



Universidad de la República
FACULTAD DE AGRONOMIA



ESTUDIO DE LA PRODUCCION
DE COMPUESTOS NITROGENADOS
(Amidas y Ureidos) EN *Lotus corniculatus*

JORGE MONZA - PATRICIA SALAMANCA - MIGUELA. HERRERA

BOLETIN DE INVESTIGACION N° 29

MONTEVIDEO

1991

URUGUAY

El "Boletín de Investigación" es una publicación seriada que recoge los resultados de las investigaciones realizadas por el personal académico de la Facultad de Agronomía, una vez que ellos fueron revisados y aprobada su publicación por la Comisión de Publicaciones Científicas. Las solicitudes de adquisición y de intercambio con este Boletín debe dirigirse al Departamento de Documentación, Facultad de Agronomía, Garzón 780, Montevideo - URUGUAY.

Comisión de Publicaciones Científicas:

Martín Buxedas, Primavera Azaguirre, Carlos Bentancourt (docentes),
Pablo Fernández (estudiante),
Roberto Malfatti (profesional),
Alicia Torres (comunicadora rural),
Gustavo Uriarte (editor técnico).

Estudio de la producción de compuestos nitrogenados (Amidas y Ureidos) en *Lotus corniculatus* / Jorge Monza, Patricia Salamanca, Miguel A. Herrera. -- Montevideo: Facultad de Agronomía, 1991. 7p. -- (Boletín de Investigación; 29)

AMIDAS
FIJACION DEL NITROGENO
LOTUS
UREDISO

CDU 581.133.1

ESTUDIO DE LA PRODUCCION DE COMPUESTOS NITROGENADOS

(Amidas y Ureidos) En *Lotus corniculatus*

Jorge Monza*, Patricia Salamanca**, Miguel A. Herrera**.

RESUMEN

Las plantas fijadoras de nitrógeno, que a través de la simbiosis obtienen parte o el total de los requerimientos de nitrógeno, pueden ser clasificadas como exportadoras de amidas o de ureidos desde los nódulos a tallos y hojas. Aquellas exportadoras de amidas producen asparragina (ASN), glutamina (GLN) o 4 metilenglutamina (MeGLN), mientras que las que producen ureidos transportan principalmente alantoína (ALN), o ácido alantoico (ALC).

Tradicionalmente se ha asociado la producción de ureidos con plantas fijadoras de nitrógeno propias de ambientes tropicales, mientras que la producción de amidas, se ha relacionado con plantas de clima templado.

En este trabajo se determina la ausencia de ureidos en *Lotus corniculatus*, tanto en simbiosis con *Rhizobium loti* cepa U226, con y sin nitrato, como en condición asimbiótica con nitrato. Esto implica que lotus es una leguminosa productora de amidas.

Palabras Claves: Lotus, Fijación de Nitrogeno, Amidas y Ureidos

SUMMARY

Plants that are able to obtain part or all the nitrogen required in symbiosis with nitrogen fixing microorganisms, can be classified as amide exporters or urides exporters from nodules to stems or leaves. The amide exporters produce asparagine (ASN), glutamine (GLN) or 4-methulene-glutamine (MeGln), while ureide exporters transport mainly allantoin (ALN) or allantoinic acid (ALC).

Normally the ureide production has been associated with tropical plants, while the synthesis and transport of amides has been related to plants of temperate origin.

This work report the lack of urides in *Lotus corniculatus* in symbiosis either with *Rhizobium loti* strain U226 with or without nitrate, or non inoculated plants with nitrate. These results support the idea that birdfoot trefoil is a legume that produces amides.

Key words: Lotus Amides, Ureides, Nitrogen fixation

Recibido el 17/4/90

Aceptado el 29/10/90

* Cátedra de Bioquímica, Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay.

** Dpto. Microbiología, Estación Experimental del Zaidín, C.S.I.C. Granada, España.

INTRODUCCION

El nitrógeno es una de las principales limitantes para el crecimiento y desarrollo de los vegetales. No obstante, algunas plantas pertenecientes a la familia *Leguminosae* son capaces en simbiosis con bacterias de los géneros *Rhizobium* o *Bradyrhizobium* de fijar nitrógeno atmosférico, por medio de la enzima nitrogenasa, obteniéndose como primer producto estable el amonio (Emerich, et. al., 1983).

La fijación simbiótica de nitrógeno en leguminosas involucra un complejo proceso de interacciones metabólicas entre el citoplasma de la célula huésped infectada y el bacteroide de *Rhizobium*, sistema que es controlado por una serie de mecanismos bioquímicos y genéticos.

Como resultado de esta simbiosis, las plantas que la soportan son capaces de abastecerse parcialmente o en su totalidad, del nitrógeno que requieren para su crecimiento.

En la simbiosis *Rhizobium* - leguminosa, la energía requerida para la reducción de nitrógeno a amonio se obtiene a partir del fotosintato, que llega a los nódulos a través del floema. A consecuencia, se establece una estrecha relación entre los niveles de fotosíntesis de la planta, la distribución del fotosintato por la misma y la fijación de N_2 .

El fotosintato aportado se utiliza como fuente de carbono y energía que permite: el crecimiento y mantenimiento del tejido nodular, cubrir las necesidades de las reacciones consumidoras de energía asociadas con la reducción del N_2 en el endofito y la asimilación del NH_4^+ producido en el citosol del huésped y por último permite la síntesis de compuestos orgánicos nitrogenados para exportar desde el nódulo (Schubert, 1986).

Las plantas fijadoras de nitrógeno pueden ser clasificadas como exportadoras de ureidos o de amidas, en soja entre el 70 y el 90% del N_2 fijado es transportado como ureidos, Alantofina y Acido alantoico, mientras que en lupino el nitrógeno es transportado como amida, Asparragina (Reynolds, et al. 1982).

No obstante la división en dos grupos de exportadores de metabolitos nitrogenados, bajos niveles de Alantofina y de Acido alantoico se pueden encontrar en la savia de leguminosas exportadoras de amidas, mientras que en forma análoga es posible detectar trazas de amidas en exportadoras de ureidos. También se ha tratado de asociar el carácter de productor de amidas o de ureidos a las condiciones de plantas de clima templado y tropical respectivamente (Schubert, 1986).

Diversos autores (Herridge, 1982; McNeil y La Rue, 1984 y Berkum et al. 1985), han señalado un notorio cambio que se produce en algunas plantas productoras de ureidos, cuando crecen en presencia de NO_3^- o NH_4^+ , en ellas se ha podido observar una fuerte disminución del contenido relativo de ureido presente en la savia.

El género *Lotus*, originario de la región Mediterránea y América del Norte, comprende más de 120 especies siendo *L. corniculatus* y *L. pedunculatus* los más usados agrónomicamente (Allen y Allen, 1981). En Uruguay, la utilización de praderas con leguminosas tales como *Lotus corniculatus* (lotus), *Trifolium repens* (trébol blanco) y *T. pratense* (trébol rojo) corresponde a una estrategia básica en diversas producciones intensivas.

A pesar de la importancia económica del género *Lotus*, no hay en la actualidad información respecto al tipo de compuesto nitrogenado (ureidos o amidas) que se exporta a partir de los nódulos fijadores de N_2 en estas plantas.

En el presente estudio se determina indirectamente la forma en que se transportan los metabolitos nitrogenados resultantes de la fijación simbiótica de N_2 .

MATERIAL Y METODOS

Plantas utilizadas, esterilización de semillas y condiciones de cultivo

Se ha evaluado la presencia de ureidos en *Lotus corniculatus* (L) utilizándose como controles negativo y positivo plantas de *Pisum sativum* y *Glicine max* respectivamente.

Las semillas fueron esterilizadas en superficie por inmersión en $HgCl_2$ durante 10 min. Transcurrido este tiempo, se lavaron 5-6 veces con agua estéril y se hicieron germinar en placa Petri.

Cuando las plántulas alcanzaron 1-2 cm de longitud, se colocaron, previa descari-ficación, en condiciones asépticas en jarras Leonard con vermiculita (Leonard, 1943) y crecieron durante 45 días en cámara de cultivo a 500 uE/m/s de intensidad luminosa, fotoperíodo de 16/8 horas (luz/oscuridad), 25° / 18 °C de temperatura (día/noche) y 50% de humedad relativa. La solución nutritiva de Ringaud y Pupo (1975) fue utilizada para el cultivo de las plantas.

Inoculantes

Las plantas de *Lotus corniculatus* noduladas tenían como fuente de inóculo la raza de *Rhizobium loti* cepa U226. *Glicine max* fue inoculada con *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 y *Pisum sativum* con *Rhizobium leguminosarum* 128C53.

Medida de los ureidos totales

La determinación de los ureidos se realizó mediante análisis colorimétrico según el método de la glioxil-fenilhidrazona (Glenister y LaRue, 1987).

Las medidas se realizaron en homogeneizados de 530 mg de tejido vegetal fresco, para cada tratamiento, con tres repeticiones en cada caso.

En la primera etapa, común para todo el material sometido a análisis, se realizó la extracción en una mezcla 1:1 (v/v) de etanol y tampón fosfato 0,1 M (pH 7).

Las soluciones extractadas se repartieron a razón de 1,5 ml por tubo, para determinar alantofna, ácido alantoico y ácido glioxílico en cada tratamiento.

Mediante la adición de NaOH 0,5 N se consigue el paso de alantofna a ácido alantoico y por acción de HCl 0,65 N se transforma en ácido glioxílico.

El ácido glioxílico se neutralizó con tampón fosfato 0,4 M (pH 7), y con la adición de 0,5 ml de solución de fenilhidracina se logró el paso de glioxilato a glioxil-fenilhidrazona, que finalmente pasa a dibencilformazan, tras agregarle 2,5 ml de HCl concentrado y 0,5 ml de ferricianuro potásico (333 mg en 20 ml H₂O destilada).

La medición de absorbancia se realizó a 535 nm después de mantener la solución de reacción 15 min. a temperatura ambiente para obtener el desarrollo del color. Como curva patrón se utilizaron seis concentraciones de alantofna desde 0,0 a 0,2 mM.

RESULTADOS Y DISCUSION

El resultado de la evaluación de ureidos en *L. corniculatus* fue negativo en los tres tratamientos. No hubo diferencias, en este sentido, entre el tratamiento de *L. corniculatus* inoculado con *R. loti* U226, tanto en medio con nitrato como sin nitrato ni en *L. corniculatus* sin inocular cultivado en presencia de nitrato. El control negativo, *Pisum sativum*, especie productora de amidas, fue inoculada con *R. leguminosarum* 128C53, usada para comparar los resultados obtenidos con *L. corniculatus*, no encontrándose diferencias entre el control y lotus, por lo que se puede concluir en forma indirecta, que *L. corniculatus* corresponde al grupo de leguminosas productoras de amidas. Como control positivo de la técnica, se utilizaron nódulos de soja formados por *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110, los resultados se observan en la figura 1.

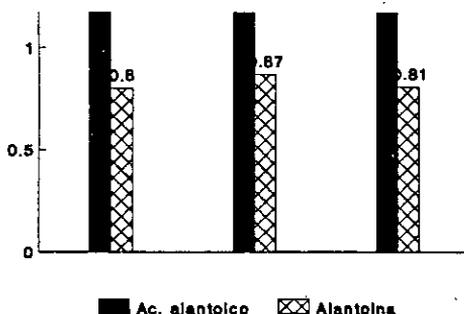


FIGURA N° 1: Contenido de ureidos: alantoina y ác. alantoico, usado como control positivo. (Tres repeticiones)

La glutamina y aspartato procedentes de la actividad de los sistemas GS/GOGAT y Aspartato amino transferasa sobre el NH_3 producido por la fijación de nitrógeno, en *L. corniculatus*, sigue la vía metabólica y de transporte como amida de acuerdo a la figura 2.

El sentido de que algunas plantas fijadoras de nitrógeno sean productoras de ureidos mientras que otras lo sean de amidas, se ha tratado de interpretar como una adaptación a las condiciones hídricas de su ambiente. Así, se sugiere que la mayor solubilidad de las amidas junto a la morfología particular de los nódulos indeterminados de las plantas que las producen, supondrán ventajas en ambientes de menor régimen hídrico (Sprent, 1980).

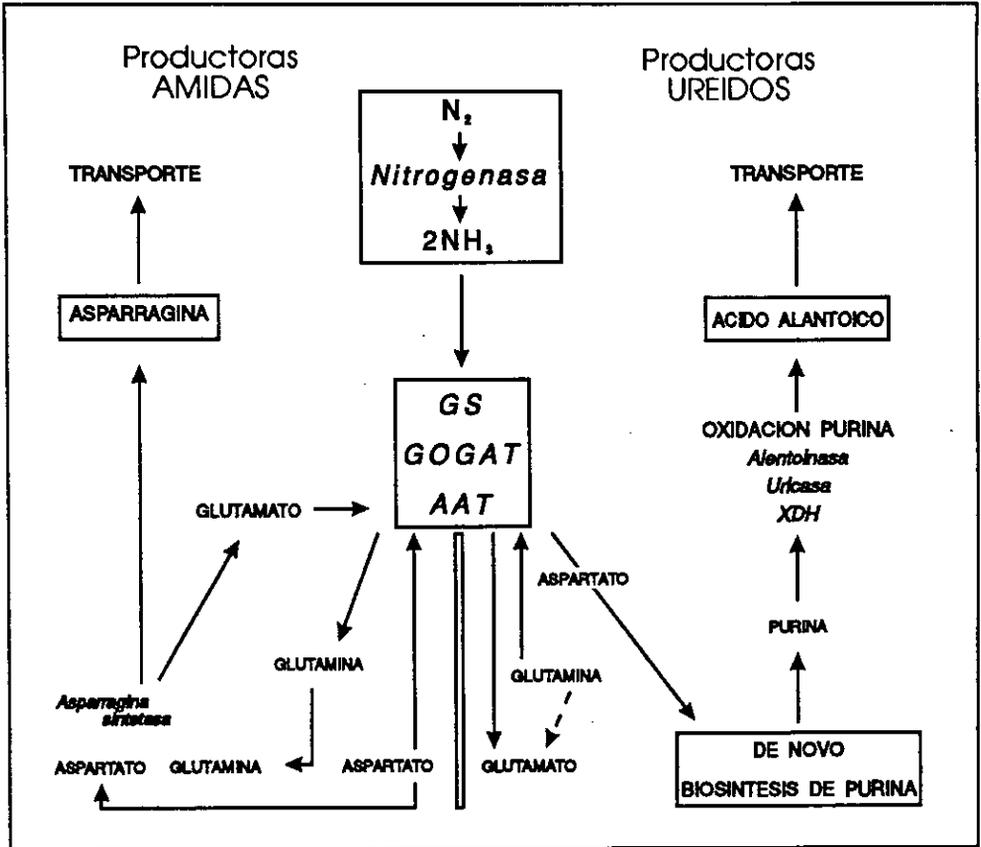


FIGURA N° 2: Vías propuestas para plantas transportadoras de ureidos y amidas. GS: Glutamino sintetasa; GOGAT: glutamato sintasa; AAT: Aspartato amino transferasa.

AGRADECIMIENTOS

Dr. Eulogio Bedmar.
 Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI) por el financiamiento de la Beca en la Estación Experimental del Zaidín, España.
 Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

BIBLIOGRAFIA

- Allen, O. N. y Allen, E.K. 1981. The leguminosae: A source book of characteristics, uses and nodulation. Wisconsin. The University of Wisconsin Press. Madison. 812 pp.
- Berkum, P., Sloger, C., Weber, D.F., Cregan, P.B. y Keyser, H.H. 1985. Relationship between ureide N and N_2 fixation, aboveground N accumulation, acetylene reduction and nodule mass in greenhouse and field studies with *Glycine max* (Merr.) Plant Physiology 77. 53-58.
- Emerich, D.W., Lepo, J.E. y Evans, H.J. 1983. Nodule metabolism. En: Nitrogen Fixation V: 3: Legumes. Ed. W.J. Broughton. Clarendon Press. Oxford. 213-244.
- Glenister, R.A. y LaRue T.A. 1987. Measuring ureides. En: Symbiotic nitrogen fixation technology. Ed. G.H. Elkan. Marcel Dekker Inc. Nueva York. 307-320.
- Herridge, F.D. 1982. Relative abundance of ureides and nitrate in plant tissues of soybean as a quantitative assay of nitrogen fixation. Plant Physiology. 70. 1-6.
- Leonard, L.T. 1943. Method of testing bacterial cultures and results of tests of commercial inoculants. U.S.D.A. Circ. 703, Washington D.C.
- McNeil, L.D. y LaRue T.A. 1984. Effect of nitrogen source on ureides in soybean. Plant Physiology. 74. 227-232.
- Sprent, J.L. 1980. Root nodule anatomy, type of product and evolutionary origin in some Leguminosae. Plant Cell Environ. 3. 35-43.
- Reynolds, P.H.S., Blevins, D.G., Boland, M.J., Schubert, K.R. y Randall, D.D. 1982. Enzymes of ammonia assimilation in legume nodules: A comparison between ureide and amine transporting plants. Physiol. Plant. 55. 255-260.
- Rigaud, J. y Puppo, A. 1975. Indole 3-acetic catabolism by soybean bacteroids. J. Gen. Microbiol. 88. 223-238.
- Schubert, K.R. 1986. Products of biological nitrogen fixation in higher plants: Synthesis, transport and metabolism. Annual Rev. Plant Physiology 37. 539-574.