

# COMPARACION DE LOS EFECTOS DE MOLIBDENO Y VANADIO EN *PHASEOLUS VULGARIS* L.: CRECIMIENTO, PROTEINAS Y ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE LA NITRATO-REDUCCION

D. Saco, M. Alvarez y S. Martín

*Dpto. Biología Vegetal II (Fisiología Vegetal). Facultad de Farmacia. Univ. Complutense. 28040 Madrid.*

## RESUMEN

Se ha estudiado el efecto del aporte de un exceso de molibdeno (11  $\mu\text{M}$  frente a 0.1  $\mu\text{M}$  del Control) y vanadio (8  $\mu\text{M}$ ) sobre el crecimiento, contenido de proteínas y actividades enzimáticas de la nitrato-reducción (nitrato reductasa: NR; EC 1.6.6.1 y nitrito reductasa: NiR; EC 1.7.7.1), durante la fase de desarrollo vegetativo de *Phaseolus vulgaris* L.

El vanadio incrementó el crecimiento de las plantas y la actividad NR durante toda la experiencia, sobre todo en la raíz. La actividad NiR no se vió afectada y el contenido foliar de proteínas totales sólo aumentó al final del período experimental.

Los resultados sugieren que el aporte de molibdeno y vanadio afecta, principalmente a la actividad NR de la raíz. El efecto del molibdeno se ha observado menos intenso y retardado respecto al del vanadio.

Palabras clave: Molibdeno. Vanadio. Desarrollo vegetativo. Nitrato-reducción. Proteínas.

## SUMMARY

### COMPARISON OF THE EFFECTS OF MOLYBDENUM AND VANADIUM ON *PHASEOLUS VULGARIS*: GROWTH, PROTEIN CONTENT AND ACTIVITIES OF NITRATE REDUCTION ENZYMES

The effect of molybdenum (11  $\mu\text{M}$ ; Control: 0.1  $\mu\text{M}$ ) and vanadium (8  $\mu\text{M}$ ) on the growth, protein content and activities of nitrate reduction enzymes (nitrate reductase: NR, EC 1.6.6.1 and nitrite reductase: NiR, EC 1.7.7.1) was studied during the vegetative state of *Phaseolus vulgaris* L.

The vanadium treatment increased the plants growth and NR reductase activity throughout the entire experiment, principally in the root. However, NiR activity was not affected, and the protein content of the leaves only increased at the end of the experiment.

The results suggest that the molybdenum and vanadium treatments mainly affect, NR activity in the root. The molybdenum effect was observed later than vanadium.

Key words: Molybdenum. Vanadium. Vegetative development. Nitrate-reduction. Proteins.

Este trabajo ha sido financiado por la Universidad Complutense de Madrid. (AYUDA A GRUPOS PRECOMPETITIVOS).

## INTRODUCCION

La disponibilidad de molibdeno, micronutriente esencial cofactor del enzima nitrato-reductasa es uno de los factores que pueden afectar al proceso global de la reducción de nitrato, donde también participa el enzima nitrito-reductasa. La presencia en el suelo de elementos susceptibles de sustituir al molibdeno, como es el caso del vanadio, podría afectar a la asimilación de nitrógeno y a la formación de los diferentes metabolitos nitrogenados vegetales (Aslam y Huffaker, 1989; Deng *et al.*, 1989).

El vanadio se puede encontrar en la atmósfera, mares, océanos y llegar a las aguas de riego como producto de diversas contaminaciones industriales (Breslin y Duedall, 1988; Hasanen *et al.*, 1990). Este elemento se incluye como contaminante seleccionado en diferentes tests realizados por la Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos (Marcus y Mills, 1988), y actualmente se realizan estudios sobre la posibilidad de utilizar vanadio y níquel como indicadores de la contaminación de las Centrales Energéticas (Ganor *et al.*, 1988).

La función bioquímica del vana-

dio todavía no es bien conocida, aunque se describe como elemento beneficioso para algunas especies animales y vegetales (Cammack, 1986). En los vegetales, parece intervenir en la fijación de nitrógeno de Azotobacter y se han llegado a aislar enzimas V-nitrogenasa (Beneman *et al.*, 1972; Cammack, 1986; Mackenna *et al.*, 1970; Robson *et al.*, 1986). Recientemente también han sido descritos la detección y el aislamiento de bromoperoxidasas que contienen vanadio en diferentes algas pardas (Jordan *et al.*, 1990; Vilter, 1990). Asimismo, el vanadio parece estar relacionado con la síntesis de clorofilas y el proceso fotosintético de transferencia de electrones (Meisch y Becker, 1981; Hewitt, 1983).

Molibdeno y vanadio pueden considerarse como contaminantes. El molibdeno en exceso puede proceder del uso abusivo de fertilizantes, mientras que el origen del vanadio es fundamentalmente industrial. Este trabajo estudia el efecto del aporte suplementario de molibdeno y vanadio sobre el crecimiento y metabolismo nitrogenado de *Phaseolus vulgaris* L.

## MATERIALES Y METODOS

Se han utilizado plantas de *P. vulgaris* L. Sp. Pl 723 (1753) cultivadas en medio hidropónico (vermiculita) durante su estado vegetativo (32 días) (T media =  $20 \pm 2$  °C; humedad relativa: 55-60 %; condiciones lumínicas: luz natural con un fotoperíodo de 16 h. de luz y 8 h. de

oscuridad). Se dispusieron tres lotes de plantas: C, Mo y V. El lote C (CONTROL) recibió la solución nutritiva diariamente ya utilizada en trabajos anteriores (Alvarez *et al.*, 1990). Los lotes Mo y V, recibieron, además, el siguiente aporte suplementario: lote Mo: 11  $\mu$ M de Mo,

suministrado como  $\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , lote V:  $8 \mu\text{M}$  de V suministrado como  $\text{VOSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .

Las determinaciones analíticas se realizaron en raíz, tallo y hojas (exceptuando las trifoliadas) con un intervalo de cuatro días. En cada determinación se estudiaron los siguientes parámetros: *Morfometría*; *Pesos*: fresco y seco; *Proteínas*, *Actividades Nü, ato-reductasa* (ANR) (Aryan y Wallace, 1983; Jaworski, 1971) y *Nitrito-reductasa* (ANiR) Losada y Pa-

neque, 1971) (excepto en tallos).

En cada determinación se realizaron tres réplicas, tomándose tres plantas para cada una de ellas. Los resultados indicados corresponden a los valores medios de las tres repeticiones. Para determinar las diferencias entre los valores obtenidos se ha aplicado el Test T-Student y el Test de Análisis de la Varianza (ANOVA). La correlación entre los parámetros se estableció mediante el coeficiente  $r$  de Pearson.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados sugieren que los aportes de Mo y de V no afectan de forma significativa el crecimiento del brote (tallo y hojas) de *P. vulgaris*. Sin embargo, el Mo, y sobre todo el V incrementan, respecto al lote control, los valores de morfometría y de pesos obtenidos en las hojas y el tallo, principalmente el peso seco (Tabla 1).

El vanadio suministrado tiene mayor incidencia sobre el desarrollo de *P. vulgaris* que el aporte de molibdeno, efecto que se manifiesta con un aumento del crecimiento de los órganos vegetativos (raíz, tallo, hojas), fundamentalmente de la raíz (Tabla 1). La significación estadística de la diferencia entre los valores medios de longitud y peso seco radicales de los lotes Control y V ha sido de 89 % y 92 % respectivamente. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en trabajos anteriores (Martín *et al.*, 1985), sobre todo cuando las plantas crecieron en medio líquido (Estevan y Sánchez, 1989).

El mayor desarrollo radicular ob-

servado podría deberse a una disminución de la disponibilidad del nitrato acumulado en las plantas crecidas con V (Alvarez *et al.*, 1991), concordando estos resultados con los obtenidos en maíz cultivado con distintas concentraciones de nitrato (Khamis y Lamaze, 1990).

Durante toda la experiencia, el contenido proteico de los órganos estudiados no se vió afectado de forma estadísticamente significativa por el V y Mo suministrado (Fig. 1).

La ANR en hojas tampoco se vió afectada significativamente por la adición de V ó Mo. A pesar de ello, nos parece oportuno señalar que en las plantas del lote Mo, los valores medios de ANR foliar fueron un 43 % ( $\mu\text{mol NO}_2^- \text{g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ ) y un 29 % ( $\mu\text{mol NO}_2^- \text{órgano}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) superiores a los obtenidos en las plantas Control (Fig. 2).

Sin embargo, en la raíz, el V aumentó la ANR respecto a las plantas control con diferencias altamente significativas (Tabla 2). Las diferencias obtenidas entre los lotes Mo y V también fueron estadísticamente sig-

TABLA 1

Resultados medios ( $\bar{x} \pm e.s.$ ) de CRECIMIENTO de raíz, tallo y hojas de *Ph. vulgaris* (*e.s.* = error standard).

PARAMETROS	LOTES		
	Control	Mo	V
<b>RAIZ</b>			
LONGITUD (cm) . . . . .	6.378 $\pm$ 0.220	6.507 $\pm$ 0.351	7.650 $\pm$ 0.577
PESO FRESCO (g) . . . . .	0.3739 $\pm$ 0.021	0.3595 $\pm$ 0.036	0.4185 $\pm$ 0.044
PESO SECO (g) . . . . .	0.0303 $\pm$ 0.002	0.0323 $\pm$ 0.029	0.0372 $\pm$ 0.035
<b>TALLO</b>			
LONGITUD . . . . .	28.35 $\pm$ 2.941	29.16 $\pm$ 3.232	29.00 $\pm$ 3.349
PESO FRESCO (g) . . . . .	2.0845 $\pm$ 0.195	2.1100 $\pm$ 0.234	2.3380 $\pm$ 0.248
PESO SECO (g) . . . . .	0.1108 $\pm$ 0.010	0.1195 $\pm$ 0.016	0.1326 $\pm$ 0.012
<b>HOJAS</b>			
LONGITUD (cm) . . . . .	4.05 $\pm$ 0.380	4.28 $\pm$ 0.487	4.35 $\pm$ 0.410
ANCHURA (cm) . . . . .	3.09 $\pm$ 0.314	3.25 $\pm$ 0.336	3.26 $\pm$ 0.377
PESO FRESCO (g) . . . . .	0.9823 $\pm$ 0.178	1.1345 $\pm$ 0.259	1.0985 $\pm$ 0.198
PESO SECO (g) . . . . .	0.0915 $\pm$ 0.013	0.0865 $\pm$ 0.033	0.1121 $\pm$ 0.02

nificativas, manifestándose el efecto del V durante toda la experiencia. El incremento de los valores medios de la ANR radicular en el lote Mo sólo se manifiesta en la segunda etapa de la experiencia, no siendo significativo desde el punto de vista estadístico (Tabla 2, Fig. 2). Este efecto del Mo sobre la ANR en la raíz coincide con los resultados obtenidos en experiencias realizadas anteriormente (Martín y Saco, 1989).

Los resultados obtenidos sugieren que el V empleado podría ser inductor de la ANR en la raíz, pudiendo afectar, posteriormente, al desarrollo de los distintos órganos.

Durante todo el período experimental, la ANiR en hojas disminuyó en los lotes tratados (Fig. 3), aunque

sólo están cercanas a la significación (81 %) las diferencias existentes entre C y V (Tabla 2); esta significación sube al 98 % si la ANiR se expresa respecto a g PF en lugar de a órgano. En la raíz, no aparecen diferencias significativas en ningún caso (Tabla 2; Fig. 3).

El hecho de que el V aumente la ANR ( $\mu\text{mol NO}_2^- \text{ órgano}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) durante toda la experiencia, y sólo aumente la ANiR a partir de los 16-18 días, sugiere un comportamiento similar al indicado por Aslam y Huffaker (1989). Este comportamiento induce a pensar que el  $\text{NO}_2^-$  producido por acción de NR sería insuficiente, al comienzo de la experiencia, para inducir una mayor ANiR, por lo que podría oxidarse

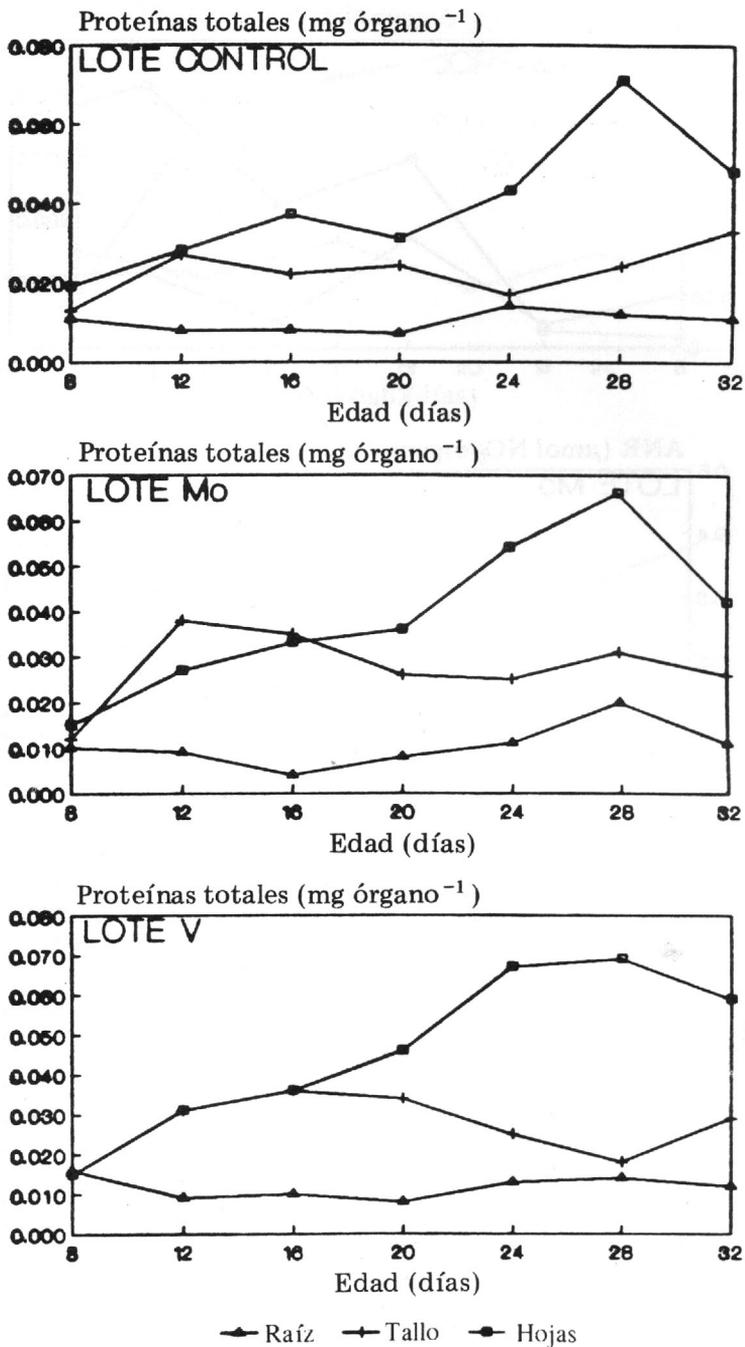


FIG. 1.—Contenido de proteínas totales en raíz, tallo y hojas de *P. vulgaris*.

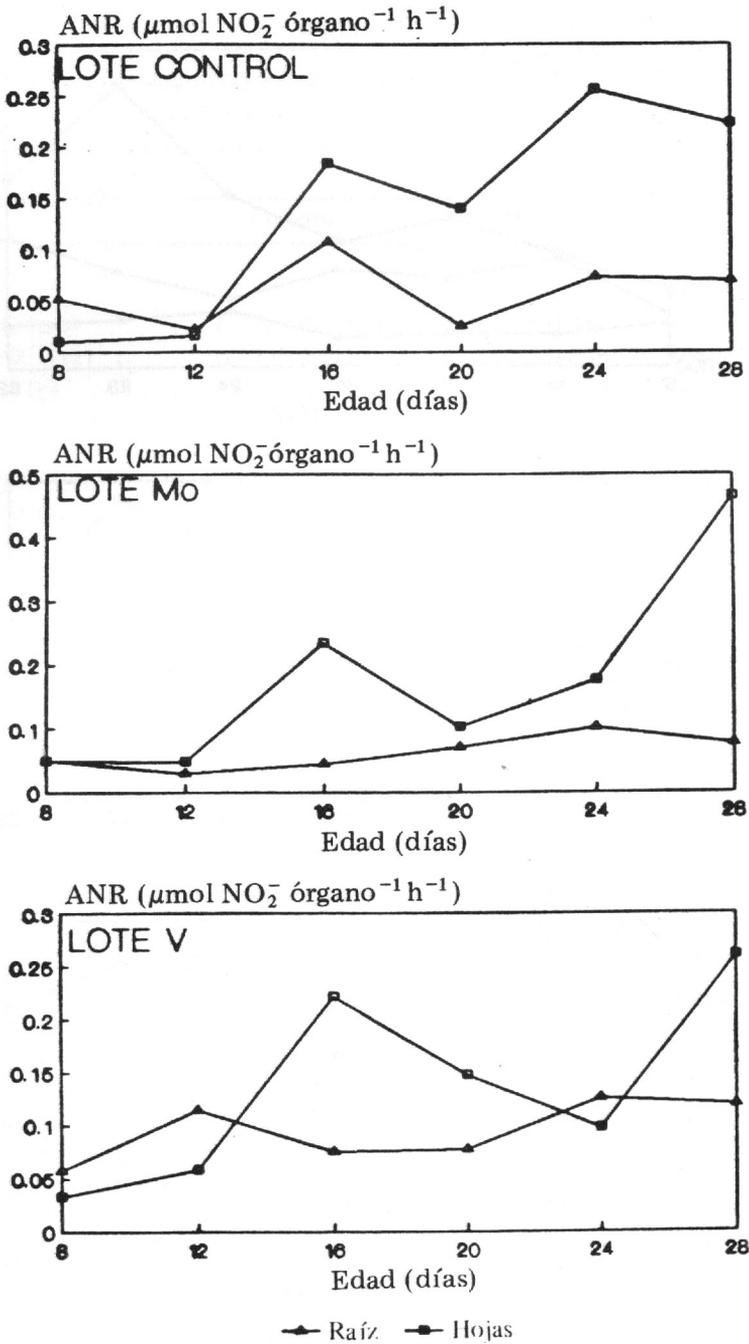


FIG. 2.—Actividad nitrato-reductasa en raíz y hojas de *P. vulgaris*.

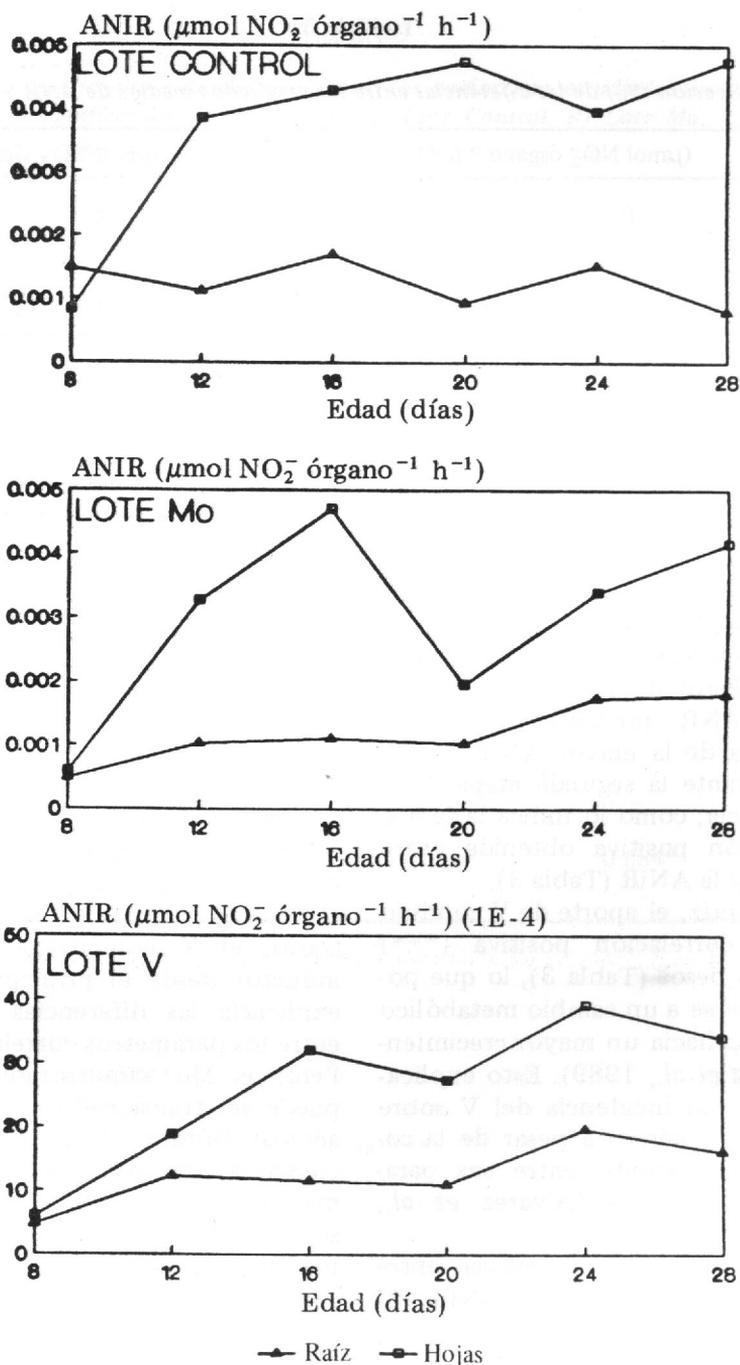


FIG. 3.—Actividad nitrito-reductasa en raíz y hojas de *P. vulgaris*.

TABLA 2

Significación (%) de las diferencias entre los resultados medios de ANR y ANiR.

ANR ( $\mu\text{mol NO}_2^- \text{ órgano}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )			ANiR ( $\mu\text{mol NO}_2^- \text{ órgano}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )		
RAIZ	C	Mo	RAIZ	C	Mo
Mo	—	—	Mo	—	—
V	94 %	94 %	V	81 %	—
HOJAS	C	Mo	HOJAS	C	Mo
Mo	—	—	Mo	—	—
V	—	—	V	—	—

a  $\text{NO}_3^-$ , que al aumentar su concentración sería inductor de la mayor ANR, favoreciendo el crecimiento radical. Pero, de forma paralela, la mayor ANR también podría ser inductora de la mayor ANiR observada durante la segunda etapa de la experiencia, como lo indica la fuerte correlación positiva obtenida entre la ANR y la ANiR (Tabla 3).

En la raíz, el aporte de V condujo a una correlación positiva (\*\*\*) entre los pesos (Tabla 3), lo que podría deberse a un cambio metabólico orientado hacia un mayor crecimiento (Deng *et al.*, 1989). Esto explicaría la escasa incidencia del V sobre los órganos aéreos a pesar de la correlación existente entre sus parámetros (Tabla 4) (Alvarez *et al.*, 1990).

Las correlaciones positivas entre P.S.—ANR (\*\*\*) y P.S.—ANiR (\*\*)

podrían explicar la acumulación de materia seca en las raíces de las plantas crecidas con V (Tabla 3). Estos resultados concuerdan con otros autores (Granato y Raper, 1989).

Los resultados sugieren que en la raíz el Mo ejerce un ligero efecto retardado respecto del V sobre la ANR y la ANiR ( $\mu\text{mol NO}_2^- \text{ g}^{-1} \text{ PF h}^{-1}$ ) ya que se manifiesta sólo al final de la experiencia. Por el contrario, el V comenzaba su efecto inductor desde el principio, lo que explicaría las diferencias existentes entre los parámetros correlacionados. Pero, el Mo suministrado también puede ser translocado a los órganos aéreos (Gómez *et al.*, 1985) induciendo a una mayor actividad enzimática en éstos (Saco *et al.*, en prensa), efecto no tan manifiesto en las plantas tratadas con V.

TABLA 3

Correlaciones (coeficiente  $r$  de Pearson) entre los parámetros estudiados en RAIZ de *P. Vulgaris* y significación de los mismos. A) Lote Control, B) Lote Mo, C) Lote V

\*\*\*  $p < 0.01$ ; \*\*  $p < 0.05$ ; \*  $0.05 < p < 0.1$

A)

2	—						
3	—	—					
4	—	—	—				
5	-0.615*	—	—	—			
6	—	0.604*	—	—	—		
7	—	—	—				
8	—	0.747*	—			0.611*	
9	—	—	0.876**			—	—
	1	2	3	4	5	7	8

B)

2	0.786*						
3	0.727*	0.692*					
4	—	—	—				
5	—	—	—	0.671*			
6	—	—	—	—	—		
7	—	—	0.849**				
8	0.882**	0.758*	0.877**			0.684*	
9	0.804**	0.728*	0.693*			—	—
	1	2	3	4	5	7	8

C)

2	—						
3	—	0.917***					
4	—	—	—				
5	—	—	—	0.945***			
6	—	—	—	-0.611*			
7	—	0.886**	0.881**				
8	—	0.642*	0.759*			0.895**	
9	—	—	—			—	—
	1	2	3	4	5	7	8

1 Longitud, cm; 2 Peso fresco, g; 3 Peso seco, g; 4 ANR,  $\mu\text{mol NO}_2^-/\text{raíz/h}$ ; 5 ANiR,  $\mu\text{mol NO}_2^-/\text{raíz/h}$ ; 6 Proteínas totales, mg/raíz; 7 ANR,  $\mu\text{mol NO}_2^-/\text{g PF/h}$ ; 8 ANiR,  $\mu\text{mol NO}_2^-/\text{g PF/h}$ ; 9 Proteínas totales, mg/g PS.

TABLA 4

Correlaciones (coeficiente  $r$  de Pearson) entre los parámetros estudiados en TALLO de *P. vulgaris* y significación de los mismos. A) Lote Control, B) Lote Mo, C) Lote V

(\*\*\*  $p < 0.01$ ; \*\*  $p < 0.05$ ; \*  $0.05 < p < 0.1$ )

A)				B)			
2	0.874***			2	0.882***		
3	0.887***	0.955***		3	0.863***	0.929***	
4	—	—	—	4	0.598*	0.653*	—
5	—	-0.554*	-0.625*	5	—	—	—
	1	2	3		1	2	3

C)			
2	0.764***		
3	0.907***	0.948***	
4	—	—	—
5	—	-0.585*	-0.568*
	1	2	3

1 Longitud, cm; 2 Peso fresco, g; 3 Peso seco, g; 4 Proteínas totales, mg/raíz; 5 Proteínas totales, mg/g PS.

## CONCLUSIONES

El V utilizado tiene mayor incidencia sobre el desarrollo de *P. vulgaris* que el aporte suplementario de Mo. El efecto del V se manifiesta con un aumento del crecimiento de los órganos vegetativos (hojas, tallo y raíz). El órgano más sensible al aporte de V es la raíz.

Los resultados obtenidos sugieren que el Mo ejerce un efecto inductor de forma paulatina sobre la ANR radical. Este efecto sostenido se traduce en apariencia en un mayor contenido proteico sobre todo en raíz y en tallo al final del ciclo vegetativo, pero este incremento carece de significación estadística al considerar la experiencia completa.

Por el contrario, el V ejerce de forma inmediata su efecto inductor sobre la ANR. Este efecto se manifiesta no sólo con un mayor desarrollo radical, sino también con una mayor formación de materia seca en raíz y hojas.

Lo expuesto induce a pensar que el Mo aportado al ser cofactor de NR puede favorecer el desarrollo de *P. vulgaris* L. sin conducir a alteraciones metabólicas. El V, a pesar de favorecer el crecimiento radical, puede conducir a cambios metabólicos que pueden ser orientados hacia la formación de metabolitos de interés biológico.

## BIBLIOGRAFIA

- ALVAREZ, M., MARTIN, S. y SACO, D., 1990. Efecto del vanadio sobre el crecimiento, proteínas y actividad nitrato y nitrito reductasa en *Phaseolus vulgaris* L. (hojas y raíz). En: III Simposio Nacional Nutrición Mineral de las plantas, 97-107, Servei de Publicacions i Intercanvi Científic de la UIB, Palma (Mallorca).
- ALVAREZ, M., MARTIN, S. y SACO, D., 1991. Comparación del efecto del aporte de molibdeno y vanadio sobre el crecimiento y actividad nitrato reductasa en hojas de *Ph. vulgaris* L. Madrid, 325, IX Reunión S.E.F.V.
- ARYAN, A. P. and WALLACE, W., 1983. Involvement of alcohol dehydrogenase in the enhancement of the in vivo nitrate reductase activity of root tissue by propanol. *Plant Sci. Lett.*, 30: 25-32.
- ASLAM, M. and HUFFAKER, R. C., 1989. Role of nitrate and nitrite in the induction of nitrite reductase in leaves of barley seedlings. *Plant Physiol.*, 91: 1152-1156.
- BENEMAN, J. R., MCKENNA, C. E., LIE, R. F., TRAYLOR, T. G. and KAMEN, M. D., 1972. The vanadium effect in nitrogen fixation by *Azotobacter*. *Biochem. Biophys. Acta*, 264: 25-37.
- BRESLIN, V. T. and DUEDALL, I. W., 1988. Vanadium release from stabilized oil ash waste in seawater. *Environ. Sci. Technol.*, 22: 1166-1170.
- CAMMACK, R., 1986. A role of vanadium at last. *Nature*, 322:312.
- DENG, M. P., LAMAZE, T. and MOROT-GAUDRY, J. F., 1989. A new experimental approach involving the simultaneous use of tungstate and ammonium for studying the physiological effects of the absence of nitrate reduction. *Plant Physiol. Biochem.*, 27: 689-696.
- ESTEVAN, C. y SANCHEZ, R. L., 1989. Efecto del V sobre el crecimiento y actividad nitrato-reductasa en *Ph. vulgaris*, Toledo, 43. Reunión Científica Plenaria de Química Inorgánica.
- GANOR, E., ALTSHULLER, S., FONER, H. A., BRENNER, S. and GABBAY, J., 1988. Vanadium and nickel in dustfall as indicators of power plant pollution. *Water Air Soil Pollut.*, 42: 241-252.
- GOMEZ, G., MARTIN, S. y ABAD, J. B., 1985. Molibdeno y contenido de compuestos metabólicos (carbohidratos y proteínas) en *Ph. vulgaris*. *An. Edafol. Agrobiol.*, 44: 767-785.
- GRANATO, T. C. and RAPER, D. JR., 1989. Proliferation of maize roots in response to localized supply of nitrate. *J. Exp. Bot.*, 40: 263-275.
- HASANEN, E., LIPPONEN, M., KATTAINEN, R., MARKKANEN, K., MINKKINEN, P. and BRJUKHANOV, L., 1990. Elemental concentrations of aerosol samples from the Baltic Sea area. *Chemosphere*, 21: 339-347.
- HEWITT, E. J., 1983. A perspective of mineral nutrition: essential and functional metals in plants. In: *Metals and Micronutrients. Uptake and utilization by plants*. Robb, D. A. and Pierpoint, W. S. (Eds.), 277-323, Academic Press, London.
- KHAMIS, S. and LAMAZE, T., 1990. Maximal biomass production can occur in corn in the absence of nitrate accumulation in either leaves or roots. *Physiol. Plant.*, 78: 388-394.
- JAWORSKI, E. G., 1971. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 43: 1274-1279.
- JORDAN, P., KLOAREG, B. and VILTER, H., 1990. Detection of vanadium bromoperoxidases in protoplasts from the brown algae *Laminaria saccharina* and *L. digitata*. *Planta medica*, 56: 612-613.

- LOSADA, M. and PANEQUE, A., 1971. Nitrate reductase. In: Methods in Enzymology, XXIII: photosynthesis, Academic Press, New York, 487-491.
- MACKENNA, C. E., BENEMAN, J. R. and TRAYLOR, T. G., 1970. Vanadium-containing nitrogenase preparations: implication for the role of molybdenum in nitrogen fixation. Biochem. Biophys. Res. Comm., 41: 1501-1508.
- MARCUS, J. Z. and MILLS, R. J., 1988. Emissions from mass burn resource recovery facilities. Risk Anal., 8: 315-327.
- MARTIN, S., ESTEVAN, C., GOMEZ, G. y ABAD, J. B., 1985. Efecto del vanadio sobre el contenido de Mg y pigmentos liposolubles en *Ph. vulgaris*. Valencia, 87. VI. Reunión S.E.F.V.
- MARTIN, S. y SACO, D., 1989. Efecto del aporte de molibdeno sobre el crecimiento y actividad nitrato-reductasa de *Ph. vulgaris*. An. Edafol. Agrobiol., 48: 161-174.
- MEISCH, H. W. and BECKER, L. J., 1981. Vanadium in photosynthesis of *Chlorella fusca* and higher plants. Biochem. Biophys. Acta, 636: 119-125.
- ROBSON, R. L., EADY, R. R., RICHARSON, T. H., MILLER, R. W., HAWKINS, M. and POSTGATE, J. R., 1986. The alternative nitrogenase of *Azotobacter chroococcum* is a vanadium enzyme. Nature, 322: 388-390.
- SACO, D., ALVAREZ, M. y MARTIN, S., (en prensa). The activity of nitrate reductase and the content of proteins in *Nicotiana rustica* grown various levels of molibdenum. J. Plant Nutr. (en prensa).
- VILTER, H., 1990. Large-Scale extraction of vanadium-containing peroxidases from *Ascophyllum nodosum*, an alga rich in tannins and anionic mucilages. Planta medica, 56: 613-614.

Recibido: 2-3-92.

Aceptado: 11-9-92.