducción de señales de los factores Nod, también participa en un mecanismo de regulación negativa en su propia ruta de señalización (21). El etileno presenta efectos negativos en la formación del nódulo, reduciendo totalmente las oscilaciones de calcio intracelulares (10, 22).

El gen que codifica para la enzima 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico oxidasa, la cual cataliza la conversión del 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) en etileno, se expresa en las células del periciclo, lo cual sugiere que el etileno se produce en este tipo de célula (7). Los mutantes de leguminosas insensibles al etileno presentan un mayor número de primordios nodulares que las plantas salvajes (22). Por tanto, el etileno constituye un inhibidor en la progresión de la infección, determinando el sitio específico de la raíz donde se formaría el primordio nodular (7). La mayoría de estos efectos se justifican por la capacidad del etileno de inhibir en la planta la percepción de los factores Nod, así como la transducción de señales (1).

□ En diversas cepas de rizobios, se ha demostrado la presencia de mecanismos que disminuyen los niveles del etileno liberado por la planta. El rizobio utiliza el ACC exudado por la raíz y lo degrada en amonio y  $\alpha$ -cetobutirato por la acción

enzimática de la ACC desaminasa (7, 8). La planta continúa exudando ACC, con el objetivo de equilibrar los niveles externos e internos de este metabolito. Esto conlleva al origen de un gradiente dirigido hacia la degradación del ACC en el rizobio, que inhibe la biosíntesis del etileno. De esta forma, disminuyen las concentraciones del etileno en la planta, facilitando la disminución de sus efectos inhibitorios sobre la nodulación (7, 8).

## METABOLISMO DEL NITRÓGENO EN LA SOYA

La asimilación del nitrógeno inorgánico en la soya constituye un proceso complejo que involucra rutas metabólicas bien acopladas y catalizadas enzimáticamente (20). El amonio constituye el producto inicial de la ruta, que se obtiene a partir de la reducción del nitrógeno atmosférico catalizada por la enzima nitrogenasa (23). También el amonio puede ser incorporado a partir de la reducción enzimática de compuestos nitrogenados inorgánicos absorbidos por la planta (24).

La incorporación del amonio a los esqueletos carbonados para dar lugar a los aminoácidos puede proceder por dos vías fundamentales (18): la primera transcurre mediante las enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT), donde finalmente se producen dos moléculas de glutamato y se consume una molécula de ATP (20, 25), mientras que la otra vía consiste en la aminación reversible del  $\alpha$ -cetoglutarato por la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH), produciéndose glutamato (24). Aunque la vía GS/GOGAT presenta mayor costo energético que la vía catalizada por la enzima GDH, la enzima GS presenta un valor de Km inferior al de la enzima GDH. Esto sugiere que la vía GS/GOGAT sea preferencial, por permitir la asimilación del amonio a concentraciones inferiores que los niveles tóxicos para la planta (18, 24).

En la soya, el destino final del amonio resultante de la simbiosis tiene lugar en la formación de ureidos, que

se sintetizan en los nódulos y se transportan hacia las hojas a través del xilema (3, 25). En contraste, el transporte de amonio asimilado a partir de la absorción de nitratos transcurre en forma de aminoácidos, fundamentalmente la asparagina. Este aminoácido se obtiene en las raíces a partir de la acción de las transaminasas y se transporta hacia las hojas a través del xilema (23, 25). La razón por la cual los nódulos de la soya sintetizan ureidos mientras que las raíces sintetizan asparagina no ha sido completamente estudiada. Aunque pudiera sugerirse la presencia de un mecanismo de economía celular, si se compara la estructura de los ureidos con la asparagina. Los ureidos presentan cuatro átomos de carbono y cuatro de nitrógeno, lo cual es más eficiente para el transporte de nitrógeno que la asparagina, que solo presenta dos átomos de nitrógeno. La gran demanda de fuentes de carbono, que requieren los nódulos ante una activa fijación biológica del nitrógeno, concuerda con la eficiencia de los ureidos en transportar un número de átomos de nitrógeno equivalente al número de carbonos de su estructura.

*Bioquímica de la fijación biológica del nitrógeno.* La enzima nitrogenasa ha sido aislada y caracterizada a partir de diferentes bacterias diazotróficas que incluye al género de los rizobios (1). Esta enzima es una proteína dimérica que contiene una subunidad menor denominada proteína-hierro (Fe) o dinitrogenasa reductasa. La proteína-Fe está compuesta por dos subunidades idénticas ( $\alpha_2$ ) unidas por un *cluster* de [4Fe-4S] y presenta un sitio de unión a magnesio y ATP en cada subunidad (26).

Su actividad principal se basa en la liberación de electrones a la subunidad mayor de la nitrogenasa que es dependiente de molibdeno (Mo) y se denomina proteína-MoFe o dinitrogenasa. Esta subunidad polipeptídica está formada fundamentalmente por un *cluster* metálico, que constituye el sitio activo de la holoenzima (27). De esta forma, la proteína-MoFe contiene 2 polipéptidos

( $\alpha\beta$ ) y en su conjunto forman un dímero ( $\alpha_2\beta_2$ ). Cada subunidad  $\alpha$  se une a un cofactor MoFe y en la interfase de unión de la subunidad  $\alpha$  a la  $\beta$  se enlaza otro clúster metálico denominado P-*cluster* [8Fe-7S], que actúa como intermediario en la transferencia de electrones (26). Investigaciones realizadas en las diferentes isoenzimas de la nitrogenasa han permitido dilucidar los componentes del *cluster* metálico que conforman su sitio activo. La composición del *cluster* se basa en [7Fe-9S-1Mo-X-homocitrato], donde la densidad del elemento X ha sido correspondida con la del oxígeno, nitrógeno o carbono. Aunque el elemento X no ha sido identificado, se supone que corresponda al nitrógeno, porque constituye el átomo más energéticamente favorable para su fijación biológica (28).

El mecanismo de acción de la nitrogenasa ha sido bien dilucidado y el primer paso se basa en la activación de la subunidad menor o proteína-Fe. Esta etapa transcurre mediante la unión de dos moléculas de magnesio y ATP a sus sitios específicos y el *cluster* [4Fe-4S] en su estado reducido (2). Posteriormente, ocurre la unión de la proteína-Fe a una subunidad  $\alpha$  de la proteína-MoFe, garantizando la hidrólisis de las dos moléculas de ATP. Esta hidrólisis garantiza la transferencia de un electrón de la proteína-Fe al P-*cluster* de la proteína-MoFe. Consecutivamente, el electrón es transferido al cofactor MoFe, el cual se une al sustrato ( $N_2$ ) para que finalmente sea reducido a amonio ( $NH_4^+$ ) (26).

Posterior a cada evento de transferencia electrónica, la proteína-Fe se disocia, intercambia ADP por ATP y el *cluster* [4Fe-4S] se disocia por una pequeña proteína que transfiere electrones (ferredoxina o flavodoxina) a partir de coenzimas reducidas provenientes de la respiración del bacterioide (29, 30). Este ciclo debe ser cumplido al menos ocho veces por cada molécula de dinitrógeno reducida y de dihidrógeno que se produce (26).

La estructura cristalográfica de la enzima nitrogenasa, aislada a partir

de diferentes especies de *Rhizobium*, ha permitido esclarecer el mecanismo de reducción del nitrógeno atmosférico (20). Asimismo, se han realizado observaciones relevantes que han permitido definir la disposición de las subunidades proteicas, así como la localización y el modelo de *clusters* metálicos que conforman el sitio activo de esta enzima. *Asimilación del amonio resultante de la simbiosis*. La mayor parte del amonio resultante de la fijación biológica del nitrógeno, se incorpora al citosol de las células vegetales infectadas con el simbionte mediante un transportador específico. Inmediatamente, la isoforma citosólica de la enzima glutamina sintetasa (GS1) cataliza la incorporación del amonio al glutamato, originándose la glutamina (31). En plantas leguminosas se han caracterizado dos isoformas de la enzima glutamina sintetasa, pero solo la GS1 está involucrada en la asimilación del amonio que se obtiene a partir de la simbiosis (23, 25, 32). Una pequeña porción de la glutamina resultante puede incorporarse al interior de los plastidios y por acción de la enzima GOGAT se transforma en glutamato (2). El glutamato puede ser reutilizado por una isoforma de la glutamina sintetasa identificada en cloroplastos (GS2) o metabolizarse en varios aminoácidos por acción de las transaminasas (32). La mayor parte de la glutamina sintetizada por la isoforma GS1, se inserta en la ruta de síntesis de las bases purínicas que conforman la estructura de los ácidos nucleicos (23, 25, 33). Una pequeña porción del amonio resultante de la fijación biológica, se inserta a la ruta GDH o puede utilizarse por la alanina deshidrogenasa (ADH) (31).

Algunos muestran evidencias donde la alanina constituye la forma de transporte del amonio desde el bacteroide hacia el citosol (34). Sin embargo, otros señalan que aunque el bacteroide puede sintetizar alanina mediante la enzima ADH (20), el amonio constituye el mayor compuesto de exportación hacia el citosol de las células vegetales infectadas por el rizobio.

Los ureidos, fundamentalmente la alantoína, constituyen la principal forma de transporte del amonio resultante de la simbiosis hacia las hojas de las plantas de soya (25, 35). La ruta metabólica que da origen a los ureidos transcurre a partir de la degradación de las bases purínicas en las células vegetales adyacentes al simbiosoma (2). Como resultado de esta vía catabólica se obtiene el ácido úrico, el cual se transforma en alantoína por la enzima urato oxidasa (2, 33, 35).

La alantoína se transporta a través del xilema hacia las hojas de la soya, donde se almacena en los peroxisomas y se traslada hacia el retículo endoplasmático para su degradación (4). El primer paso del catabolismo de los ureidos comienza mediante la degradación de la alantoína en alantoato por la enzima alantoinasa (36). A continuación, el alantoato se degrada por dos vías principales cuyos productos son utilizados en la síntesis de proteínas (30). En una de ellas actúa la enzima alantoato amidinohidrolasa, produciéndose urea, dióxido de carbono y amonio. La otra vía transcurre mediante la catálisis de la alantoato amidinohidrolasa, que utiliza manganeso como cofactor y se obtiene ureidoglicolato (30, 36). Evidencias experimentales sugieren que ambas rutas de degradación de los ureidos están presentes en el germoplasma de esta leguminosa (4).

## DÉFICIT HÍDRICO EN SOYA

El déficit hídrico puede provocar una considerable reducción del cultivo de la soya durante los períodos de crecimiento y desarrollo. Algunas investigaciones demuestran que la soya es más sensible al estrés por sequía que otras plantas leguminosas (35). Los principales mecanismos que utiliza esta planta para contrarrestar el estrés por sequía se basan en cambios en los niveles de prolina y hormonales (37). Estos últimos permiten redirigir el transporte del ácido abscísico (ABA) desde las raíces hacia las hojas (38), donde inducen

el cierre estomático para contrarrestar el déficit hídrico (37, 39). Adicionalmente, se conoce que el estrés por déficit hídrico estimula la producción del etileno en las plantas (40). Por tanto, la enzima ACC desaminasa que inhibe la síntesis del etileno en las raíces (7), puede ser efectiva para disminuir los efectos inhibitorios de esta hormona sobre la nodulación de las plantas de soya en condiciones de sequía (41).

El cierre estomático constituye un mecanismo de adaptación morfológica, que reduce la transpiración y disminuye el flujo de agua desde las raíces hasta las hojas de las plantas leguminosas sometidas a estrés por sequía (39). Al disminuir el flujo de agua por el xilema, disminuye el suministro de nutrientes hacia las hojas, que limita la síntesis de aminoácidos y proteínas (1). Asimismo, el cierre de los estomas impide la entrada de dióxido de carbono a las hojas, lo cual imposibilita el desarrollo de la fotosíntesis (42). Todos estos cambios morfofisiológicos que tienen lugar en la soya, durante el estrés por sequía, se traducen en un retardo del crecimiento y desarrollo de la planta (43).

Durante el déficit hídrico, la enzima sacarosa sintasa constituye la primera actividad enzimática que declina en los nódulos de la soya (30). La sacarosa constituye la principal fuente de carbono que transfieren las hojas hacia los nódulos y se hidroliza por la acción enzimática de la sacarosa sintasa o invertasa alcalina, produciéndose glucosa y fructosa (44). Se ha demostrado en mutantes de chícharo (*Pisum sativum*) deficientes de la enzima sacarosa sintasa, que su actividad es esencial para el funcionamiento del nódulo (30). En variedades de soya, sensibles y tolerantes al déficit hídrico, la disminución de la actividad sacarosa sintasa es modulada por modificaciones postranscripcionales (45). Debido a esta disminución de su actividad catalítica, se acumula sacarosa en el interior del nódulo, lo que implica una disminución en el suministro de esqueletos carbonados para la respiración del bacteroide (30).

Como resultado de un enlentecimiento en la respiración del bacteroide, el oxígeno no se utiliza y se acumula alrededor de la corteza nodular. Esto conlleva a una disminución de la presión parcial de ese gas en el interior del bacteroide, porque se induce una resistencia al oxígeno en la barrera que permite su difusión hacia el interior de las células infectadas (30). Esta disminución de la presión parcial de oxígeno podría proteger a la enzima nitrogenasa, pero resulta irrelevante porque esta enzima pierde actividad con el enlentecimiento de la respiración del bacteroide (45). La barrera que limita la difusión de oxígeno constituye una estructura altamente organizada por oclusiones intercelulares y respuestas osmocontráctiles, localizadas en la mitad y el interior de la corteza nodular, respectivamente (18). La morfología de esta barrera se modifica en condiciones de sequía por la disminución de la respiración del bacteroide, impidiendo la difusión del oxígeno e inhibiendo indirectamente la enzima nitrogenasa (44).

*Incidencia de la sequía en el metabolismo del nitrógeno fijado durante la simbiosis.* La sequía y su relación con la inhibición de la fijación del nitrógeno limitan el cultivo de la soya en diversas regiones áridas y semiáridas del mundo (30). Las implicaciones relacionadas con los efectos de la sequía en la fijación del nitrógeno se basan en la limitación de oxígeno y sustancias carbonadas al bacteroide y la regulación negativa a través del metabolismo del nitrógeno fijado durante la simbiosis (32, 46). La inhibición de la enzima nitrogenasa, durante el estrés por sequía, ha sido intensamente estudiada. En condiciones normales, la leghemoglobina garantiza un suministro adecuado del oxígeno a los componentes enzimáticos de la respiración del bacteroide, manteniendo una baja presión del gas alrededor de la nitrogenasa (18, 45). Ante un exceso de oxígeno en el interior del bacteroide, la nitrogenasa se desnaturaliza irreversiblemente (18, 32); sin embargo, una limitación

en la difusión de ese gas al interior del nódulo también podría inhibir la nitrogenasa (30).

En la soya, al disminuir el suministro de azúcares al bacteroide durante el estrés por sequía, se reduce la producción de coenzimas reducidas y de ATP, que son necesarios para el correcto funcionamiento de la nitrogenasa (30, 45). Adicionalmente, la disminución de la respiración del bacteroide conlleva a una transiente acumulación de oxígeno alrededor de las células infectadas, que podría constituir una protección para la enzima nitrogenasa (44). Sin embargo, la actividad de esta enzima disminuye por la ausencia de cofactores enzimáticos, que serían suministrados por la respiración del bacteroide en condiciones normales (47).

El metabolismo del nitrógeno tiene un papel preponderante en la regulación de la fijación biológica del nitrógeno en condiciones de déficit hídrico. Esta regulación sucede mediante un mecanismo de retroalimentación negativa, que se basa en la inhibición de la actividad nitrogenasa a partir de compuestos nitrogenados que se acumulan en el nódulo y las hojas (3). Paralelamente, se ha demostrado que la fijación del nitrógeno es más sensible a la sequía en leguminosas que lo transportan en forma de ureidos que en aquellas que lo hacen en forma de amidas (48).

Atendiendo a la soya y en respuesta al déficit hídrico, la fijación biológica del nitrógeno disminuye en genotipos sensibles a la sequía, mientras que los niveles de ureidos en las hojas aumentan (3). Asimismo, investigaciones realizadas en variedades de soya sensibles a la sequía y sometidas a este estrés (49), muestran una disminución en la actividad nitrogenasa y degradación de ureidos, así como un incremento de estos compuestos en las hojas. En contraste, estos efectos no se observan en variedades de soya tolerantes a la sequía y con déficit hídrico impuesto (3). Por tanto, bajas concentraciones de ureidos en hojas durante un déficit hídrico podría prolongar la fijación biológica del

nitrógeno y constituir un indicativo de tolerancia a la sequía. Sin embargo, cuando en el nódulo de la soya aumentan las concentraciones de ureidos o aspartato en condiciones de sequía, se inhibe la enzima nitrogenasa y no se evidencia una manifestación de tolerancia, tanto en variedades sensibles como en tolerantes al déficit hídrico (3, 36).

La acumulación de ureidos en el nódulo inhibe directamente la fijación biológica del nitrógeno durante el estrés por sequía (36); por ende, si se garantiza el transporte adecuado de ureidos desde el nódulo hacia las hojas, la fijación biológica del nitrógeno sería más eficiente. El gradiente para el correcto transporte de los ureidos depende de su catabolismo en las hojas y la velocidad de síntesis en el nódulo (30). Un incremento en la degradación de ureidos en las hojas implicaría una mayor demanda de estos compuestos, para suplir los procesos de síntesis de aminoácidos y proteínas. De esta forma, se lograría un mayor transporte de ureidos hacia las hojas, evitándose su acumulación en los nódulos y la inhibición de la enzima nitrogenasa.

La alantoína constituye el ureido de mayor acumulación en las hojas de la soya durante estrés por sequía (50), sin afectar la actividad de la enzima alantoato amidohidrolasa ni la actividad alantoinasa. Por tanto, su acumulación durante estrés hídrico podría ser el resultado de una retención en los peroxisomas, debido a que no disminuyen las actividades enzimáticas de su flujo catabólico (36). Estudios fisiológicos en la soya demuestran que un incremento en la fertilización con manganeso durante déficit hídrico, aumenta el catabolismo de ureidos en las hojas y prolonga la fijación biológica del nitrógeno (4).

En relación con la soya, existen informes que señalan una mayor absorción de manganeso en plantas tolerantes que en plantas sensibles al déficit hídrico (3). La enzima alantoato amidohidrolasa, que requiere manganeso como cofactor, presenta mayor actividad en genotipos de soya

tolerantes a la sequía que en los sensibles (4, 35). De este modo, existe una asociación entre los niveles de manganeso y la concentración de ureidos en las hojas. Teniendo en cuenta esta conclusión, se ha postulado la existencia de un mecanismo de regulación sobre la actividad de la enzima alantoato amidohidrolasa durante condiciones de sequía (35).

Existen antecedentes que demuestran una estructura multimérica para la enzima alantoato amidohidrolasa, pero el papel del manganeso en su ensamblaje aún queda por definir. Recientemente, teniendo en cuenta algunos experimentos (36), se ha propuesto que el ensamblaje de esta enzima probablemente es regulado por la disponibilidad de manganeso. En este caso, las variedades tolerantes a la sequía pueden ser más eficientes que las sensibles, en cuanto a la absorción del manganeso y un incremento en la actividad de la enzima alantoato amidohidrolasa, que garantizaría un mayor catabolismo del alantoato (36). La gran demanda de alantoato sugiere la existencia de un gradiente, a partir de la alantoína almacenada en los peroxisomas hacia el retículo endoplasmático para su degradación. De esta forma, los niveles de alantoína disminuyen en las hojas y las variedades de soya tolerantes al déficit hídrico mostrarían una menor concentración de ureidos que las sensibles. Resulta interesante que un incremento en la fertilización con manganeso en genotipos de soya sensibles a la sequía, ha mostrado inducción de tolerancia a este estrés y una disminución en los niveles de alantoína en las hojas (36).

En la literatura existen pocos análisis de biología molecular en la soya, que permitan identificar la expresión diferencial de genes durante condiciones de sequía (51, 52, 53). Una profunda caracterización de la regulación génica permitiría una mejor comprensión de los procesos adaptativos que tienen lugar en el nódulo en respuesta al estrés por

sequía. Se ha observado una acumulación de ABA en nódulos de soya durante el déficit hídrico, que permite la expresión del gen que codifica para la proteína ferritina (47). Los elevados niveles de ferritina probablemente eviten el estrés oxidativo ante condiciones de sequía. Ese estrés oxidativo se origina por un incremento en el citoplasma del hierro resultante del catabolismo de la leghemoglobina (53).

Existen estudios previos en raíces de soya, donde el estrés oxidativo no afecta la expresión de la isoforma GS1 a niveles transcripcionales (20). Recientemente, en plantas de soya tolerantes al déficit hídrico, se ha comprobado un incremento en los niveles de la enzima GS1 durante condiciones de sequía (53). La isoforma GS1 constituye la enzima que utiliza la mayor parte del amonio proveniente de la simbiosis (31), originando la glutamina que participa indirectamente en la ruta de síntesis de los ureidos (23). En condiciones de sequía, la degradación de ureidos en las hojas de la soya aumenta cuando se fertilizan las plantas con manganeso (36), lo cual sugiere un incremento en el movimiento de los ureidos desde el nódulo hacia las hojas. Esta hipótesis podría favorecer la reacción catalizada por la enzima GS1 hacia la formación de glutamina, ya que este aminoácido se utiliza en la síntesis de ureidos (23). Por tanto, durante el estrés por sequía es importante determinar la regulación y el papel potencial de la enzima GS1 en genotipos de soya con diferente sensibilidad al déficit hídrico.

Se han realizado investigaciones dirigidas a lograr un mejor comportamiento de la soya durante déficit hídrico. Algunos resultados (5) muestran que la aplicación foliar de los factores Nod tiene efectos positivos en el crecimiento de la soya, cuando el estrés hídrico por defecto es moderado. Resultados similares ya han sido obtenidos (6), pero con inductores de los genes de la nodulación que permiten la síntesis de los factores Nod en el rizobio. Se ha observado que los factores

Nod incrementan el cierre estomático en las hojas de la soya durante condiciones de sequía (5). Estos efectos permiten una mayor retención de agua en la planta, como resultado de una disminución en la transpiración (42, 43). Las aplicaciones de los factores Nod responden a moléculas inductoras de un posible efecto anti-estrés, pudiendo incrementar la nodulación y fijación biológica del nitrógeno en condiciones adversas.

## CONCLUSIONES

Resulta alentador evaluar el efecto de los factores Nod en la tolerancia al estrés por sequía y el incremento de la fijación biológica del nitrógeno. Un aumento de la fijación biológica del nitrógeno en los nódulos de la soya en condiciones de sequía, permitiría un mayor suministro de amonio para la síntesis de ureidos (36). Para ello, es necesario estudiar las herramientas que permiten incrementar la fijación biológica del nitrógeno, tanto al nivel de la planta de soya como al de *Bradyrhizobium* sp.

La fertilización con manganeso ha mostrado resultados positivos en este cultivo, concediendo tolerancia a la sequía en variedades susceptibles a este estrés (3). La enzima ACC desaminasa en el rizobio permite disminuir los efectos inhibitorios del etileno sobre la nodulación (7, 8), pero el papel de esta enzima durante el estrés por sequía no ha sido completamente estudiado. Es probable que al disminuir los efectos inhibitorios que ejerce el etileno sobre la cascada de señales que se induce por los factores Nod, se reduzca el control negativo sobre la nodulación y le confiera a la planta mayor tolerancia al déficit hídrico.

El estudio de los mecanismos de inducción de tolerancia al déficit hídrico en la soya, constituye una diana atractiva para lograr una posible potenciación del flujo del nitrógeno ante las condiciones desfavorables de la sequía.

## REFERENCIAS

1. Gage, D. J. Infection and invasion of roots by symbiotic nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2004, vol. 68, p. 280-300.
2. Morgan, J.; Bending, G. y White, P. Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.*, 2005, vol. 56, p. 1729-1739.
3. King, C. A. y Purcell, L. C. Inhibition of N<sub>2</sub> fixation in soybean is associated with elevated ureides and amino acids. *Plant Physiol.*, 2005, vol. 137, p. 1389-1396.
4. Werner, A. K.; Sparkes, I. A.; Romeis, T. y Witte, C. P. Identification, biochemical characterization, and subcellular localization of allantoate amidohydrolases from *Arabidopsis* and soybean. *Plant Physiol.*, 2008, vol. 146, p. 418-430.
5. Atti, S.; Bonnell, R.; Prasher, S. y Smith, D. L. Response of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) under chronic water deficit to LCO application during flowering and pod filling. *Irrig. Drain*, 2005, vol. 54, p. 15-30.
6. Nápoles, M. C.; Guevara, E.; Montero, F.; Rossi, A. y Ferreira, A. Role of *Bradyrhizobium japonicum* induced by genistein on soybean stressed by water deficit. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2009, vol. 7, no. 3, p. 665-671.
7. Glick, B. R. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2005, vol. 251, p. 1-7.
8. Duan, J.; Müller, K. M.; Charles, T. C.; Vesely, S. y Glick, B. R. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase genes in rhizobia from Southern Saskatchewan. *Microb. Ecol.*, 2009, vol. 57, p. 423-436.
9. Jones, K. M.; Kobayashi, K.; Davies, B. W.; Taga, M. E. y Walker, G. C. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nature Reviews*, 2007, vol. 5, p. 619-633.
10. Ito, S.; Ohtake, N.; Sueyoshi, K. y Ohyama, T. The autoregulation of nodulation mechanism is related to leaf development. *Plant Cell Physiol.*, 2008, vol. 49, p. 121-125.
11. Wasson, A. P.; Pellerone, A. I. y Mathesius, U. Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia. *The Plant Cell*, 2006, vol. 18, p. 1617-1629.
12. Oka-Kira, E. y Kawaguchi, M. Long-distance signaling to control root nodule number. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2006, vol. 9, p. 496-502.
13. Duzan, H. M.; Zhou, A.; Souleimanov, A.; y Smith, D. L. Perception of *Bradyrhizobium japonicum* Nod factor by soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] root hairs under abiotic stress conditions. *Journal of Experimental Botany*, 2004, vol. 55, no. 408, p. 2641-2646.
14. Kaló, P.; Gleason, C. A. y Edwards, A. Nodulation signalling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science*, 2005, vol. 308, p. 1786-1789.
15. Smit, P.; Raedts, J.; Portyanko, V.; Debelle, F.; Gough, C.; Bisseling, T. y Geurts, R. NSP1 of the GRAS protein family is essential for Rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science*, 2005, vol. 308, p. 1789-1797.
16. Riely, B. K.; Loughon, G.; Ané, J. M. y Cook, D. R. The symbiotic ion channel homolog DMI1 is localized in the nuclear membrane of *Medicago truncatula* roots. *Plant J.*, 2007, vol. 49, p. 208-216.
17. Limpens, E.; Mirabella, R.; Fedorova, E.; Franken, C.; Franssen, H.; Bisseling, T. y Geurts, R. Formation of organelle-like N<sub>2</sub>-fixing symbiosomes in legume roots is controlled by DMI2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, vol. 102, p. 10375-10380.
18. Ohyama, T.; Ohtake, N.; Sueyoshi, K.; Tewari, K.; Takahashi, Y.; Ito, S.; Nishiwaki, T.; Nagumo, Y.; Ishii, S. y Sato, T. Nitrogen fixation and metabolism in soybeans plants. En: Couto, G.N. *Nitrogen Fixation Research Progress*. Tokyo, Japan: Couto, G.N., Nova Science Pub., 2008, 109 p.
19. Kubo, H. Über das Hamoprotein aus den Wurzelknöllchen von Leguminosen. *Acta Phytochimica*, 1939, vol. 11, p. 195-200.
20. Zozaya-Hinchliffe, M.; Potenza, C.; Ortega, J. L. y Sengupta-Gopalan, C. Nitrogen and metabolic regulation of the expression of plastidic glutamine synthetase in alfalfa (*Medicago sativa*). *Plant Sci.*, 2005, vol. 168, p. 1041-105.
21. Riely, B. K.; Mun, J. H. y Ane, J. Unravelling the molecular basis for symbiotic signal transduction in legumes. *Mol. Plant Pathol.*, 2006, vol. 7, p. 197-207.
22. Prayitno, J.; Rolfe, B. G. y Mathesius, U. The ethylene insensitive sickle mutant of *Medicago truncatula* shows altered auxin transport regulation during nodulation. *Plant Physiol.*, 2006, vol. 142, p. 168-180.
23. Ortega, J. L.; Moguel-Esponda, S.; Potenza, C.; Conklin, C. F.; Quintana, A. y Sengupta-Gopalan, C. The 3' untranslated region of a soybean cytosolic glutamine synthetase (GS1) affects transcript stability and protein accumulation in transgenic alfalfa. *The Plant Journal*, 2006, vol. 45, p. 832-846.
24. Cruz, J. L.; Mosquim, P. R.; Pelciani, C. R.; Araújo, W. L. y DaMatta, F. M. Effects of nitrate nutrition on nitrogen metabolism in cassava. *Biología Plantarum*, 2004, vol. 48, p. 67-72.
25. White, J.; Prell, J.; James, E. K. y Poole, P. Nutrient sharing between symbionts. *Plant Physiol.*, 2007, vol. 144, p. 604-614.
26. Igarashi, R. Y. y Seefeldt, L. C. Nitrogen fixation: The mechanism of the Mo-dependent nitrogenase. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, vol. 38, p. 351-384.
27. Burgess, B. K. y Lowe, D. J. Mechanism of molybdenum nitrogenase. *Chem. Rev.*, 1996, vol. 96, p. 2983-3012.
28. Dance, I. The consequences of an interstitial N atom in the FeMo cofactor of nitrogenase. *Chem. Commun.*, 2003, vol. 2003, p. 324-325.
29. Chatelet, C. y Meyer, J. Mapping the interaction of the [2Fe-2S] *Clostridium pasteurianum* ferredoxin with nitrogenase MoFe protein. *Biochim. Biophys. Acta*, 2001, vol. 1549, p. 32-36.

30. Ladrera, R.; Marino, D.; Estíbaliz, L.; González, E. M. y Arrese-Igor, C. Reduced carbon availability to bacteroids and elevated ureides in nodules, but not in shoots, are involved in the nitrogen fixation response to early drought in soybean. *Plant Physiol.*, 2007, vol. 145, p. 539-546.
31. Pageau, K.; Reisdorf-Cren, M.; Morot-Gaudry, J. F. y Masclaux-Daubresse, C. The two senescence-related markers, GS1 (cytosolic glutamine synthetase) and GDH (glutamate dehydrogenase), involved in nitrogen mobilization, are differentially regulated during pathogen attack and by stress hormones and reactive oxygen species in *Nicotiana tabacum* L. leaves. *J. Exp. Bot.*, 2006, vol. 57, p. 547-557.
32. Prell, J. y Poole, P. Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends Microbiol.*, 2006, vol. 14, p. 161-168.
33. Ohyama, T.; Tewari, K.; Latif, S. A.; Ruamrungsri, S.; Komiyama, S.; Ito, S.; Yamazaki, A.; Sueyoshi, K. y Ohtake, N. Direct analysis of <sup>15</sup>N abundance of Kjeldahl digested solution by emission spectrometry. *Bull. Facul. Agric. Niigata Univ.*, 2004, vol. 57, p. 43-50.
34. Waters, J. K. y Emerich, D. W. Transport of metabolites to and from symbiosomes and bacteroids. En: *Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process*. Amsterdam, Holanda. Elsevier Science Publisher, 2000, p. 549-558.
35. Purcell, L.; Serraj, R.; Sinclair, T. y De, A. Soybean N<sub>2</sub> fixation estimates, Ureide concentration, and yield responses to drought. *Crop Sci.*, 2004, vol. 44, p. 484-492.
36. Charlson, D. V.; Korth, K. L. y Purcell, L. C. Allantoate amidohydrolase transcript expression is independent of drought tolerance in soybean. *J. Exp. Bot.*, 2009, vol. 60, no. 3, p. 847-851.
37. Vendruscolo, E. C. G.; Schuster, J.; Pileggi, M.; Scapim, C. A.; Molinari, H. B. C.; Marur, C. J.; y Vieira, L. G. E. Stress-induced synthesis of praline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. *J. Plant Physiol.*, 2007, vol. 164, no. 10, p. 1367-1376.
38. Liu, F.; Jensen, C. R.; Shahanzari, A.; Andersen, M. N. y Jacobsen, M. N. ABA regulated stomatal control and photosynthetic water use efficiency of potato (*Solanum tuberosum* L.) during progressive soil drying. *Plant Sci.*, 2005, vol. 168, no. 3, p. 831-836.
39. Chandrasekar, V.; Sairam, R. K. y Srivastava, G. C. Physiological and biochemical responses of hexaploid and tetraploid wheat to drought stress. *J. Agron. Crop Sci.*, 2000, vol. 185, no. 4, p. 219-227.
40. Apelbaum, A. y Yang, S. F. Biosynthesis of stress ethylene induced by water deficit. *Plant Physiol.*, 1981, vol. 68, p. 594-596.
41. Mayak, S.; Tirosh, T. y Glick, B. R. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Sci.*, 2004, vol. 166, p. 525-530.
42. Lobato, A. K. S.; Santos Filho, B. G.; Costa, R. C. L.; Oliveira Neto, C. F.; Meirelles, A. C. S.; Cruz, F. J. R.; Alves, G. A. R.; Neves, H. K. B.; Pita, J. D.; Lopes, M. J. S.; Freitas, J. M. N.; Monteiro, B. S. y Ferreira Ramos, R. Physiological and biochemical changes in soybean (*Glicine max*) plants under progressive water deficit during the vegetative phase. *Agricultural Journal*, 2008, vol. 3, no. 5, p. 327-333.
43. Souleimanov, A.; Prithiviraj, B. y Smith, D. L. The major Nod factor of *Bradyrhizobium japonicum* promotes early growth of soybean and corn. *J. Exp. Bot.*, 2002, vol. 53, no. 376, p. 1-6.
44. Gálvez, L.; González, E. M. y Arrese-Igor, C. Evidence for carbon flux shortage and strong carbon/nitrogen interactions in pea nodules at early stages of water stress. *J. Exp. Bot.*, 2005, vol. 56, p. 2551-2561.
45. Horst, I.; Welham, T.; Kelly, S.; Kaneko, T.; Sato, S.; Tabata, S.; Parniske, M. y Wang, T. L. TILLING mutants of *Lotus japonicus* reveal that nitrogen assimilation and fixation can occur in the absence of nodule-enhanced sucrose synthase. *Plant Physiol.*, 2007, vol. 144, p. 806-820.
46. Todd, C. D. y Polacco, J. C. Soybean cultivars "Williams 82" and "Maple Arrow" produce both urea and ammonia during ureide degradation. *J. Exp. Bot.*, 2004, vol. 55, p. 867-877.
47. Larrainzar, E.; Wienkoop, S.; Ladrera, R.; Weckwerth, W.; Arrese-Igor, C. y Gonzalez, E. M. *Medicago truncatula* root nodule proteome analysis reveals differential plant and bacteroid responses to drought stress. *Plant Physiol.*, 2007, vol. 144, p. 1495-1507.
48. Marino, D.; González, E. M. y Arrese-Igor, C. Drought effects on carbon and nitrogen metabolism of pea nodules can be mimicked by paraquat: evidence for the occurrence of two regulation pathways under oxidative stresses. *J. Exp. Bot.*, 2006, vol. 57, p. 665-673.
49. Vadez, V. y Sinclair, T. R. Sensitivity of N<sub>2</sub> fixation in soybean cultivar Jackson to manganese. *Crop Sci.*, 2002, vol. 42, p. 791-796.
50. Agarwall, R.; Burley, S. K. y Swaminathan, S. Structural analysis of a ternary complex of allantoin amidohydrolase from *Escherichia coli* reveals its mechanics. *Journal of Molecular Biology*, 2007, vol. 368, p. 450-463.
51. Clement, M.; Boncompagni, E.; De Almeida-Engler, J. y Herouart, D. Isolation of a novel nodulin: a molecular marker of osmotic stress in *Glycine max/Bradyrhizobium japonicum* nodule. *Plant Cell Environ.* 2006, vol. 29, p. 1841-1852.
52. Marino, D.; Frendo, P.; Ladrera, R.; Zabalza, A.; Puppo, A.; Arrese-Igor, C. y González, E. M. Nitrogen fixation control under drought stress: localized or systemic?. *Plant Physiol.*, 2007, vol. 143, p. 1968-1974.
53. Clement, M.; Lambert, A.; Herouart, D. y Boncompagni, E. Identification of new up-regulated genes under drought stress in soybean nodules. *Gene*, 2008, vol. 426, p. 15-22.

Recibido: 8 de octubre de 2009

Aceptado: 5 de enero de 2010