

49

237

Alfonso de Cires Segura

MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA DE HOJAS DE CEBADA

Alfonso de Cires Segura

Universidad de Sevilla, 1996

TD-345

TD 296



TD 345

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA
BIBLIOTECA

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi Tesis Doctoral "MODULACION DE LA ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA DE HOJAS DE CEBADA"

sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

- Consulta en depósito.
- Préstamo interbibliotecario.
- Reproducción parcial.
- Reproducción total.
- Tipo de Usuarios.
- Otros términos.

Firmado: ALFONSO DE CIRÉS SEGURA

Sevilla, a 13 de SEPTIEMBRE de 1996

R.1386Δ



MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA DE HOJAS DE CEBADA

Trabajo de investigación presentado por el Licenciado **D. Alfonso de Cires Segura** para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

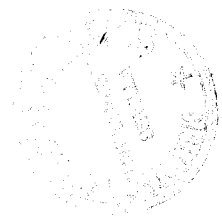
Sevilla, 1996

Directores de la Tesis:

Dr. Angel de la Torre Casas
Prof. Titular de Biología Vegetal

Dra. Catalina Lara Coronado
Prof. Titular de Bioquímica y
Biología Molecular

*... sobre todo a ti, Pilar;
y a vosotros, mis padres y hermanos,
que sí os sentiréis orgullosos...*



MIS AGRADECIMIENTOS

Lo que más recuerdo de todas y cada una de las Tesis que han pasado por mis manos ha sido esas palabras que sus autores han dedicado a su familia, amigos, colaboradores, o directores. Palabras, frases, extensos párrafos, todos llenos de gratitud y admiración, amabilidad y cordialidad, amor y humor. Siempre creí que no eran mas que un ejercicio inútil, adulación gratuita, condicionamiento social y, sobre todo, mentiras. A estas alturas, sólo mi necedad puede explicar aquellos sentimientos. Hizo falta toda la labor de redacción de este trabajo, donde mis limitaciones se han echo más que manifiestas, cuando el desaliento y la desesperación han inundado mi alma, y todas y cada una de las personas y momentos del pasado, y el presente, se han paseado por mi soledad, para valorar "esas palabras que sus autores han dedicado..." como fundamentales, condición necesaria y, sobre todo, VIDA. Ahora yo no voy a ser menos, y quisiera ser incluso más, hacer figurar junto a mi nombre en la portada, vuestros nombres, contar una a una la tarea revitalizadora con la que cada uno habéis contribuido.

Agradezco al Prof. Dr. Francisco Gil Martínez y a la Prof. Dra. Catalina Lara Coronado el haberme ofrecido la financiación necesaria en la fase final de elaboración de este trabajo mediante becas adscritas a sus respectivos proyectos.

A la Dra. Cristina Echevarría, por esas discusiones de sobremesa, donde toda especulación era válida y cada enigma fue resuelto.

Ya no recuerdo haber estado en este departamento sin Pilar, Lidia y Rosario Ni me imagino seguir sin vosotras. Sois parte de mi memoria. Permitidme que mencione especialmente a Miguel. Sabéis que es especial para todos y mucho más para mí. De hecho, es mi único amigo. Tu me has contagiado tu positivismo, ilusión y alegría inagotables. No las pierdas nunca.

Al Dr. Jean Vidal por sus discusiones científicas matutinas. Desgraciadamente fueron pocas. Afortunadamente muy gratificantes.

A la buena gente de la 116F: Dra. Delgado (mi amiga Begoña), Dra. Rodríguez (mi amiga Rocío). "Somos iguales, somos diferentes".

Por último, pero no por ello menos importante, sino todo lo contrario, mi más profundo agradecimiento, admiración y respeto para el Dr. Angel de la Torre y la Dra. Catalina Lara. Por la labor constante de dirección de este trabajo. Ellos confiaron en mí desde un principio y han soportado mi mediocridad durante cinco largos años. Con su ejemplo, han forjado tanto mis actitudes científicas como humanas. Habéis sido extremadamente pacientes conmigo y me habéis dado más de lo que se merece cualquier doctorando. Siempre os estaré agradecido.

Este trabajo se ha realizado en los Departamentos de Biología Vegetal y Ecología y de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular de esta Universidad.

Se ha financiado con cargo a los proyectos de investigación "Regulación del metabolismo fotosintético" (PB91-0611) y "Regulación postraduccional de la nitrato reductasa en plantas herbáceas" (PB94-1191-C02-02) de la DGICYT (Ministerio de Educación y Ciencia) y a las ayudas a los Grupos de Investigación "Fisiología Vegetal" (4031) y "Fotosíntesis" (3101) del Plan Andaluz de Investigación (Junta de Andalucía).

Durante el período 1990-94 he sido beneficiario de una Beca Predoctoral de la Fundación Cámara de la Universidad de Sevilla.

A todas estas instituciones agradezco la ayuda prestada.

Parte de los resultados obtenidos en esta Tesis han dado lugar a varias publicaciones y se han presentado a diferentes congresos nacionales e internacionales:

1.- PUBLICACIONES:

de Cires A, de la Torre A, Lara C (1992) Dependencia por luz de la actividad nitrato reductasa de hojas de cebada. (M. Pineda, F. Castillo eds), Sociedad Española de Bioquímica, Córdoba, pp. 88-92

de Cires A, de la Torre A, Delgado B, Lara C (1993) Role of light and CO₂ fixation in the control of nitrate reductase activity in barley leaves. *Planta* 190: 277-283

de Cires A, de la Torre A, Lara C (1993) Involvement of CO₂ fixation products in the light-dark modulation of nitrate reductase activity in barley leaves. *Physiol. Plant.* 89: 577-581

de Cires A, de la Torre A, Lara C (1994) Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la actividad nitrato reductasa de hojas de cebada. En: Bases Fisiológicas, Bioquímicas y Moleculares de la Nutrición Mineral de las Plantas, Publicaciones del V Simposium Nacional I Ibérico de Nutrición Mineral de las Plantas, Badajoz, pp. 123-127

Lara C, de Cires A, Boza M, de la Torre A (1995) Carbon control of photosynthetic nitrate assimilation. En: *Photosynthesis: from Light to Biosphere*, (P. Mathis ed), vol. 5, Kluwer Academic Publishers, Dordrech, pp. 341-346

2.- CONGRESOS:

VII Congress of the Federation of European Societies of Plant Physiology. Umea, Suecia. Agosto, 5-10 (1990). *Physiol. Plant.* 76: Abstract A80

- VIII Congress of the Federation of European Societies of Plant Physiology.**
Antwerpen, Bélgica. Agosto, 23-28 (1992). *Physiol. Plant.* 85: Abstract A93
- I Reunión Nacional del Metabolismo del Nitrógeno (S.E.B.).** Málaga, España.
Enero, 10-12 (1992). Comunicación oral
- III International Symposium on Inorganic Nitrogen Assimilation.** Tiberias,
Israel. Septiembre, 6-11 (1992). Abstract P-2
- X Reunión Nacional de la SEFV. III Congreso Hispano-Portugués de Fisiología Vegetal.** Pamplona, España. Septiembre, 21-24 (1993). Abstract 198
- XVIII Congreso Nacional de SEBBM.** San Sebastián, España. Septiembre, 28-
Octubre, 2 (1993). Abstract R. 6
- Vth Spanish-Portuguese congress of Biochemistry.** Salamanca, España.
Septiembre, 27-30 (1994). Abstracts P-VI-10 y P-VI-11
- V Simposium Nacional-I Ibérico de Nutrición Mineral de las Plantas.** Badajoz,
España. Diciembre, 18-22 (1994). Comunicación oral
- X International Photosynthesis Congress.** Montpellier, Francia. Agosto, 20-25
(1995). Conferencia invitada
- X Congress of the Federation of European Societies of Plant Physiology.**
Florencia, Italia. Septiembre, (1996)

ÍNDICE

Abreviaturas	iv
Índice de figuras	vi
Índice de tablas	ix
Índice de esquemas	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Asimilación de nitrato en plantas	3
1.1.1. Transporte de nitrato y distribución desde la raíz	3
1.1.2. Reducción de nitrato hasta amonio	4
1.1.3. Asimilación de amonio hasta aminoácidos	10
1.2. Regulación de la asimilación de nitrato	11
1.2.1. Inducción de la síntesis de la NR foliar	12
1.2.2. Modulación de la actividad	16
1.2.2.1. Sistema de interconversión redox	17
1.2.2.2. Sistema de fosforilación reversible	19
2. MATERIALES Y MÉTODOS	27
2.1. Material biológico	28
2.1.1. Especies utilizadas	28
2.1.2. Condiciones de cultivo	30
2.1.2.1. Siembra, germinación y crecimiento	30
2.1.2.2. Soluciones nutritivas	31

2.2. Suministro de solutos a la hoja por la corriente de transpiración	33
2.3. Determinación de la actividad NR en extractos de hojas	34
2.3.1. Preparación de extractos crudos y desalados de hojas	34
2.3.2. Ensayo de actividad NR	36
2.3.3. Cálculo de las concentraciones de efectores libres en el ensayo de actividad NR	37
2.4. Determinación de actividades fotosintéticas en hojas de cebada	40
2.4.1. Análisis del intercambio de CO ₂ y agua por espectroscopía de infrarrojo en fase gaseosa (IRGA)	40
2.4.2. Análisis polarográfico del intercambio de O ₂	41
2.5. Métodos analíticos	42
2.5.1. Determinación de proteínas	42
2.5.2. Determinación de pH	42
2.6. Tratamiento estadístico de los datos	43
2.7. Reactivos	44
3. RESULTADOS	45
3.1. Modulación in vivo de la actividad NR de hojas de cebada	46
3.1.1. Dependencia por luz de la actividad NR de hojas de cebada	46
3.1.2. Dependencia por CO ₂ de la actividad NR de hojas de cebada	54
3.1.2.1. Correlación entre actividad NR y fijación de CO ₂ in vivo	60

3.1.2.2. Implicación de productos de la fijación de CO ₂ en el control de la actividad NR de hojas de cebada	63
3.1.3. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la actividad NR de hojas de cebada	69
3.2. Modulación in vitro de la actividad NR foliar	76
3.2.1. Sensibilidad a Mg ²⁺ de la NR extraída de hojas de cebada y espinaca	77
3.2.2. Activación in vitro de la NR extraída de hojas de cebada y espinaca por productos de la fijación de CO ₂	82
3.2.3. Efectos in vitro del ATP sobre la NR de hojas de cebada y espinaca	92
3.3. Estudio comparado de la modulación de la actividad NR foliar en diversas especies	103
4. DISCUSIÓN	125
5. CONCLUSIONES	138
6. BIBLIOGRAFÍA	141

Abreviaturas

ABA	Ácido abscísico
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BPM _r	Azul de bromofenol reducido
Brij	Polioxietileno 23 lauril eter
BSA	Albúmina sérica bovina
CAT	Ciclo de los ácidos tricarbónicos
cit	Citocromo
CRPP	Ciclo reductivo de las pentosas-fosfato
DCPIP	Diclorofenolindofenol
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementario
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
<i>e</i>	Electrón(es)
ES	Error estándar
FAD	Flavina adenina dinucleotido
Fam.	Familia
Fd _{red/ox}	Ferredoxina reducida u oxidada
FH ₂	Flavinas reducidas
GA	Glicolaldehído
GOGAT	Glutamato sintasa
G6P	Glucosa 6-fosfato
GS	Glutamina sintetasa
GTP	Guanosina trifosfato
Hepes	Ácido N-(2-hidroxietil) piperacina-N'-(2-etanosulfónico)
H6P	Hexosas 6-fosfato
HR	Humedad relativa
IRGA	Analizador de gases por espectroscopía de infrarrojos
K _(ap)	Constante de estabilidad (aparente)
K _m	Constante de Michelis
Mal	Malato
Man	Manosa
MoCo	Cofactor de molibdeno de la NR

MV _r	Metilviológeno reducido
M. y M.	Materiales y Métodos
NAD ⁺	Nicotina adenina dinucleótido oxidado
NAD(P)H	Nicotina adenina dinucleótido (fosfato) reducido
NIP	Factor proteico inhibidor
NiR	Ferredoxina: NO ₃ ⁻ oxidorreductasa
NNEDA	N-(1-naftil)etilendiamina
NR	NADH: nitrato oxidorreductasa
OAA	Oxalacetato
p	Probabilidad
PF	Peso fresco
PGA	3-fosfoglicerato
P _i	Fosfato inorgánico
(³² P)-γ-ATP	ATP marcado radiactivamente en el fosfato en posición γ
PK	Proteína kinasa
PMS	Fenazina metosulfato
PP2A	Proteína fosfatasa de tipo 2A
ppm	Partes por millón
p/v	Peso/volumen
PVP	Polivinilpirrolidona
RFA	Radiación fotosintéticamente activa
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
TP	Triosas-fosfato
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UTP	Uridina trifosfato
v/v	Volumen/volumen
var	Variedad
v _i	Velocidad inicial
v _f	Velocidad final
V _{máx}	Velocidad máxima
x	Media aritmética

Índice de Figuras

Fig. 1	Cinética de reducción de NO_3^- dependiente de NADH por extractos crudos de hojas de cebada sometidas a transiciones luz-oscuridad-luz	47
Fig. 2	Evolución de la actividad NR extraíble de hojas de cebada sometidas a transiciones luz-oscuridad-luz	49
Fig. 3	Efecto de la adición de Mg^{2+} , Ca^{2+} , EDTA y/o P_i al medio de extracción y ensayo sobre la actividad NR inicial (A-C) y final (D-F) extraída de hojas de cebada en iluminación y oscuridad	51
Fig. 4	Actividad NR inicial (A-C) y final (D-F) en extractos crudos y desalados de hojas de cebada en iluminación y oscuridad	53
Fig. 5	Requerimiento por CO_2 para la reactivación por luz de la NR inactivada in vivo por oscuridad en hojas de cebada	55
Fig. 6	Inactivación de la NR de hojas de cebada por exclusión del CO_2 de la fase gaseosa	56
Fig. 7	Sensibilidad a microcistina de la reactivación de la NR inactivada in vivo por exclusión del CO_2 de la fase gaseosa	58
Fig. 8	Sensibilidad a microcistina de la fijación de CO_2 de hojas de cebada	59
Fig. 9	Efecto de la intensidad de luz y la composición de la fase gaseosa sobre la actividad NR extraíble de hojas de cebada	61
Fig. 10	Actividad NR en función de la velocidad de fijación de CO_2 en hojas de cebada	62
Fig. 11	Efecto del suministro de glicolaldehído, manosa, y/o P_i sobre la actividad NR extraíble de hojas de cebada	67
Fig. 12	Actividad NR extraíble de hojas de cebada cultivadas con nitrato o con amonio + nitrato como fuente de nitrógeno	74
Fig. 13	Sensibilidad a Mg^{2+} de la actividad NR extraída de hojas de cebada en luz y en oscuridad	78
Fig. 14	Sensibilidad a Mg^{2+} de la actividad NR extraída de hojas de espinaca en luz y en oscuridad	79
Fig. 15	Protección in vitro por P_i de la inhibición por Mg^{2+} de la NR extraída de hojas de cebada en iluminación y oscuridad en medio magnesio	90



Fig. 16	Activación in vitro por glucosa 6-fosfato de la NR extraída de hojas de cebada en iluminación y en oscuridad en medio magnesio	91
Fig. 17	Efecto in vitro del ATP sobre la actividad NR de hojas de espinaca en iluminación	94
Fig. 18	Efecto in vitro del ATP sobre la actividad NR de hojas de espinaca en iluminación en función del tiempo de incubación	95
Fig. 19	Efecto in vitro del ATP sobre la actividad NR de hojas de espinaca en iluminación en función de la concentración de Mg^{2+} libre	97
Fig. 20	Activación in vitro por ATP de la NR de hojas de cebada en iluminación	98
Fig. 21	Efecto in vitro del ATP sobre la actividad NR de hojas de cebada en iluminación en función del tiempo de incubación	100
Fig. 22	Activación in vitro por ATP de la NR de hojas de cebada en iluminación en función de la concentración de Mg^{2+} libre	101
Fig. 23	Respuesta a la transición luz-oscuridad y sensibilidad a Mg^{2+} de la actividad NR de hojas de maíz	105
Fig. 24	Respuesta a la transición luz-oscuridad y sensibilidad a Mg^{2+} de la actividad NR de hojas de remolacha	106
Fig. 25	Respuesta a la transición luz-oscuridad y sensibilidad a Mg^{2+} de la actividad NR de hojas de guisante	107
Fig. 26	Respuesta a la transición luz-oscuridad y sensibilidad a Mg^{2+} de la actividad NR de hojas de pepino	110
Fig. 27	Respuesta a la transición luz-oscuridad y sensibilidad a Mg^{2+} de la actividad NR de hojas de acelga	111
Fig. 28	Respuesta a la transición luz-oscuridad y sensibilidad a Mg^{2+} de la actividad NR de hojas de soja	112
Fig. 29	Respuesta a la transición luz-oscuridad y sensibilidad a Mg^{2+} de la actividad NR de hojas de calabacín	113
Fig. 30	Respuesta a la transición luz-oscuridad y sensibilidad a Mg^{2+} de la actividad NR de hojas de calabaza	114
Fig. 31	Respuesta a la transición luz-oscuridad y sensibilidad a Mg^{2+} de la actividad NR de hojas de melón	115
Fig. 32	Respuesta a la transición luz-oscuridad y sensibilidad a Mg^{2+} de la actividad NR de hojas de tabaco	116

Fig. 33 Respuesta a la transición luz-oscuridad y sensibilidad a Mg^{2+}
de la actividad NR de hojas de haba

120

Índice de Tablas

Tabla 1.	Composición en macronutrientes de las soluciones nutritivas utilizadas en los ensayos descritos en la sección 3.1.3 (Resultados)	32
Tabla 2.	Constantes de estabilidad utilizados en el cálculo de las concentraciones de efectores libres	39
Tabla 3.	Efecto del suministro de hexosas, hexosas-fosfato, dihidroxiacetona-fosfato y P_i sobre la actividad NR extraíble de hojas de cebada en iluminación y oscuridad	64
Tabla 4.	Efecto del suministro de glicolaldehído, manosa y/o P_i sobre la fijación de CO_2 en hojas de cebada	66
Tabla 5.	Actividad NR extraíble de hojas de cebada en distintas condiciones de fotosíntesis tras el suministro de nitrato o amonio	70
Tabla 6.	Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la actividad NR extraíble de hojas de cebada en luz y oscuridad	72
Tabla 7.	Inactivación por oscuridad e inhibición in vitro por Mg^{2+} de la NR de hojas de cebada y espinaca	81
Tabla 8.	Activación in vitro por hexosas-fosfato, dihidroxiacetona-fosfato y P_i de la NR extraída de hojas de cebada en iluminación y en oscuridad en medio magnesio	83
Tabla 9.	Efecto in vitro de hexosas y dihidroxiacetona sobre la NR extraída de hojas de cebada en iluminación y en oscuridad en medio magnesio	85
Tabla 10.	Efecto in vitro de hexosas, hexosas-fosfato y P_i sobre la NR extraída de hojas de cebada en iluminación y en oscuridad en ausencia de Mg^{2+}	86
Tabla 11.	Activación in vitro por hexosas-fosfato, dihidroxiacetona-fosfato y P_i de la NR extraída de hojas de espinaca en iluminación y en oscuridad en medio magnesio	88
Tabla 12.	Inactivación por oscuridad e inhibición por Mg^{2+} de la NR de hojas de las especies agrupadas en el Tipo I ó Tipo Cebada	109
Tabla 13.	Inactivación por oscuridad e inhibición por Mg^{2+} de la NR de hojas de las especies agrupadas en el Tipo II ó Tipo Espinaca	119
Tabla 14.	Requerimiento diferencial por Mg^{2+} para la inactivación in vivo de la NR en diversas especies	122

Tabla 15. Activación in vitro por glucosa 6-fosfato de la NR extraída de hojas de diversas especies en iluminación y en oscuridad en medio magnesio

123

Índice de Esquemas

Esquema 1: Modelo estructural y funcional de la NR de plantas superiores	7
Esquema 2: Compartimentalización de la asimilación de nitrato en células del mesófilo de la hoja	9
Esquema 3: Hipótesis del control por fosforilación reversible de la actividad NR de hojas de espinaca	24

I. INTRODUCCIÓN

El nitrato es la fuente de nitrógeno inorgánico más abundante en el suelo, y la mayoritariamente utilizada por las plantas. En ciertas condiciones, también pueden utilizar amonio, y algunas especies, como las leguminosas, capaces de formar asociaciones simbióticas con bacterias fijadoras de N_2 , pueden beneficiarse también de este proceso. En términos cuantitativos, se ha estimado que la asimilación de nitrato incorpora a la materia viva en la biosfera alrededor de 2×10^{10} toneladas de nitrógeno por año (Guerrero et al., 1981), una cifra dos órdenes de magnitud superior a la que aporta la fijación de N_2 (Burns y Hardy, 1975).

Análisis elementales en plantas muestran que un 2-10% de su peso seco es N, y un 40-50% es C, lo cual representa una relación C/N media de 5-15 (Bowen, 1966). Teniendo en cuenta que la asimilación fotosintética de CO_2 hasta carbohidratos requiere 4 e, y la asimilación del nitrógeno nítrico hasta el nivel de nitrógeno amínico necesita 10 e, se puede estimar que, en plantas superiores, una media de alrededor de un 20% de la energía producida por la fotosíntesis se consume en la asimilación de nitrato (Guerrero et al., 1981). Por todo ello, la asimilación de nitrato constituye un proceso anabólico fundamental del metabolismo fotosintético, del que depende además en gran medida el crecimiento y desarrollo de la planta.

A continuación resumimos los aspectos más relevantes de la ruta de asimilación de nitrato en plantas y su regulación.

1.1. ASIMILACIÓN DE NITRATO EN PLANTAS

La ruta de asimilación de nitrato en plantas está muy compartimentada entre distintos tejidos y orgánulos. Distinguiremos el transporte del ion al interior de la raíz, su translocación, vía xilema, hasta la hoja, que es el sitio mayoritario de su posterior asimilación en plantas herbáceas, su reducción hasta amonio, y finalmente, la incorporación de éste a esqueletos carbonados para formar aminoácidos.

1.1.1. Transporte de nitrato y distribución desde la raíz

La asimilación de nitrato comienza con el transporte del ion al interior de la raíz. En suelos de pH neutro o básico y bien aireados, la actividad de las bacterias nitrificantes asegura que la mayor parte del nitrógeno presente en el suelo se encuentre en forma de nitrato. No obstante, las concentraciones de nitrato en el suelo pueden experimentar una variación de hasta cinco órdenes de magnitud, por lo que el sistema de transporte de nitrato debe ser lo suficientemente versátil como para mantener los requerimientos de la planta (Crawford, 1995).

Estudios recientes han mostrado que en células epidérmicas y corticales de la raíz existen dos sistemas de transporte de nitrato. El llamado *sistema de alta afinidad* ($K_m < 0,1 \text{ mM}$) es el responsable de la incorporación de nitrato cuando éste se encuentra en concentraciones menores de 1 mM. Este sistema es activo, inducible y saturable por nitrato, y se ha propuesto un mecanismo de cotransporte electrogénico con H^+ con una estequiometría de 2 H^+ por NO_3^- . Este cotransporte produce la alcalinización del medio externo y la despolarización de la membrana plasmática (McClure et al., 1990; Ullrich, 1992). Un segundo sistema de transporte, de *baja afinidad*, también funciona en plantas cuando las concentraciones de nitrato son mayores de 1 mM. Este sistema es constitutivo y no saturable, y

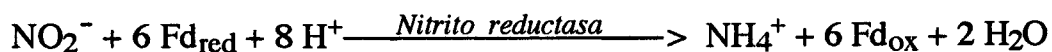
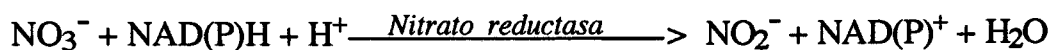
probablemente no requiere energía (Siddiqi et al., 1990; Aslam et al., 1992; Ullrich, 1992).

Una vez transportado al interior de la raíz, el nitrato puede ser reducido hasta amonio e incorporado a esqueletos carbonados en este mismo órgano, almacenado transitoriamente en las vacuolas, o transportado por el xilema hasta las hojas, sitio fundamental de su asimilación en plantas herbáceas (Lewis et al., 1986, 1987). Por el momento se desconoce el mecanismo de transporte de nitrato desde el xilema hasta el interior de la célula del mesófilo de la hoja.

En suelos ácidos, poco propicios para las bacterias nitrificantes, el amonio constituye la forma más común de nitrógeno inorgánico asimilable, por lo que las plantas también han desarrollado sistemas de transporte de este ion al interior de la raíz. Al igual que para el nitrato, en plantas superiores también existen transportadores de amonio de alta y baja afinidad (Ullrich, 1992; Glass y Siddiqi, 1995). Una vez en la raíz, el amonio, que no es normalmente translocado por el xilema en plantas herbáceas, se asimila directamente en ella hasta aminoácidos, que pueden utilizarse directamente en la raíz, en el caso de una asimilación conjunta de amonio y nitrato, o exportarse al resto de la planta si la única fuente de nitrógeno la constituye el amonio (Lewis et al., 1986, 1987).

1.1.2. Reducción de nitrato hasta amonio

La reducción de nitrato hasta amonio transcurre en dos reacciones consecutivas. En la primera de ellas, el nitrato es reducido hasta nitrito por el enzima *nitrato reductasa*, utilizando piridín-nucleótidos reducidos como donadores de poder reductor. A continuación, el nitrito es reducido hasta amonio por la *nitrito reductasa*, en una reacción que utiliza ferredoxina reducida como donador de electrones, según la siguiente secuencia:



En ciertas especies, y dependiendo de la edad o de las condiciones de cultivo, la reducción de nitrato (y posterior asimilación de amonio) puede llevarse a cabo también en la raíz (Andrews, 1986; Oaks, 1992). En estas condiciones, se han podido identificar dos isoformas de nitrato reductasa (Redinbaugh y Campbell, 1981; Dailey et al., 1982a y b): una de ellas utiliza específicamente NADH como fuente de poder reductor (NADH:NR; E.C. 1.6.6.1), mientras que la otra puede utilizar indistintamente NADH o NADPH (NAD(P)H:NR; E.C. 1.6.6.2). En ambos casos, el poder reductor procede de la degradación de carbohidratos por el ciclo oxidativo de las pentosas-fosfato (Jackson et al., 1980; Oaks y Hirel, 1985). La nitrito reductasa de raíz se localiza en los plastidios, y utiliza como donador de *e* una Fd reducida por una NADPH-Fd reductasa con NADPH generado en la vía oxidativa de las pentosas-fosfato (Suzuky et al., 1985; Bowsher et al., 1988). El amonio se asimila en la raíz mediante la ruta de la glutamina sintetasa-glutamato sintasa (GS-GOGAT), similar a la que se encuentra en hojas y cuyas características específicas se describirán más adelante.

En la mayoría de plantas herbáceas descritas en la literatura, y concretamente en cebada, la reducción de nitrato hasta amonio ocurre fundamentalmente en la hoja, así como la posterior asimilación de éste hasta aminoácidos (Lewis et al., 1986, 1987). En estos casos la nitrato reductasa foliar es un enzima inducible y específicamente dependiente de NADH (NR; NADH:NR; E.C. 1.6.6.1). A menos que se indique de otro modo, las características que se describen a continuación se referirán a esta isoforma.

La NR es un homodímero con un peso molecular de 200-240 kDa constituida por dos monómeros de 100-120 kDa (Kuo et al., 1980, Oji et al., 1985; Campbell, 1988; Caboche y Rouzé, 1990). Cada monómero contiene tres grupos prostéticos diferentes con actividad redox con una estequiometría 1:1:1 por subunidad (*Esquema 1*): un FAD, un grupo hemo (citocromo *b₅₅₇*) y un cofactor de molibdeno (MoCo), que es un complejo entre un átomo de Mo y una pterina fosforilada. El enzima de espinaca sometido a proteólisis parcial da lugar a tres fragmentos de 28 kDa, 14 kDa y 75 kDa que se corresponden con los dominios estructurales que contienen, respectivamente, al FAD, al grupo hemo y al MoCo (Solomonson y Barber, 1990; Campbell y Kinghorn, 1990).

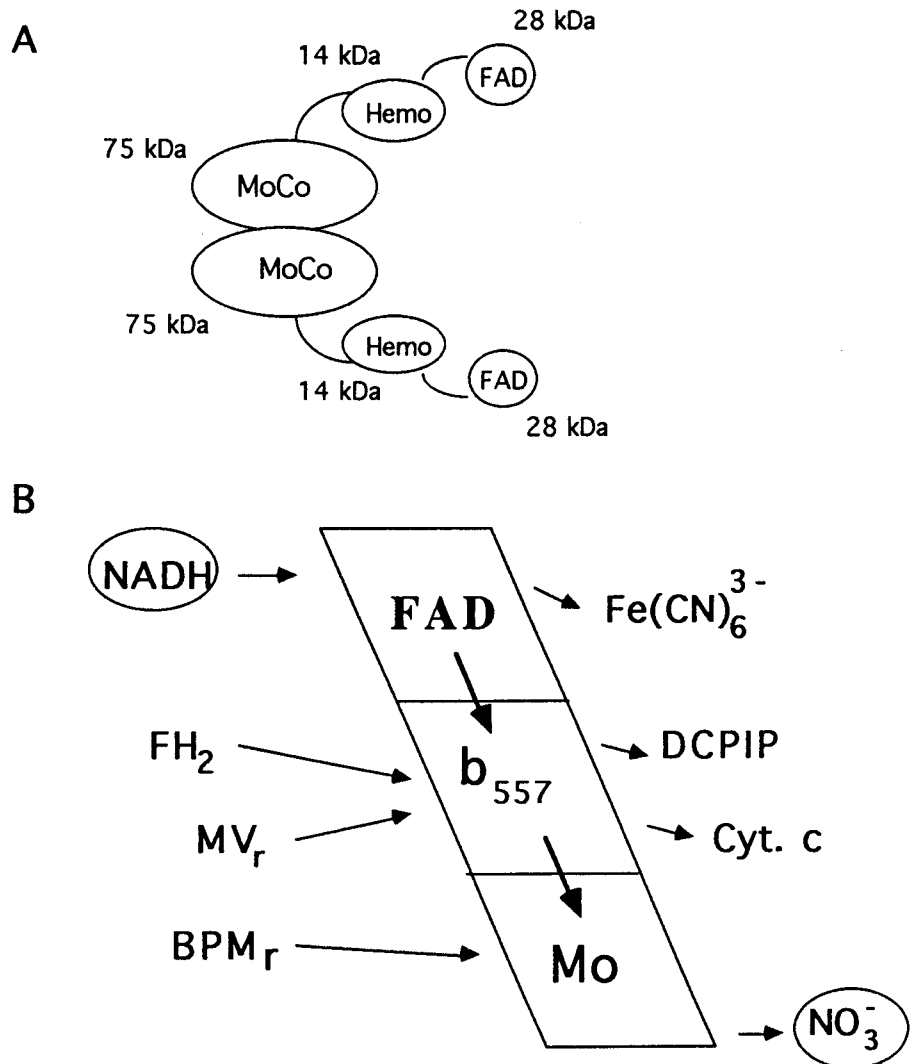
Además de su actividad fisiológica NADH:nitrato reductasa, el enzima cataliza in vitro otras actividades redox parciales utilizando diversos donadores y aceptores de electrones artificiales, que implica a uno o varios de sus grupos prostéticos. Estas actividades parciales son (Solomonson y Barber, 1990):

i) *actividad diaforasa*: implica la transferencia de *e* desde el NADH, a nivel del dominio del FAD, a aceptores directos como el ferricianuro, o a través del cit *b₅₅₇*, al diclorofenolindofenol o al cit *c* oxidado. Esta actividad parcial se inhibe por agentes bloqueantes de grupos sulfhidrilos como la *N*-etilmaleimida y el *p*-cloromercuribenzoato (*Esquema 1*).

ii) *actividad nitrato reductasa terminal*: implica la transferencia de *e* desde flavinas o metilviológeno reducidos (a través del cit *b₅₅₇* y el MoCo), o desde el azul de bromofenol reducido (a través del MoCo), hasta el nitrato. Esta actividad parcial se inhibe por cianuro, hidroxilamina, anión superóxido o acetileno (*Esquema 1*).

Desde la primera descripción y caracterización del enzima por Evans y Nason (1953), la localización intracelular de la NR no se ha establecido con

Esquema 1: Modelo estructural y funcional de la NR de plantas superiores



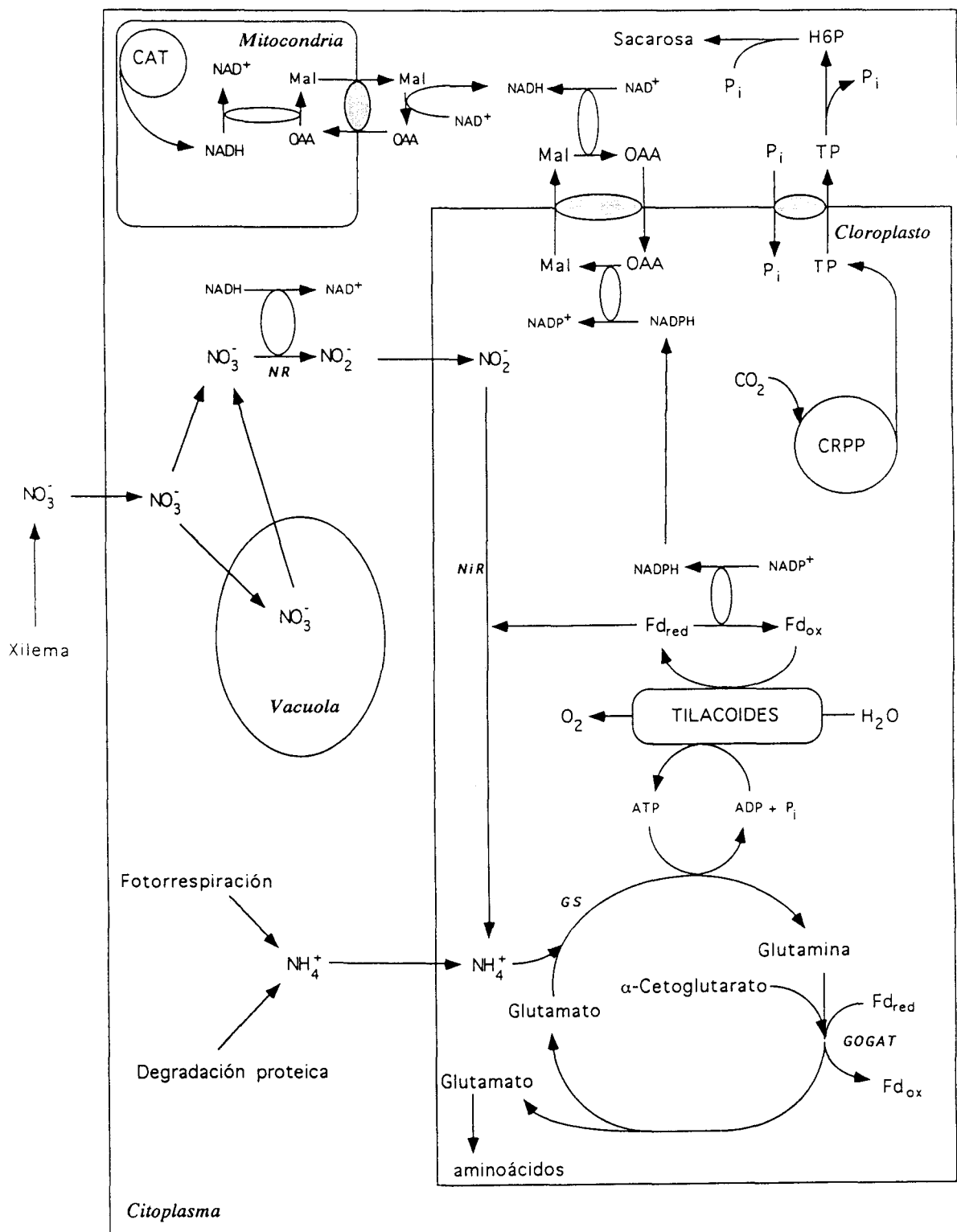
(A) Modelo estructural de la NR de espinaca obtenida por proteolisis parcial del enzima: se muestra la asociación en dímeros del enzima y los tamaños de los dominios estructurales junto a sus grupos prostéticos asociados. (B) Interacciones entre diversos aceptores y donadores de electrones con el enzima: se muestra las reacciones de transferencia electrónica entre los diversos aceptores, donadores y grupos prostéticos del enzima, y que dan lugar a las distintas actividades parciales o totales de la NR (Adaptado de Solomonson y Barber, 1990)

claridad. Aunque la gran mayoría de resultados apuntan a una localización citoplasmática de la NR (Wallsgrave et al., 1979; Beevers y Hageman, 1980; Vaughn y Campbell, 1988), algunos autores han localizado el enzima de hojas de espinaca tanto en el citoplasma como en el cloroplasto (Roldan et al., 1987) o únicamente en el cloroplasto (Kamachi et al., 1987). Recientemente se ha descrito una forma del enzima en maíz y en plántulas de cebada que estaría unida a la membrana plasmática de las células de la raíz, posiblemente implicada en el sistema de transporte de nitrato (Ward et al., 1988, 1989; Meyerhoff et al., 1994).

En hojas, el NADH utilizado para la reducción de nitrato a nitrito en el citosol procede, fundamentalmente, del poder reductor generado fotosintéticamente en el cloroplasto (De la Torre et al., 1991), y exportado al citoplasma por el translocador de P_i o la lanzadera malato/oxalacetato (Heineke et al., 1991), y en menor medida, del generado por el ciclo de los ácidos tricarbónicos de la mitocondria, exportado al citoplasma por lanzaderas malato/oxalacetato (Ebbighausen et al., 1985) (*Esquema 2*).

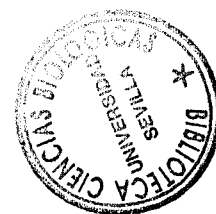
La NR ha sido caracterizada también a nivel genético. En plantas superiores, la mayoría de mutantes deficientes en asimilación de nitrato están afectados en la NR (Caboche y Rouzé, 1990). En este sentido, en plantas se identifican varios grupos de complementación caracterizados por mutantes afectados en los genes estructurales de la NR (aquellos que codifican a la apoenzima) y a los que se les denomina comúnmente genes *nia*, y particularmente en cebada, genes *nar*. Todos estos mutantes han perdido una o todas las actividades parciales de la NR. Muchos de estos genes *nia* o *nar* se han clonado y secuenciado en varias especies (Wray, 1989). El análisis genético de los mutantes confirma que el número de genes *nia* varía en las diferentes especies estudiadas; se ha encontrado un solo gen *nia* en *Nicotiana plumbaginifolia* (Gabard et al., 1987) y hasta ocho genes *nar* en cebada (Warner et al., 1987), donde los denominados *nar 1* y *nar 7* codifican la NR y la NAD(P)H:NR, respectivamente. En hojas de tomate, tabaco y arroz, la

Esquema 2: Compartimentalización de la asimilación de nitrato en células del mesófilo de la hoja



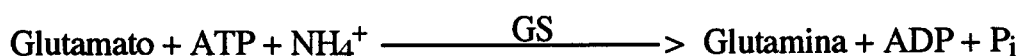
organización general de estos genes es muy similar; su secuencia está interrumpida por tres intrones de tamaño variable pero localizados en posiciones muy conservadas de una a otra especie (Daniel-Vedèle et al., 1989). En cebada, *nar 1* presenta un solo intrón, que se corresponde con el segundo intrón de las especies antes señaladas, y los dos exones no se corresponden con los dominios funcionales, mientras que *nar 7* posee dos intrones que se corresponden con los dos primeros intrones del gen de la NR de hojas de tomate (Kleinhofs y Warner, 1992). Además de los genes *nia*, se han aislado y caracterizado otros genes implicados en la biosíntesis del MoCo, y a los que se les denomina comúnmente genes *cnx*, o en cebada, genes *nar*. En *N. plumbaginifolia* (Gabard et al., 1988) y en cebada (Kleinhofs y Warner, 1992) se han caracterizado hasta seis grupos de complementación distintos.

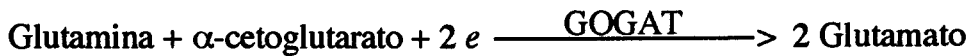
La nitrito reductasa (NiR; ferredoxina-nitrito oxidoreductasa, EC 1.7.7.1), cataliza la reducción de nitrito hasta amonio con 6 *e* donados por la Fd_{red}. El enzima de cebada está constituido por una sola cadena polipeptídica de 63 kDa. Contiene un centro sulfoférico (4Fe-4S) y un sirohemo como grupos prostéticos redox (Ip et al., 1990). En hojas, el enzima se localiza en el cloroplasto, y utiliza Fd_{red} directamente de la cadena de transporte de *e* fotosintética (Suzuky et al., 1985) (*Esquema 2*).



1.1.3. Asimilación de amonio hasta aminoácidos

El amonio, procedente de la reducción de nitrato, de otros procesos metabólicos (*e.g.* fotorrespiración, degradación proteica) o del transporte a la raíz, se incorpora a esqueletos carbonados mediante la ruta de la glutamina sintetasa-glutamato sintasa (GS-GOGAT; *Esquema 2*) que consta de dos reacciones:





La glutamina sintetasa (GS; L-glutamato: amonio ligasa; EC 6.3.1.2) cataliza la incorporación de amonio a una molécula de glutamato, formando glutamina. La reacción está acoplada a la hidrólisis de una molécula de ATP. El enzima de plantas superiores es una proteína de 320-360 kDa, constituida por ocho subunidades de 38-45 kDa. En hojas se han descrito dos isoformas del enzima, una de ellas citoplasmática (GS₁), encargada de la reasimilación del amonio fotorrespiratorio y una segunda cloroplastídica (GS₂) responsable de la asimilación primaria (Lea y Mifflin, 1974; Wallsgrove et al., 1979). En la raíz existe una sola isoforma (GS_r) de localización citosólica (Lea et al., 1992).

La glutamato sintasa (GOGAT) cataliza la transferencia del grupo amido de la glutamina al α -cetoglutarato, consumiendo 2 e y rindiendo dos moléculas de glutamato; una de las cuales recicla, constituyendo la otra el producto final de la vía. En plantas superiores se han descrito dos formas de GOGAT que difieren entre sí en la fuente de poder reductor que utilizan y en su localización: en hojas predomina la actividad GOGAT dependiente de Fd_{red} (L-glutamato: ferredoxina oxidoreductasa, transaminante; E.C. 1.4.7.1), con una localización cloroplastídica, mientras que en raíces la actividad predominante es la dependiente de NADH (L-glutamato: NAD⁺ oxidoreductasa, transaminante; E.C. 1.4.7.14) (Wallsgrove et al., 1979, 1982; Lea et al., 1992). A partir de glutamato y glutamina, y vía transaminasas o transamidadas, se obtienen los diferentes aminoácidos.

1.2. REGULACIÓN DE LA ASIMILACIÓN DE NITRATO

Dada su trascendencia, el control de la asimilación de nitrato se ha estudiado con intensidad en muchos aspectos, especialmente en lo que respecta al papel regulador que ejerce la NR, primer enzima y paso limitante del proceso (Beevers y

Hageman, 1980; Guerrero et al., 1981; Lara, 1992; Champigny, 1995). Los numerosos estudios realizados hasta la fecha han establecido el marco de conocimiento global de la regulación de la actividad NR in vivo en respuesta a variaciones de las condiciones ambientales. Esta regulación se ejerce a varios niveles, de forma secuencial o simultánea: síntesis y degradación del enzima, y modulación de su actividad por disponibilidad de sustratos y efectores y mediante modificaciones covalentes reversibles (Solomonson y Barber, 1990; Lillo, 1994; Kaiser y Huber, 1994a). Factores como la luz, el nitrato, el oxígeno, el CO₂ o diversos metabolitos determinan los niveles de actividad NR, actuando directa o indirectamente como señales reguladoras de uno o varios de los posibles mecanismos.

En este apartado se resumen algunos de los resultados más relevantes sobre la regulación de la NR a nivel de inducción de la síntesis del enzima y de modulación de su actividad.

1.2.1. Inducción de la síntesis de la NR foliar

La inducción de la síntesis de la NR foliar juega un papel fundamental en la regulación de la actividad NR. La disponibilidad de nitrato es el principal factor ambiental implicado en la inducción de la expresión de la NR (Oaks et al., 1988; Melzer et al., 1989; Li y Oaks, 1993). Recientemente, en plantas superiores se ha sugerido que ciertos metabolitos derivados de la asimilación de amonio podrían estar implicados en la represión de la síntesis de la NR (Deng et al., 1993). Hormonas como las citoquininas, el etileno o el ABA también participan en el control de la síntesis de la NR.

En plantas superiores, la inducción por nitrato de la expresión de la NR implica el incremento de la actividad NR, de la cantidad de proteína NR y de la

acumulación de RNAm-NR. Este efecto positivo del nitrato se ejerce a nivel transcripcional.

En esta inducción por nitrato, la cinética de aparición de la proteína NR y de la actividad NR se caracteriza por la existencia de una fase inicial lenta, seguida de una fase exponencial y del establecimiento de unos niveles constantes de ambos parámetros. Estos incrementos se deben a una síntesis de novo de la proteína (Kuo et al., 1981; Somers et al, 1983; Remmler y Campbell, 1986; Galangua et al., 1988). La aparición de la proteína NR precede ligeramente a la aparición de la actividad NR, lo que sugiere la necesidad de la síntesis completa del polipéptido y su ensamblaje con los grupos prostéticos (Somers et al, 1983; Remmler y Campbell, 1986; Deng et al., 1990).

La disponibilidad de DNAc de la NR de diversos orígenes ha permitido demostrar el efecto inductor del nitrato a nivel transcripcional en numerosas plantas superiores (Galangua et al., 1988; Hamat et al., 1989; Melzer et al., 1989; Lillo, 1991; Gowri et al., 1992). Estos estudios muestran que los niveles de RNAm-NR son indetectables o muy bajos antes de la adición de nitrato. Con la adición de nitrato, y tras una primera fase de lag, cuya duración depende de la especie y/o el tejido, le sigue un rápido incremento en los niveles de RNAm-NR hasta unos niveles máximos y un descenso hasta alcanzar unos niveles constantes. La acumulación del RNAm-NR es más rápida que la de proteína NR y actividad NR, apareciendo esta última paralelamente al descenso en los niveles de RNAm-NR. Diversos autores han puesto de manifiesto que la inducción por nitrato del RNAm-NR se debe a una síntesis de novo de los transcritos primarios y no a una activación de la traducción de RNAm-NR preexistentes o a la reducción en la degradación de los mismos, mientras que el descenso en los niveles de RNAm-NR debe ser el resultado de una menor síntesis de los transcritos y/o un aumento en su degradación (Melzer et al., 1989; Callaci y Smarrelli, 1991).

Además, la luz ejerce un marcado efecto positivo sobre la aparición de RNAm-NR, proteína NR y actividad NR. Aunque el nitrato es el verdadero inductor de la NR, la luz actúa modulando positivamente esta inducción (Rajasekhar et al., 1988). Tanto en plantas verdes como en etioladas, la actividad NR y la acumulación de RNAm-NR se pueden inducir por nitrato en la oscuridad (Somers et al., 1983; Rajasekhar et al., 1988; Gowri y Campbell, 1989). Sin embargo, la subsiguiente exposición a luz blanca incrementa considerablemente los niveles de RNAm-NR, proteína NR y actividad NR (Somers et al., 1983; Remmler y Campbell, 1986). También se ha sugerido que la luz, además de estimular la transcripción de los genes que codifican la NR, regularía la traducción de los RNAm-NR y/o estabilizaría la proteína NR (Vicentz y Caboche, 1991).

El efecto positivo de la luz sobre la expresión de los genes de la NR se realiza de forma indirecta. Concretamente, la sacarosa (Cheng et al., 1992), la glucosa (Lillo, 1994) así como otros productos derivados de la asimilación del carbono (Vicentz et al., 1993) son capaces de simular por sí mismos este efecto positivo de la luz, sugiriendo la implicación de estos productos de la fotosíntesis en la respuesta a la luz de la síntesis de la NR.

El fitocromo, descrito como un receptor de luz roja en plantas superiores, o un fotorreceptor adicional de luz azul, parece intervenir en la inducción de la expresión de los genes de la NR en plantas etioladas (Rajasekhar et al., 1988; Becker et al., 1992), aunque no en plantas verdes (Melzer et al., 1989). Las fluctuaciones diarias que experimentan los niveles de RNAm-NR, de proteína NR y de actividad NR, indican la mediación del ritmo circadiano (Deng et al., 1991; Lillo, 1991). La inducción por nitrato y luz de la actividad NR (Oelmüller et al., 1988) y de la acumulación de RNAm-NR (Oelmüller y Briggs, 1990) se previene si se inhibe el desarrollo de los cloroplastos. En hojas de maíz, la inhibición de la síntesis proteica organular con cloramfenicol también inhibe la acumulación de RNAm-NR

inducida por nitrato y luz (Gowri et al., 1992). Ambas observaciones parecen indicar la existencia de un factor plastídico, sintetizado en el cloroplasto, que interviene en la inducción por nitrato y luz de la expresión de la NR.

En plantas superiores, el amonio no reprime la síntesis de la NR. Cuando el amonio es la única fuente de nitrógeno disponible no se detecta RNAm-NR, ni por consiguiente, proteína NR o actividad NR (Lewis et al., 1986, 1987). Sin embargo, en plantas cultivadas con nitrato, o con nitrato combinado con amonio, se observan similares tasas de síntesis de NR (Remmler y Campbell, 1986; Crawford et al., 1988; Oaks et al., 1988). La presencia de nitrato, incluso en pequeñas concentraciones, en un medio conteniendo fundamentalmente amonio, es condición necesaria y suficiente para que se induzca la síntesis de la NR (Oaks et al., 1988).

En plantas mutantes de *Nicotiana plumbaginifolia* con una proteína NR inactiva, los niveles RNAm-NR no oscilan durante el ciclo diurno y permanecen, de forma constitutiva, en niveles altos después de la inducción por nitrato (Pouteau et al., 1989). En ciertas plantas, se ha descrito una correlación inversa entre los niveles de glutamina y los de RNAm-NR y actividad NR (Smarrelli et al., 1987; Lagendorfer et al., 1988; Deng et al., 1991) y la concentración de nitrato en células de calabacín (Lagendorfer et al., 1988). Estos resultados sugieren que algunos productos derivados de la asimilación de amonio podrían estar implicados en la regulación de la expresión de la NR. Para el caso concreto de la glutamina, se ha propuesto que su efecto negativo se ejerce directamente inhibiendo la transcripción o indirectamente inhibiendo el transporte de nitrato al citoplasma desde los espacios extracelulares o desde las vacuolas, lo que produciría una disminución de los niveles intracelulares de nitrato (Lagendorfer et al., 1988; Deng et al., 1991).

El papel de las hormonas vegetales en la regulación de la síntesis de la NR ha sido poco estudiado. Sin embargo, se han observado rápidos aumentos en los niveles de RNAm-NR y actividad NR en plantas tratadas con citoquininas y etileno, que se revierten o se inhiben con ABA (Kende et al., 1971; Schmerder y Borris, 1986). La regulación de la expresión de los genes de NR por estas dos fitohormonas se ejerce a nivel transcripcional (Lu et al., 1992).

1.2.2. Modulación de la actividad

Recientemente se ha puesto de manifiesto que la NR de hojas de espinaca (Kaiser et al., 1992; Huber et al., 1992; Riens y Heldt, 1992), cebada (de Cires et al., 1993a y b), maíz (Huber et al., 1994; Merlo et al., 1995), calabaza (Lillo, 1993) y cotiledones de pepino (Bergareche et al., 1994) se inactiva in vivo de forma rápida y reversible cuando las hojas se someten a transiciones luz-oscuridad. Esta inactivación de la NR también se manifiesta cuando las hojas de espinaca se incuban en aire carente de CO₂, o en condiciones de cierre estomático causado por déficit hídrico (Kaiser y Föster, 1989; Pace et al 1990; Kaiser y Brendle-Benhisch, 1991). La actividad NR de hojas de cebada es también dependiente de las condiciones de fijación de CO₂ (de Cires et al., 1993a y b). Estas fluctuaciones en la actividad NR no pueden explicarse como consecuencia de la síntesis o degradación del enzima (Riens y Heldt, 1992), sino que son debidas a regulación postraducciona de la NR, que implica cambios rápidos y reversibles en el estado de activación del enzima en respuesta a diferentes estados metabólicos y/o condiciones ambientales, sin modificar la cantidad total de enzima.

Hasta la fecha, se han descrito dos mecanismos rápidos de regulación de la actividad NR: interconversión redox y fosforilación reversible.

1.2.2.1. Sistema de interconversión redox

Los primeros trabajos sobre inactivación reversible de la NR se llevaron a cabo en algas, caracterizando la respuesta del enzima a cambios en las condiciones ambientales (revisados por Guerrero et al., 1981 y Solomonson y Barber, 1990). Estos estudios han llevado a postular la existencia del enzima de algas en dos conformaciones interconvertibles, una activa (oxidada) y otra inactiva (reducida). La proporción de cada una de estas formas del enzima dependería de las concentraciones intracelulares de ciertos metabolitos, que se verían afectados por dichos cambios.

El sistema de interconversión redox de la NR de *Chlorella vulgaris* se ha caracterizado en detalle (Vennesland y Jetschmann, 1971; Solomonson y Vennesland, 1972; Solomonson, 1974). La luz, el aporte de nitrato, el CO₂ y el O₂ están implicados en el control de la actividad NR a través del mecanismo de interconversión redox del enzima. Concretamente, la luz, el O₂ y la ausencia de nitrato y CO₂ favorecen la inactivación reversible de la NR in vivo (Pistorius et al., 1976). En extractos crudos de *Chlorella*, el enzima se inactiva in vitro en presencia de NAD(P)H, mientras que en preparaciones purificadas de NR es necesario, además, la presencia de cianuro. El enzima inactivado de esta forma se reactiva in vitro con ferricianuro (Solomonson, 1974; Guerrero et al., 1981). El cianuro se ha identificado como un constituyente ligado al enzima inactivado, con una constante de disociación de 10⁻¹⁰ M, similar a las determinadas en las interacciones hormona-receptor, y con una estequiometría 1:1 con el enzima (Lorimer et al., 1974). La unión del cianuro al enzima se establece a través del MoCo previamente reducido (Solomonson et al., 1984).

La NR purificada de algas verdes e inactivada in vitro por NADH más cianuro se reactiva rápidamente in vitro por luz azul pero no por luz roja, y se ha propuesto que el grupo prostético flavínico del enzima sería el responsable de la

absorción de luz (Aparicio et al., 1976; Aparicio et al., 1985). Asimismo, la luz azul también ejerce un marcado efecto activador de la NR in vivo y actúa a modo de señal positiva para la entrada de nitrato y nitrito en *M. braunii* (Aparicio y Quiñones, 1991)

Un sistema similar de interconversión redox se ha descrito para la NR foliar de plantas superiores. La NR parcialmente purificada de hojas de espinaca, trigo y maíz se inactiva in vitro por NAD(P)H y cianuro (Palacián et al., 1974; Aryan et al., 1983; Echevarría et al., 1984). En extractos parcialmente purificados de hojas de trigo, concentraciones tan bajas como 10 μM NADH son suficientes para producir una rápida inactivación de la NR. Además, concentraciones bajas de nitrato ($< 50 \mu\text{M}$) protegen contra la inactivación por NADH, lo que indica la posibilidad de que el sistema pueda operar en condiciones fisiológicas (Aryan et al., 1983). Esta inactivación se revierte in vitro por ferricianuro (Palacián et al., 1974; Aryan et al., 1983; Echevarría et al., 1984), por irradiación con luz azul (Mauriño et al., 1983; Echevarría et al., 1984), por Mn^{3+} (Maldonado et al., 1980) o por H_2O_2 (Vargas et al., 1987).

En este sistema de interconversión redox, Palacián et al. (1974) sostienen la necesidad de que el extremo carboxiterminal del enzima, donde se localiza la actividad parcial NADH-diaforasa, sea funcional para que se manifieste la inactivación por NADH. Más concretamente, estos autores proponen que en esta parte del enzima debe existir un sitio regulador distinto del catalítico, y rico en grupos disulfuros, cuya reducción daría lugar a la conformación inactiva del enzima. Echevarría et al. (1984) han descrito que la inactivación por NADH y cianuro de fracciones parcialmente purificadas de NR de hojas de maíz, afecta a su actividad NR terminal y permanece después de desalar, sugiriendo que el cianuro está firmemente unido al enzima por el dominio del MoCo. La subsiguiente reactivación por ferricianuro implicaría la oxidación de este dominio, del cual se disociaría espontáneamente el cianuro (Echevarría et al., 1984). Sin embargo, en

extractos crudos de hojas de espinaca el enzima inactivado por cianuro, hidroxilamina o NADH revierte tras el desalado (Kaiser y Brendle-Behnisch, 1991).

Por otra parte, la luz azul, en presencia de FAD, es un agente activador muy efectivo en fracciones parcialmente purificadas de NR inactivada in vitro por cianuro (Aparicio et al., 1976; Echevarría et al., 1984). La reactivación implicaría una reoxidación por el FAD, previamente exitado por la luz, del dominio del MoCo al que está unido el cianuro. Sin embargo, una iluminación más prolongada da lugar a una inactivación irreversible del enzima. En fracciones parcialmente purificadas de NR de hojas de espinaca, se ha demostrado que esta inactivación se produce por radicales superóxidos generados mediante un sistema de transferencia de energía a partir de O₂ y flavinas exitadas en estado de tripletes (Mauriño et al., 1983; Vargas et al., 1987).

1.2.2.2. Sistema de fosforilación reversible

Además del mecanismo redox, recientemente se ha propuesto que la NR foliar de plantas superiores está sometida a un mecanismo de modificación covalente reversible por fosforilación, en respuesta a las condiciones de iluminación y/o disponibilidad de CO₂, y que posibilita la regulación de la asimilación de nitrato por la fotosíntesis.

En hojas de espinaca (Kaiser et al., 1992; Huber et al., 1992; Riens y Heldt, 1992), cebada (de Cires et al., 1993a y b), maíz (Huber et al., 1994; Merlo et al., 1995), calabaza (Lillo, 1993), tabaco (Nussaume et al., 1995), *Arabidopsis* (LaBrie y Crawford, 1994), *Brassica campestris* (Kojima et al., 1994) y cotiledones de pepino (Bergareche et al., 1994), el sometimiento a un período oscuridad lleva consigo una reducción de la actividad NR de entre un 50-85% en un tiempo medio de 2 a 15 min. La reducción de la actividad NR foliar de espinaca (Kaiser y Förster,

1989; Pace et al 1990; Kaiser y Brendle-Benhisch, 1991) y cebada (de Cires et al., 1993a y b) también se manifiesta cuando se inhibe la fijación de CO₂ in vivo. La subsiguiente iluminación o restablecimiento de la fijación de CO₂ establece los niveles iniciales de actividad NR.

En espinaca, especie en la que se ha llevado a cabo la inmensa mayoría de las investigaciones, la inactivación in vivo de la NR foliar sólo es posible detectarla in vitro en presencia de concentraciones milimolares de Ca²⁺ o Mg²⁺, mientras que en su ausencia y/o en presencia de EDTA, la actividad NR permanece siempre en valores altos. La modificación ejercida sobre la NR parece afectar a su sensibilidad a la inhibición por Mg²⁺. De este modo, cuando el enzima se ensaya en ausencia de Mg²⁺ se estaría cuantificando la actividad total presente en el extracto, mientras que en presencia de cationes divalentes se estaría reflejando la modificación producida por el mecanismo de inactivación. La inhibición de la actividad NR provocada por la inhibición de la fijación de CO₂ in vivo da lugar a un descenso significativo de la V_{máx}, sin afectar los valores de K_m para el nitrato o el NADH (Kaiser y Brendle-Behnish, 1991).

Kaiser y Spill (1991), fueron los primeros en proponer la implicación del mecanismo de fosforilación reversible en la regulación de la NR foliar de espinaca. La incubación con ATP, GTP o UTP, de extractos crudos desalados procedentes de hojas de espinaca en iluminación, produce una inhibición de la actividad NR de hasta un 70%, que se revierte por la adición de AMP a los mismos extractos. La inactivación por ATP no se manifiesta en fracciones purificadas de NR. Además, diversos análogos no hidrolizables del ATP no tienen efecto sobre la NR y el γ -S-ATP produce una inhibición irreversible de la NR, lo que indica la necesidad de la hidrólisis del ATP en la inactivación in vitro de la NR foliar de espinaca (Kaiser y Spill, 1991).

En los últimos años se está investigando intensamente las características del mecanismo de fosforilación de la NR foliar y su papel en el control de la actividad del enzima (Huber et al., 1992; Mackintosh, 1992; Huber et al., 1994; Kojima et al., 1994; LaBrie y Crawford, 1994; Merlo et al., 1995; Nassuaume et al., 1995).

Huber et al. (1992) muestran que la NR de hojas de espinaca se fosforila in vivo tras el suministro de $(^{32}\text{P})\text{P}_i$. El marcaje se localiza en residuos de Ser, y la digestión parcial del enzima y su posterior análisis, muestra la existencia de tres fragmentos altamente marcados con ^{32}P . Concretamente, la intensidad del marcaje de dos de estos fragmentos, designados como Pp1 y Pp3, se correlaciona inversamente con la actividad NR. In vivo, el marcaje radiactivo de estos fragmentos es menor cuando se suministra a las hojas manosa en oscuridad (situación donde los valores de actividad NR son similares a los encontrados en iluminación), mientras que se observa un alto marcaje radiactivo de estos fragmentos cuando se suministra a las hojas ácido okadaico, un inhibidor de proteína fosfatasa, en iluminación (situación donde los valores de actividad NR son similares a los encontrados en oscuridad). En este mismo sentido, Mackintosh (1992) muestra que la NR de hojas de espinaca se inactiva in vitro por proteína quinasa y ATP y se reactiva por proteína fosfatasa del tipo 2A (PP2A). El uso de inhibidores de proteína fosfatasa aporta nuevas evidencias de la implicación del mecanismo de fosforilación reversible de la NR de hojas de espinaca en el control de la actividad. El efecto activador de la luz sobre la NR se bloquea si previamente se le suministra in vivo a la hoja ácido okadaico, microcistina, tautomicina o caliculina (Huber et al., 1992; Mackintosh, 1992; Glaab y Kaiser, 1995), descritos como potentes inhibidores de proteína fosfatasa del tipo 1 y 2A, indicando que la reactivación requiere una proteína fosfatasa activa.

Mediante el fraccionamiento de extractos crudos de hojas de espinaca con sulfato amónico (Spill y Kaiser, 1994) y/o por cromatografía en azul de sefaroza

(Mackintosh, 1992) es posible separar la NR de otras proteínas implicadas en su inactivación *in vitro* por ATP (Kaiser y Spill, 1991). El fraccionamiento de extractos crudos de hojas de espinaca en iluminación por cromatografía en azul de sefarosa, da lugar a una fracción con NR que sólo puede ser inactivada *in vitro* con ATP si se añade otra fracción eluída de la misma columna con 0,6 M NaCl, a la que se asigna actividad proteína kinasa (Mackintosh, 1992). Por otro lado, Spill y Kaiser (1994) identifican dos fracciones necesarias para inactivar *in vitro* con ATP la NR purificada de hojas de espinaca. Una de estas fracciones, P67 (67 kDa), es capaz de fosforilar a la histona III-S con (^{32}P)- γ -ATP *in vitro*, por lo que se le atribuye una actividad proteína kinasa. La otra fracción, P100 (100 kDa), no tiene actividad proteína kinasa pero es necesaria su presencia, junto a P67, para producir la inactivación *in vitro* de la NR en presencia de ATP. Estos resultados sugieren la existencia de un mecanismo de inactivación de la NR en dos pasos; en primer lugar, una fosforilación del enzima por el P67, y posteriormente, la unión del P100 al enzima fosforilado, por lo que a este último factor se le ha asignado la función de proteína inactivadora (Glaab y Kaiser, 1995). En extractos de hojas de espinaca se han purificado proteínas de característica similares, que se unen de forma estequiométrica y reversible a la NR (Yamagishi et al., 1988; Yoshimura et al., 1992).

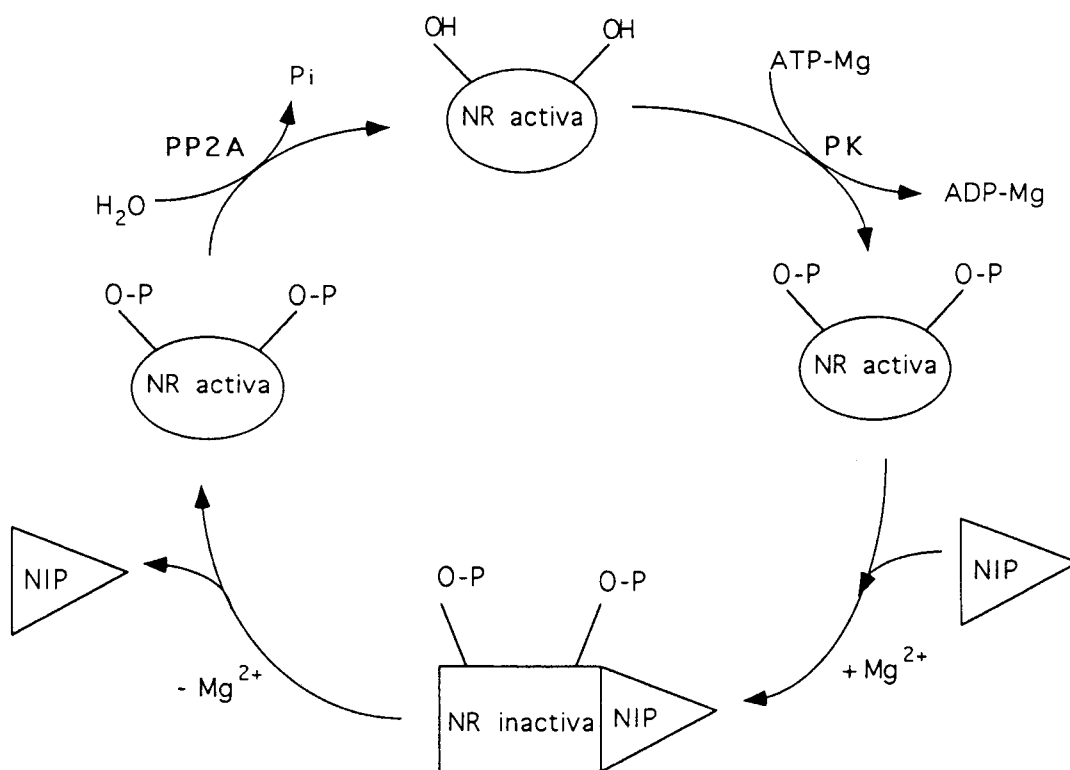
Mackintosh et al. (1995) utilizando fraccionamiento de extractos de hojas de espinaca con sulfato amónico y una posterior cromatografía en Q-sefarosa, identifican una proteína de 110 kD, a la que se ha denominado NIP (Nitrate reductase Inhibitor Protein), que es capaz de inhibir a la forma fosforilada de la NR foliar en presencia de Mg^{2+} , pero no en ausencia de éste. Además, ponen de manifiesto una fracción con actividad proteína kinasa capaz de fosforilar a la NR *in vitro* (NR-kinasa) y la implicación de una PP2A en la reactivación de la NR inactivada *in vitro* (por ATP, NR-kinasa y NIP). Paralelamente, Bachmann et al. (1995) identifican también en hojas de espinaca un factor proteico de

características similares, además de una proteína kinasa dependiente de Ca^{2+} e inhibible por varios ésteres-fosfato (e.g. glucosa 6-fosfato, DHAP), implicados en la inactivación in vitro por ATP de la NR foliar. La dependencia por Ca^{2+} de la proteína kinasa sugiere la posibilidad de que la concentración de calcio en el citosol pueda jugar un papel importante en la regulación in vivo de la NR (Bachmann et al., 1995). Más recientemente se han descritos dos PK (de 60 y 45 kDa) capaces de fosforilar a la NR de espinaca en la Ser-53, localizada en el péptido de conexión entre los dominios del hemo y del MoCo (Bachmann et al., 1996).

En conjunto, los resultados obtenidos hasta al fecha sustentan la hipótesis de la implicación de un mecanismo de fosforilación reversible en la modulación de la actividad NR de hojas de espinaca (*Esquema 3*). En este modelo de control, la fosforilación de la NR sería necesaria, pero no suficiente, para producir la inactivación del enzima. El sistema incluiría la presencia del NIP, que se uniría a la forma fosforilada del enzima en presencia de Mg^{2+} , formando un complejo NR fosforilada/ Mg^{2+} /NIP, inactivo. En este modelo, la eliminación del Mg^{2+} del medio de ensayo conllevaría la disociación del complejo, dando lugar a un enzima fosforilado totalmente activo, que explicaría el requerimiento por Mg^{2+} para detectar la inactivación por oscuridad de la NR de hojas de espinaca. Por otra parte, la activación del enzima implicaría la defosforilación de la NR por PP2A y/o la disociación del NIP (Mackintosh et al., 1995; Bachmann et al., 1995).

Una de las actividades parciales catalizadas por la NR de hojas de espinaca, concretamente la reducción de nitrato por MV reducido, es inhibida en la inactivación in vivo de la NR por oscuridad, mientras que no se afecta la actividad diaforasa (Huber et al., 1992; Mackintosh et al., 1995; Bachmann et al., 1996). Además, modificaciones de aminoácidos en el extremo N-terminal de la NR de hojas de *Arabidopsis* (LaBrie y Crawford, 1994) o deleciones en este mismo extremo de la NR de hojas de *Nicotiana plumbaginifolia* (Nussaume et al., 1995),

Esquema 3: Hipótesis del control por fosforilación reversible de la actividad NR de hojas de espinaca



La inactivación reversible de la NR de hojas de espinaca precisa de la fosforilación del enzima y su unión al factor proteico inhibidor, en el que el Mg²⁺ juega un papel esencial. PK: proteína quinasa, PP2A: proteína fosfatasa de tipo 2 A, NIP: factor proteico inhibidor (Adaptado de Mackintosh et al., 1995).

dan lugar a la pérdida de la regulación por fosforilación reversible anteriormente descrita. Estos datos sugieren que en el extremo N-terminal del enzima puede situarse la diana para la fosforilación y/o la interacción con el factor proteico inhibidor.

Bien a través de un sistema de fosforilación reversible o de cualquier otro mecanismo de modificación covalente del enzima, la actividad NR responde a las condiciones de iluminación o disponibilidad de CO₂, pero la señal o señales que median la activación por luz de la NR, así como su dependencia por CO₂, permanecen sin determinarse con claridad. Se han investigado varias posibilidades, de las que han surgido distintas hipótesis.

Inicialmente, el grupo de Kaiser propuso que la relación ATP/AMP en el citosol sería la señal que mediaría la inactivación por oscuridad de la NR (Kaiser y Spill, 1991; Kaiser et al., 1992). En condiciones de oscuridad o ausencia de CO₂, se observan los niveles más altos en la razón ATP/AMP en extractos de hojas de espinaca, mientras que en condiciones de alto CO₂ o iluminación, donde la actividad NR es alta, se encuentran los niveles más bajos en la razón ATP/AMP. Por otro lado, el suministro de manosa a la hoja a través de la corriente de transpiración, en ausencia de CO₂ o en oscuridad (Kaiser y Spill, 1991; Huber et al., 1992), protege a la NR de la inactivación. La manosa actúa como agente secuestrador de P_i citoplasmático, ya que se fosforila a manosa 6-fosfato por la hexoquinasa. Estos autores han interpretado el efecto protector de la manosa sobre la NR como una consecuencia de la disminución de la concentración de P_i en el citoplasma, y por tanto, de los niveles de ATP (Kaiser y Spill, 1991; Huber et al., 1992). No obstante, la magnitud de la variación en la razón ATP/AMP del citosol en las transiciones luz-oscuridad no es suficiente para determinar cambios en la actividad proteína kinasa (Riens y Heldt, 1992), y así ha sido reconocido posteriormente (Kaiser y Huber, 1994a). Más recientemente, en base a que la NR de discos foliares de espinaca experimenta una activación/inactivación al

acidificar/alcalinizar, respectivamente, el medio de suspensión, y que en esta respuesta está implicado el sistema de fosforilación reversible, se ha propuesto que el pH citosólico puede estar actuando de señal reguladora (Kaiser y Brendle-Behnisch, 1995). Sin embargo, esta posibilidad necesita ser confirmada, puesto que no se han medido cambios de pH citosólicos in situ. La reciente caracterización de una proteína-kinasa dependiente de Ca^{2+} en extractos de hojas de espinaca ha sugerido también la posibilidad de que la concentración de Ca^{2+} en el citosol pueda estar actuando como señal reguladora (Bachmann et al., 1995).

Uno de los objetivos de este trabajo ha sido determinar la naturaleza de la señal(es) reguladora(s) de la actividad NR foliar. Los resultados que exponemos a continuación indican que, en hojas de cebada, los productos de la fijación de CO_2 , especialmente los azúcares-fosfato, son la señal reguladora que media tanto la activación por luz de la NR como su dependencia por CO_2 , actuando como nexo regulador de la asimilación de nitrato respecto de la fijación de CO_2 .

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

2.1.1. Especies utilizadas

La mayor parte de este trabajo se ha llevado a cabo con hojas jóvenes de cebada (*Hordeum vulgare* L.) de la variedad "Hassan", obtenidas a partir de semillas producidas y proporcionadas por Senasa (Elorz, España).

Además, a efectos comparativos se han utilizado también hojas de otras especies que se relacionan a continuación, obtenidas a partir de semillas de la procedencia indicada:

- Acelga (*Beta vulgaris* L. var. cicla L.) var. comercial "Blanver". Fam. *Chenopodiaceae*. Semillas Fitó, S.A. (Barcelona, España).
- Calabacín (*Cucurbita pepo* L.) var. comercial "Virginia Blanco". Fam. *Cucurbitaceae*. Semillas Fitó, S.A. (Barcelona, España).
- Calabaza (*Cucurbita maxima* Duchesne. var. maxima. Duchesne). Fam. *Cucurbitaceae*. Semillas Falcó, S.A. (Elche, España).
- Espinaca (*Espinacia oleracea* L.) var. Resistoflay. Fam. *Chenopodiaceae*. Semillas Fitó, S.A. (Barcelona, España).
- Guisante (*Pisum sativum* L.) var. Lincoln. Fam. *Leguminosae*. Semillas Fitó, S.A. (Barcelona, España).
- Haba (*Vicia faba* L.) var. comercial "Muchapiel". Fam. *Leguminosae*. Semillas Falcó, S.A. (Elche, España).

- Lechuga (*Lactuca sativa* L.) var. comercial "Romana Larga Verde". Fam. *Compositae*. Semillas Fitó, S.A. (Barcelona, España).
- Maíz (*Zea mays* L.) var. Bianca. Fam. *Poaceae*. Pionner (Sevilla, España).
- Melón (*Cucumis melo* L.) var. comercial "Piñonet Piel de sapo - Ricamiel". Fam. *Cucurbitaceae*. Semillas Fitó, S.A. (Barcelona, España).
- Pepino (*Cucumis sativus* L.) var. comercial "Medio largo". Fam. *Cucurbitaceae*. Semillas Falcó, S.A. (Elche, España).
- Remolacha (*Beta vulgaris* L.) var. Tribel. Fam. *Chenopodiaceae*. SES-eup (Italia).
- Soja (*Glycine max* L.) var. Visir. Fam. *Leguminosae*. Pionner (Sevilla, España).
- Sorgo (*Sorghum vulgare* L.) var. Tamarán. Fam. *Poaceae*. Hillehog-N.K. (Saint-Sauveur, Francia).
- Tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) cultivar k4-14. Fam. *Solanaceae*. Instituto del Tabaco (Sevilla, España).

En todos los casos se escogieron hojas jóvenes, bien desarrolladas y de aspecto saludable, intentando seleccionar hojas de similares características en todos los experimentos. Si no se indica lo contrario, todos los ensayos se realizaron con hojas recolectadas a las 2 h del inicio del fotoperiodo. Las hojas de cebada y maíz se utilizaron a los 8 días de la siembra, las de espinaca a los 30 días y las del resto de especies a los 21 días.

Después de cada tratamiento y antes de preparar los extractos crudos, se seleccionó la parte central de la hoja, se desnervó en su caso y se determinó el peso fresco del tejido en una balanza de precisión.

Para las determinaciones de actividades fotosintéticas, se estimó la superficie foliar mediante pesada en balanza de precisión de fotocopias de los fragmentos de hoja, respecto a las de superficies de referencia.

2.1.2. Condiciones de cultivo

2.1.2.1. Siembra, germinación y crecimiento

Las plantas se cultivaron en un soporte inerte, vermiculita, previamente lavada en agua destilada. Todas las semillas se sembraron en vasos de plástico de 200 ml, rellenos de vermiculita, colocándolas a una profundidad de 1,5 cm de la superficie. Las paredes de los vasos se cubrieron con papel de aluminio para evitar el acceso de luz y su base se perforó para permitir el drenaje. A continuación, se situaron en la cámara de cultivo, y a partir de este momento se empezó a contar la edad de las plantas.

La germinación de las semillas y crecimiento de las plantas se realizó en una cámara de cultivo en condiciones controladas, con un fotoperiodo de 12 h luz (RFA de entre 350-400 μmol de fotones $\cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a 25 °C y 60±5% HR) y 12 h de oscuridad (a 20°C y 70±5% HR). La iluminación se obtuvo con una combinación de luz fluorescente (18 unidades de 36W Sylvania Luxline ES homelight de luxe) e incandescente (8 unidades de 40W Osram Superlux).

Durante el período de iluminación, la humedad ambiental se mantuvo mediante un pulverizador-atomizador de agua (Defensor AG-Model 505, Suecia) y se registró continuamente con un termohigrómetro (Lambrecht. Göttingen, Alemania). Además, la atmósfera de la cámara se agitó suavemente mediante ventiladores domésticos. Durante la germinación, los cultivos se regaron

diariamente con agua destilada, y posteriormente, con las soluciones nutritivas adecuadas, según el tipo de tratamiento.

2.1.2.2. Soluciones nutritivas

Todas las soluciones nutritivas se prepararon según los métodos generales de Hewitt (1966). Habitualmente, se utilizó una solución nutritiva con nitrato como única fuente de nitrógeno, con un pH de $6,5 \pm 0,5$, que contenía:

1.- Macronutrientes:

KNO ₃	5,00 mM
Ca(NO ₃) ₂	5,00 mM,
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	2,00 mM,
NaPO ₄ H ₂ · 2 H ₂ O	1,33 mM

2.- Micronutrientes:

NaCl	0,1 mM.
BO ₃ H ₃	50,0 μM
Fe (como sequestrene 138 Fe)*	0,1 matg/l
MnSO ₄ · H ₂ O	10,0 μM
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	10,0 μM
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	1,0 μM
Na ₂ MoO ₄	0,5 μM
CoSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2 μM

*El Fe Sequestrene aporta un 6% de hierro quelado, soluble en agua, en forma de sal férrica del ácido diamino di (*o*-hidroxifenil) diacético.

Para los ensayos descritos en el Apartado 3.1.3 (Resultados) se utilizaron plantas de cebada cultivadas con medios de distinta composición en cuanto a la

fuelle de nitr3geno. En estos casos se utilizaron soluciones Long Ashton tipo nitrato o amonio (Hewitt, 1966), con la misma composici3n en micronutrientes descrita anteriormente, y modificando la de macronutrientes para que contuvieran distintas concentraciones de nitrato y/o amonio, como se detalla en la *Tabla 1*.

Tabla 1. Composici3n en macronutrientes de las soluciones nutritivas utilizadas en los ensayos descritos en la secci3n 3.1.3 (Resultados)

Macronutriente	Fuente de nitr3geno				
	Nitrato	8,7 mM	3,0 mM	1,5 mM	0,7 mM
	Amonio	-----	8,0 mM	8,0 mM	8,0 mM
Ca(NO ₃) ₂		2,90 mM	1,50 mM	0,75 mM	0,35 mM
KNO ₃		2,90 mM	-----	-----	-----
(NH ₄) ₂ SO ₄		-----	4,00 mM	4,00 mM	4,00 mM
MgSO ₄		1,50 mM	1,50 mM	1,50 mM	1,50 mM
Na ₂ PO ₄ H		1,33 mM	1,33 mM	1,33 mM	1,33 mM
K ₂ SO ₄		1,20 mM	2,00 mM	2,00 mM	2,00 mM
CaCl ₂		1,20 mM	2,50 mM	3,25 mM	3,65 mM

El pH de los distintos medios fue de 6,5±0,5.

2.2. SUMINISTRO DE SOLUTOS A LA HOJA POR LA CORRIENTE DE TRANSPIRACIÓN

Para suministrar solutos a las hojas, éstas se cortaron por su base, y tras sumergirlas en agua se les dió un nuevo corte para evitar la obstrucción de los vasos por burbujas de aire. Posteriormente, las hojas, con su base sumergida en agua o en las distintas soluciones de ensayo, se transfirieron a una cámara de transpiración (Li-Cor 6200-13, de 250 ml de volumen total, Li-Cor Inc., EE. UU.) similar a la utilizada en el sistema de espectroscopía de gases por infrarrojos (IRGA). La cámara, de metacrilato transparente, está provista de entrada y salida de gases, sensor de humedad y temperatura y un ventilador que homogeniza la fase gaseosa y hace mínima al capa estacionaria. La cámara se gaseaba con aire u otra fase gaseosa a 25 °C y 47 % de HR y un flujo de 100 ml · min⁻¹ por cada 2 hojas introducidas en la cámara. Estos parámetros se determinaron a la salida de la cámara mediante un un flujómetro (Platon, Phlowbits Ltd., R.U.) y un sensor de humedad y temperatura (Vaisala OY, Helsinki, Finlandia).

La iluminación (350 μ mol fotones · m⁻² · s⁻¹), perpendicular a la superficie de la hoja, se proporcionó con un proyector de diapositivas (Reflecta-Diamator, Alemania) provisto de una lampara halógena de tungsteno (Philips, 100 W-24 V, Alemania) y un filtro de calor (Balzers, Alemania). La luz incidente se determinó utilizando un fotómetro-radiómetro integrador LI-COR con sensor de fotones LI-190 SB (Li-Cor Inc., EE. UU.).

Tras introducir las hojas en la cámara y cerrar ésta, se equilibró en las condiciones de flujo gaseoso iniciales y se indujo la transpiración al iluminar, monitorizándose ésta por el aumento de HR del aire de salida. El tratamiento se mantuvo normalmente durante 30 min, y se consideró adecuado cuando la diferencia de presión de vapor de agua del aire de entrada y de salida de la cámara fue aproximadamente de 0,9 kPa.

2.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD NR EN EXTRACTOS DE HOJAS

El enzima **nitrato reductasa** (NADH:NR, NADH:nitrato oxidorreductasa, E.C. 1.6.6.1), cataliza la reacción:



La actividad NR se determinó cuantificando espectrofotométricamente el nitrito formado en la reducción de nitrato dependiente de NADH. El método usado (Snell and Snell, 1949) se basa en la interacción del nitrito con la sulfanilamida, para formar, en medio ácido, una sal de diazonio. Posteriormente, ésta da lugar a un complejo coloreado estable al reaccionar con la NNEDA. Este complejo, de color rosa, tiene un máximo de absorción en el visible a 540 nm.

2.3.1. Preparación de extractos crudos y desalados de hojas

Las hojas, recién cortadas de la planta o tras los tratamientos indicados en cada caso, se congelaron rápidamente en N₂ líquido, con objeto de detener el metabolismo foliar y así obtener el enzima en un estado lo más próximo posible al que existe in vivo. Las hojas congeladas (100 mg) se pulverizaron en un mortero de porcelana, enfriado con N₂ líquido. Al mortero se añadió 2 ml de medio de extracción a 4 °C y 0,2 g de PVP insoluble, previamente lavada con agua destilada y equilibrada con tampón de extracción, quedando una relación PF/volumen de extracción de 1:20. El extracto obtenido se clarificó por centrifugación (1 min a 15.000 x g) en una Microfuge ETM (Beckman, Alemania). El sobrenadante (extracto crudo) se utilizó, bien directamente o tras desalado, en los ensayos de actividad NR.

Para el desalado de los extractos crudos se utilizaron columnas de Sephadex G-25 M (PD-10 de Pharmacia, Uppsala, Suecia). Las columnas se equilibraron previamente con 25 ml del medio de extracción utilizado en cada caso, pero sin BSA ni leupeptina. Volúmenes de hasta 2 ml de extracto crudo se aplicaron a la columna, eluyendo con el medio de extracción (sin BSA ni leupeptina) a un flujo de $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Todo el proceso se realizó a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, con una duración de 2-3 min. El factor de dilución de la muestra (calculado determinando proteínas antes y después del desalado) era de alrededor de 1,4, con rendimientos superiores al 95%.

Se han utilizado tres tipos de medios de extracción que denominamos base, magnesio y estándar, con la siguiente composición:

1.- Medio Base:

Tampón Hepes-KOH, pH 7,6	50 mM
Leupeptina	50 μM
BSA (neutralizada a pH 7,6 con KOH)	0,5 %

2.- Medio Magnesio:

Tampón Hepes-KOH, pH 7,6	50 mM
MgCl ₂	5 mM
Leupeptina	50 μM
BSA (neutralizada a pH 7,6 con KOH)	0,5 %

3.- Medio Estándar:

Tampón Hepes-KOH, pH 7,6	50 mM
KPO ₄ H ₂ -K ₂ PO ₄ H, pH 7,6	5 mM
Na ₂ EDTA (neutralizada a pH 7,6 con KOH)	5 mM
Leupeptina	50 μM
BSA (neutralizada a pH 7,6 con KOH)	0,5 %

2.3.2. Ensayo de actividad NR

Para ensayar la actividad NR se utilizaron alícuotas de 1 ml de los extractos crudos o desalados, mezclados con 1 ml de medio de ensayo preincubado a 25 °C. En cada caso, el medio de ensayo era igual al de extracción (base, magnesio o estándar), pero sin BSA ni leupeptina, y conteniendo KNO₃ para una concentración final de 2 mM.

Los ensayos se realizaron a 25 °C con agitación continua. Tras tomar una alícuota como blanco (tiempo cero), la reacción se inició con la adición de NADH para una concentración final de 0,4 mM. Hasta 10 min, se tomaron periódicamente alícuotas de 0,2 ml, que se añadieron a 0,2 ml de acetato de zinc 500 mM para detener la reacción enzimática. Tras añadir 0,1 ml de PMS 100 μM, se incubó 10 min a temperatura ambiente para oxidar el NADH restante. A continuación, se añadieron 0,25 ml de sulfanilamida al 1% (p/v) en HCl 3 N y 0,25 ml de NNEDA al 0,02% (p/v), quedando un volumen final de 1 ml. Tras otros 10 min a temperatura ambiente, las muestras se centrifugaron (10 min, 15.000 x g) en una centrífuga 202-M Sigma, Alemania.

El nitrito producido se determinó cuantificando la absorbancia a 540 nm del sobrenadante en un espectrofotómetro Hitachi 1100 (Hitachi Ltd., Tokio, Japón). La relación entre absorbancia y concentración de nitrito, se estableció mediante curvas patrón de KNO₂ en cada experimento. Tras considerar los distintos factores de dilución de la muestra, se refirió la actividad NR al peso fresco de la hoja utilizada.

En los casos donde se expresó la actividad NR como porcentaje de inactivación por oscuridad o de inhibición in vitro por Mg²⁺, se utilizó la siguiente expresión:

$$\%I = \frac{V_{(\text{control})} - V_{(\text{oscuridad } \text{ó} \text{ Mg}^{2+})}}{V_{(\text{control})}} \times 100$$

donde:

$V_{(\text{control})}$ = actividad NR en extractos de hojas en iluminación o en medio estándar.

$V_{(\text{oscuridad } \text{ó} \text{ Mg}^{2+})}$ = actividad NR en extractos de hojas en oscuridad o en medio magnesio.

2.3.3. Cálculo de las concentraciones de efectores libres en el ensayo de actividad NR

En el Apartado 3.2 (Resultados) la actividad NR de hojas de cebada y espinaca se determinó en presencia de glucosa 6-fosfato, P_i y ATP en el medio de ensayo. Estos efectores poseen una determinada capacidad para formar complejos con iones metálicos (*e.g.* Mg^{2+}), disminuyendo la concentración efectiva tanto del ion como del propio efector en el medio de ensayo. Resultaba pues necesario determinar, en nuestras condiciones de ensayo, las concentraciones de Mg^{2+} y efector libres, a partir de las constantes de estabilidad de los complejos [Mg-glucosa 6-fosfato], [Mg- P_i] y [Mg-ATP]²⁻, para determinadas concentraciones totales de cada especie.

La constante de estabilidad (K) de un complejo que define el equilibrio entre un ión metálico y un ligando viene definida por la expresión:

$$K = \frac{[M-L]}{[M]_L \times [L]_L} = \frac{[M-L]}{[M]_L \times [L]_T - [M]_L \times [M-L]}$$

donde:

$[M-L]$ = concentración del complejo ligando-ion metálico

$[M]_L$ = concentración de ion metálico libre

$[L]_L$ = concentración de ligando libre

$[L]_T$ = concentración total de ligando

Las constantes de estabilidad aparentes (K_{ap}) utilizadas (*Tab. 2*), se han tomado de la literatura y normalizado a pH 7,6 (pH del medio de ensayo de la actividad NR), mediante la expresión (O' Sullivan y Smither, 1979):

$$K_{(pH a)} = K_{(pH 7,6)} \times \frac{1 + 10^{pK_a - 7,6}}{1 + 10^{pK_a - pH a}}$$

donde:

pH a = valor de pH en el que se calcularon las K_{ap} en la literatura

pKa = valor de pKa que afecta a la concentración de la especie con actividad quelante

Para el cálculo de las concentraciones de Mg^{2+} y efector libres, se utilizó un programa informático escrito en Turbo PASCAL 3.0 (Rodríguez-Sotes y Muñoz-Clares, 1990), basado en el algoritmo descrito por Storer y Cornish-Bowden (1976). En estos cálculos se ha tenido en cuenta que, del resto de componentes del medio de ensayo de actividad NR, el NADH tiene también capacidad quelante (Duggleby y Dennis, 1970), y se ha descontado su contribución en el establecimiento de la concentración final de Mg^{2+} libre.

Tabla 2. Constantes de estabilidad utilizadas en el cálculo de las concentraciones de efectores libres

Complejo	$K_{(ap)} (M^{-1})$	Referencia
Mg-glucosa 6-fosfato	64	O ' Sullivan y Smither, 1979
Mg-PO ₄ H	414	O ' Sullivan y Smither, 1979
[Mg-ATP] ²⁻	65 x 10 ³	O ' Sullivan y Smither, 1979
[Mg-EDTA] ²⁻	10 ⁶	Dawson et al., 1969
Mg-NADH	100	Duggleby y Dennis, (1970)

Los valores de constantes de estabilidad aparente están calculados para un pH 7,6

2.4. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES FOTOSINTÉTICAS EN HOJAS DE CEBADA

2.4.1. Análisis del intercambio de CO₂ y agua por espectroscopía de infrarrojo en fase gaseosa (IRGA)

La fijación de CO₂ y la respiración se determinaron como intercambio neto de CO₂ en circuito cerrado, utilizando un analizador de gases por infrarrojos (IRGA) modelo LI-6200 provisto de una cámara para hojas tipo 6000-13 (LI-COR Inc., EE. UU.).

El equipo está formado por el analizador de CO₂ y la cámara foliar conectados mediante un circuito cerrado, por el que circula la fase gaseosa a un flujo determinado, y una unidad de control programada para realizar todas las funciones de medida y cálculo de parámetros fotosintéticos, a partir de los datos que le suministra el operador y los sensores del aparato, de acuerdo con el desarrollo teórico de von Caemmerer y Farquhar (1981). El analizador es un IRGA diferencial que basa la medida de CO₂ en la diferencia de absorción a 4,26 μm entre una célula de referencia (constantemente exenta de CO₂) y otra de medida (a la que llega el gas problema). La cámara foliar dispone de un ventilador, que hace mínima la capa estacionaria, y de sensores de humedad relativa, flujo cuántico y temperatura del aire y de la hoja. La unidad de control calcula a partir de todos los datos de medida y en intervalos de tiempo dado (normalmente 10 y 20 s) los siguientes parámetros: velocidad de fotosíntesis neta, flujo de transpiración, conductancias foliar y estomática a la difusión de vapor de agua y de CO₂, y concentración de CO₂ en el mesófilo (C_i).

Hojas de cebada cortadas, con su base sumergida en agua o en la solución indicada en cada caso, se transferían a la cámara del IRGA. Antes de iniciar la medida, el sistema se equilibraba en la fase gaseosa requerida (aire con 400 ó 1000

ppm de CO₂; N₂ con 400 ó 1000 ppm de CO₂), previamente humidificada. El intercambio de CO₂ se determinaba durante 20 min a 24±0,5 °C y una HR de 55±5%, en oscuridad o a diferentes intensidades de luz. La iluminación, perpendicular a la superficie de la hoja, se proporcionaba con un proyector de diapositivas (Reflecta-Diamator, Alemania) provisto de una lámpara halógena de tungsteno (Philips, 100 W-24 V, Alemania) y un filtro de calor (Balzers, Alemania). Las distintas intensidades de luz se obtuvieron cubriendo la cámara con diversas capas de una gasa de tul y/o variando la distancia de la fuente de luz. La luz incidente se determinó con un fotómetro-radiómetro integrador LI-COR con sensor de fotones LI-190 SB (LI-COR Inc., EE. UU.).

Antes de cada serie de medidas, el IRGA se calibraba en un rango de concentraciones de CO₂ entre 0 y 1000 ppm. La velocidad de fijación de CO₂ considerada, referida a unidad de superficie foliar, fue la media de las velocidades obtenidas entre los 5 y 15 min de la medida.

2.4.2. Análisis polarográfico del intercambio de O₂

El intercambio de O₂ en hojas de cebada se determinó polarográficamente con un electrodo de O₂ (Pt/Ag-AgCl) para fase gaseosa (Delieu y Walker, 1983; Walker, 1988) en cámara foliar (LD2 Hansatech, R.U.). El sistema permite determinar la fotosíntesis neta como desprendimiento de O₂ por unidad de tiempo y superficie foliar ($\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)

Las medidas se realizaron a 25° C en una atmósfera cerrada saturada de CO₂ (5%; proporcionado por un tampón NaHCO₃/Na₂CO₃ 1 M, pH 9, con el que se humedecía un fieltro dispuesto en la cámara foliar). La iluminación, perpendicular a la superficie de la hoja, se suministró con una fuente de luz LS2 (Hansatech, R.U.), modificando su intensidad con filtros neutros (Balzer, Alemania).

La luz incidente se determinó con un fotómetro-radiómetro integrador LI-COR con un sensor de fotones LI-190 SB (LI-COR Inc., EE. UU.).

Antes de cada medida, el sistema se calibraba con la cámara preparada, incluida la hoja. A la cámara cerrada se añadía un volumen conocido de aire (normalmente 0,5 ml) mediante una jeringa graduada. Teniendo en cuenta la temperatura a la que se realizaba el experimento, y mediante un simple cálculo, es posible establecer la correspondencia entre concentración de O₂ en μ moles y la señal en mV proporcionada por el electrodo y registrada gráficamente.

2.5. MÉTODOS ANALÍTICOS

2.5.1. Determinación de proteínas

La determinación de proteínas en extractos de hoja se realizó mediante el método colorimétrico descrito por Bradford (1976). Los extractos crudos o desalados se prepararon siguiendo la metodología descrita en el Apartado 2.3.1. La mezcla de reacción contenía 5 ml de reactivo de BIO-RAD, diluido 1:5 con agua destilada y filtrado a través de una capa de papel Wathman nº 1, al que se le añadía una alícuota de 100 μ l de extracto crudo o desalado convenientemente diluido en su mismo tampón. Tras 30 min a temperatura ambiente, se determinaba la absorbancia de la muestra a 595 nm. Los datos se referían a una curva patrón construida con concentraciones conocidas de BSA (0 a 120 μ g proteína/100 μ l).

2.5.2. Determinación de pH

Las medidas de pH se realizaron en un medidor de pH Crison modelo *micropH-2001* provisto de un electrodo Crison (Crison Instruments S.A., Alella, Barcelona, España).

2.6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

La inherente variabilidad de los procesos biológicos en los organismos vivos junto con el error experimental de los sistemas de medida, hace necesario el uso de una metodología de evaluación de los datos para establecer conclusiones a partir de los mismos (Heat, 1977; Parker, 1981).

Para analizar los resultados y su nivel de significación, éstos se han expresado normalmente como la media aritmética (\bar{x}) \pm el error estándar (ES), siendo:

$$\bar{x} = \sum x_i / n \quad \text{y} \quad \text{ES} = \text{DS} / \sqrt{n}$$

donde:

$\sum x_i$ = la suma de todos los valores de un mismo experimento.

n = número total de valores.

DS = desviación estándar de la muestra: $\text{DS} = \sqrt{(\sum x_i^2 - (\sum x_i)^2 / n) / n - 1}$

La significación se ha establecido aplicando el test "*t de Student*". Este test es muy utilizado para determinar si, con un grado de significación o probabilidad dado, dos grupos de datos son o no significativamente diferentes. Se ha elegido un nivel mínimo de significación del 5%, considerado habitual en la mayoría de los trabajos biológicos.

En general, cuando se comparen dos poblaciones de datos se indicará entre paréntesis con un factor p que representa la probabilidad de que los dos grupos de datos sean iguales. Para el grado de significación adoptado (5%), será correcto afirmar que son diferentes si $p \leq 0,05$. Si por el contrario, entre ellos no existe diferencia significativa, el valor de p será siempre mayor de 0,05.

2.7. REACTIVOS

Para la elaboración de los medios de cultivo se utilizaron productos Panreac (España), grado purísimo. En los ensayos biológicos se utilizaron tampones y productos Merck (Alemania), calidad para análisis. NADH, microcistina, azúcares, azúcares-fosfato y protectores enzimáticos fueron Sigma (EE. UU.) del mayor grado de pureza. El suministro de Fe-sequestrene fue gentileza de CIBA-GEIGY (Suiza).

Se emplearon gases puros o mezclas certificadas suministradas por SEO (Alphagaz, Madrid, España).

III. RESULTADOS

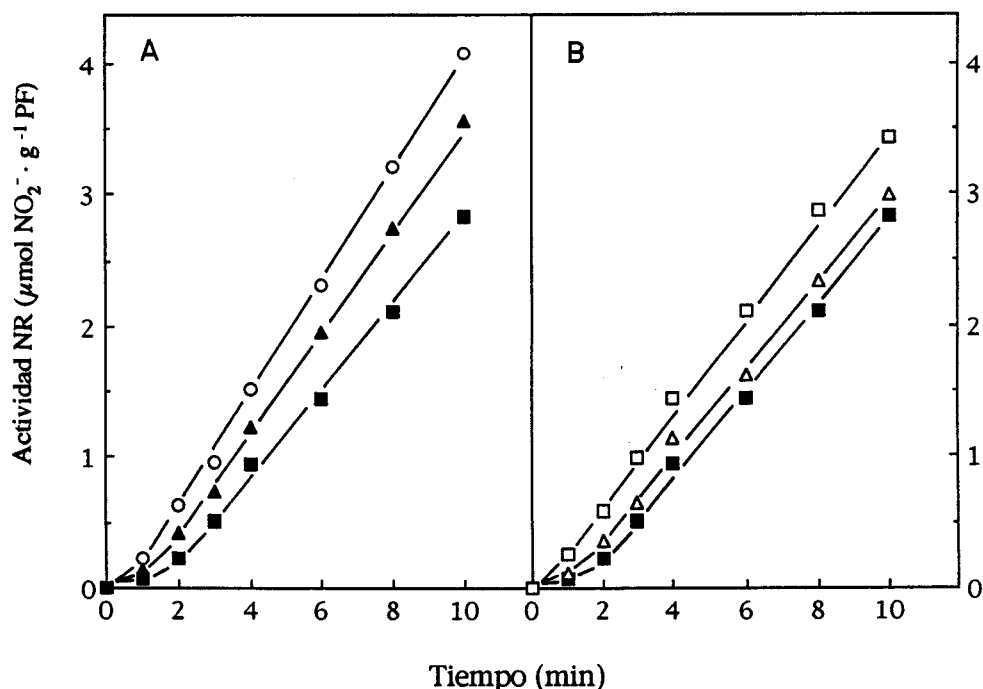
3.1. MODULACIÓN IN VIVO DE LA ACTIVIDAD NR DE HOJAS DE CEBADA

Cuando se pretende detectar respuestas rápidas de la actividad de un enzima a cambios en las condiciones ambientales o metabólicas del organismo o tejido, es preciso, bien disponer de un método de ensayo in vivo, o en su defecto, de un procedimiento rápido de extracción y ensayo que permita obtener el enzima en un estado lo más próximo posible al existente in vivo (Wirtz et al., 1982, Seeman et al., 1985). En este caso, la actividad NR de hojas de cebada se ha extraído a partir del tejido congelado instantáneamente en N₂ líquido y se ha ensayado rápidamente in vitro durante 10 min (Materiales y Métodos, Apartado 2.3). Con este procedimiento se han detectado diferencias significativas en la actividad NR de la hoja en respuestas a cambios en las condiciones de iluminación, disponibilidad de CO₂, disponibilidad de carbohidratos y fuente de nitrógeno utilizada en el crecimiento de la planta.

3.1.1. Dependencia por luz de la actividad NR de hojas de cebada

En extractos de hojas de cebada iluminadas en condiciones de cultivo, la actividad NR es prácticamente lineal durante el tiempo de ensayo, alcanzando valores de alrededor de $20 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$ (*Fig. 1A*). Cuando las plantas se sometían a períodos cortos de oscuridad, aparecía un lag en los primeros minutos de ensayo, cuya magnitud estaba en relación directa con la duración del período de oscuridad. Después de 10 y 30 min de oscuridad, la actividad NR se hacía

Fig. 1 *Cinética de reducción de NO_3^- dependiente de NADH por extractos crudos de hojas de cebada sometidas a transiciones luz-oscuridad-luz*



(A) Tras 2 h de iluminación en condiciones de cultivo (○), las plantas se mantuvieron en oscuridad durante 10 (▲) ó 30 (■) min. A continuación (B), se reiluminaron durante 10 (△) ó 30 (□) min. A los tiempos indicados, se cortaron hojas y se sumergieron rápidamente en N_2 líquido. Después de una extracción rápida en medio estándar, se determinó la reducción de NO_3^- dependiente de NADH en cada extracto (M. y M. apartado 2.3). Se presentan datos de un experimento representativo.

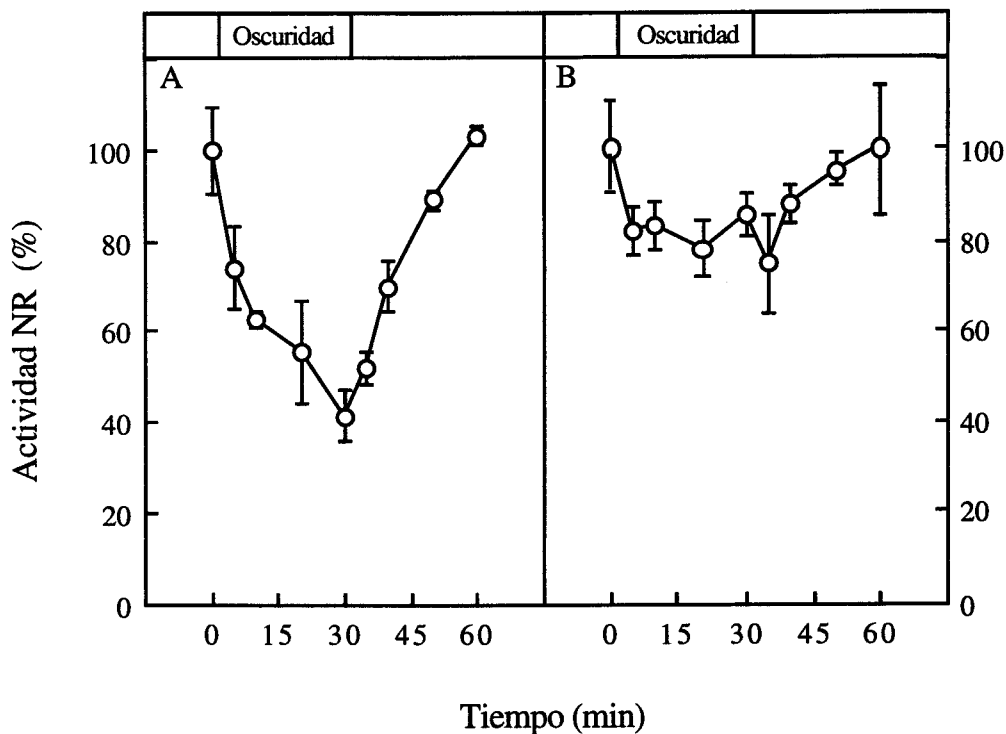
progresivamente menor durante los primeros 2 min de ensayo (12 y $8 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$ respectivamente) pero se recuperaba de forma gradual hasta alcanzar, en los 6 a 10 min finales del ensayo, valores similares a los de los extractos procedentes de hojas en iluminación (*Fig. 1A*). Este comportamiento indica que la NR se inactiva in vivo por la oscuridad y que experimenta una reactivación in vitro en las condiciones de ensayo.

Por ello, para facilitar el análisis de los resultados, se ha distinguido entre una actividad NR inicial (v_i), determinada durante los primeros 2 min de ensayo, como medida más próxima del estado de activación del enzima in vivo, y una actividad NR final (v_f), determinada entre los min 6 y 10 del ensayo, como índice de la actividad total presente en el extracto, después de la reactivación in vitro. Esta distinción ha resultado también útil en el estudio de los cambios de actividad de otros enzimas fotomodulados, como la ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa (Seeman et al., 1985).

La inactivación por oscuridad de la NR revertía al reiluminar las plantas. En la *Fig. 1B* se muestra la recuperación de la actividad NR inicial extraída de hojas que permanecieron 30 min en oscuridad y se reiluminaron durante 10 ó 30 min. Se puede observar cómo el lag inicial en la actividad NR disminuye en los extractos de hojas reiluminadas durante 10 min, y desaparece totalmente tras 30 min de reiluminación.

La evolución respecto al tiempo de la actividad NR extraíble de hojas de cebada sometidas a transiciones luz-oscuridad-luz se muestra en la *Fig. 2*. La cinética de inactivación (*Fig. 2A*) era muy rápida, disminuyendo la actividad NR inicial hasta un 40% en los primeros 10 min de oscuridad, y hasta un 60% después de 30 min. La cinética de reactivación in vivo por reiluminación de la planta era igualmente rápida. Un 70% de la actividad NR inicial se recuperaba en 10 min de reiluminación, alcanzando los valores de partida tras 30 min. La *Fig. 2B* muestra

Fig. 2 *Evolución de la actividad NR extraíble de hojas de cebada sometidas a transiciones luz-oscuridad-luz*



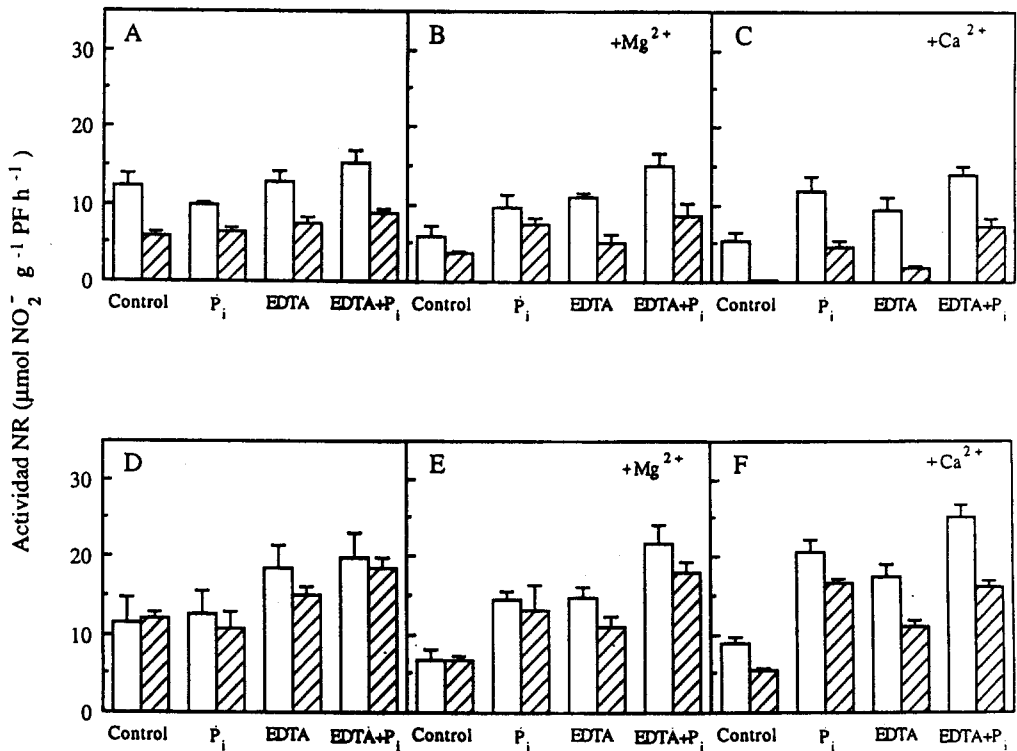
Tras 2 h de iluminación en condiciones de cultivo, las plantas se sometieron a 30 min de oscuridad y posteriormente se reiluminaron. A los tiempos indicados, se cortaron hojas y se sumergieron rápidamente en N_2 líquido. La actividad NR se extrajo y ensayó en medio estándar (M. y M. apartado 2.3). Los datos corresponden a v_i (0-2 min de ensayo, en A) y v_f (6-10 min de ensayo, en B). Se presenta la media \pm SE de, al menos, tres experimentos independientes. El 100% de actividad NR inicial (A) corresponde a $18\pm 1 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$ y el 100% de actividad NR final (B) a $19\pm 1 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$.

cómo la actividad NR final no experimentaba cambios significativos ($p > 0,1$) durante el transcurso de la transición luz-oscuridad-luz. Esto indica que los cambios rápidos de actividad NR inicial mostrados en las *Figs. 1 y 2A* reflejan cambios del estado de activación in vivo del enzima, y no son consecuencia de cambios en la cantidad de NR de la hoja. Esta inactivación reversible de la NR de hojas de cebada tras un período corto de oscuridad es similar a la descrita por Kaiser et al. (1992), Riens y Heldt (1992) y Huber et al. (1992) para la NR de hojas de espinaca.

La inactivación de la NR de hojas de espinaca por oscuridad sólo se observa cuando se ensaya en presencia de concentraciones milimolares de Ca^{2+} ó Mg^{2+} , y no se observa cuando se ensaya en presencia de EDTA o fosfato inorgánico (P_i). Por ello, se ha propuesto que la NR, fosforilada in vivo en la oscuridad, se hace sensible a la inhibición por cationes divalentes, especialmente Mg^{2+} , y esta inhibición no se manifestaría en presencia de agentes quelantes, como EDTA y P_i (Kaiser et al., 1992; Kaiser y Spill, 1991; Kaiser y Brendle-Behnisch, 1991; Huber et al., 1992). Como es evidente en las *Figs. 1 y 2*, la inactivación por oscuridad de la NR de hojas de cebada se manifiesta utilizando medios de extracción y ensayo que contienen EDTA y P_i a concentraciones de 5 mM (medio estándar). Para analizar el posible efecto de los cationes divalentes sobre la inactivación por oscuridad de la NR de hojas de cebada se han analizado distintos medios de extracción y ensayo en la manifestación de la modulación de la actividad NR .

Como muestra la *Fig. 3*, tanto los cationes divalentes como el EDTA y/o el P_i afectan significativamente a las actividades iniciales y finales de la NR procedente de hojas en iluminación y en oscuridad. En medio base, es decir, en ausencia de cationes divalentes, EDTA y P_i , la actividad NR inicial de hojas en oscuridad era aproximadamente un 50% inferior a la obtenida en iluminación (*Fig. 3A*), siendo prácticamente idénticas ($p > 0,1$) las actividades finales en ambos casos (*Fig. 3D*). Si EDTA y/o P_i están presentes en los medios de extracción y ensayo, se

Fig. 3 Efecto de la adición de Mg^{2+} , Ca^{2+} , EDTA y/o P_i al medio de extracción y ensayo sobre la actividad NR inicial (A-C) y final (D-F) extraída de hojas de cebada en iluminación y oscuridad



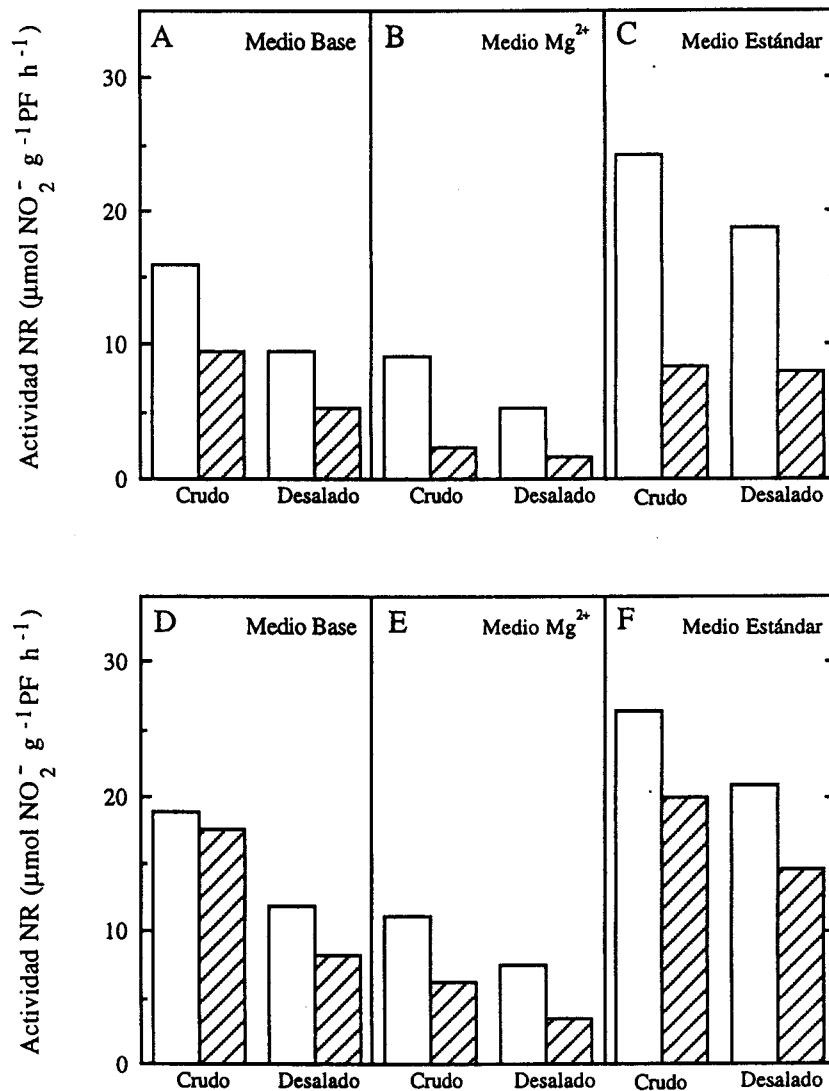
Se utilizaron extractos procedentes de hojas iluminadas durante 2 h en condiciones de cultivo (□) y posteriormente sometidas a 30 min de oscuridad (▨). El medio base de extracción y ensayo (M. y M. apartado 2.3) se suplementó en su caso, con 5 mM de $MgCl_2$, $CaCl_2$, Na_2EDTA y/o fosfato potásico, pH 7,6 como se indica en los paneles. Se presenta la media \pm SE de, al menos, tres experimentos independientes.

observaba un incremento de las actividades iniciales de la NR de hojas en luz y en oscuridad, manteniéndose las diferencias luz-oscuridad (*Fig. 3A*). En estos casos, las actividades NR finales también aumentaban a valores similares (*Fig. 3D*). Esto indica que la NR inactivada in vivo en oscuridad puede reactivarse in vitro totalmente, como se indicaba anteriormente, y que en presencia de EDTA y P_i se favorece dicha reactivación.

Si se añadía Mg^{2+} durante la extracción y el ensayo, se obtenían actividades NR iniciales inferiores a las obtenidas en medio base (*Fig. 3B*). La adición de Ca^{2+} a los medios de extracción y ensayo también producía una reducción significativa de la actividad NR inicial, llegando a anularse totalmente la de hojas en oscuridad (*Fig. 3C*). En presencia de Mg^{2+} o Ca^{2+} , las actividades NR finales resultaron más bajas que en ausencia de cationes divalentes (*Fig. 3E, F*). Esto indica que el Mg^{2+} y el Ca^{2+} interfieren la reactivación in vitro de la NR de hojas de cebada, estabilizando su forma inactiva. En presencia de cationes divalentes, tanto el EDTA como el P_i producían un incremento de las actividades NR iniciales y finales, protegiendo totalmente al enzima contra el efecto negativo del Mg^{2+} (*Fig. 3B, E*) o el Ca^{2+} (*Fig. 3C, F*).

Se ha analizado también el efecto que pudieran tener iones y componentes de bajo peso molecular presentes en los extractos crudos sobre la modulación de la actividad NR. Para ello se han comparado las actividades en extractos crudos y sus correspondientes alícuotas desaladas (*Fig. 4*). En todos los medios (base, magnesio y estándar) se observaba que, tras desalar, la actividad NR de hojas en luz u oscuridad resultaba entre un 20 y un 40% inferior a la de los extractos crudos, aunque en todos ellos se mantenían las diferencias luz-oscuridad. Estos resultados indican que el desalado de los extractos crudos es una etapa prescindible en el protocolo de ensayo rápido en cualquiera de los medios, puesto que las diferencias luz-oscuridad no se alteran significativamente. El medio estándar, sin embargo,

Fig. 4 *Actividad NR inicial (A-C) y final (D-F) en extractos crudos y desalados de hojas de cebada en iluminación y oscuridad*



Se determinó la actividad NR en extractos crudos y en sus correspondientes alícuotas desaladas (M. y M. apartado 2.3) de hojas iluminadas durante 2 h en condiciones de cultivo (\square) y posteriormente sometidas a 30 min de oscuridad (\square con líneas diagonales). Se utilizaron los medios base (A, D), magnesio (B, E) y estándar (C, F) para la extracción, desalado y ensayo. Se presentan datos de un experimento representativo.

permitía determinar actividades NR más altas después del desalado y más similares a las de los extractos crudos (*Fig. 4C, F*).

En vista de estos resultados, hemos elegido como condiciones óptimas de extracción y ensayo de actividad NR de hojas de cebada para estudios de modulación in vivo el medio estándar, que contiene EDTA y P_i y carece de cationes divalentes.

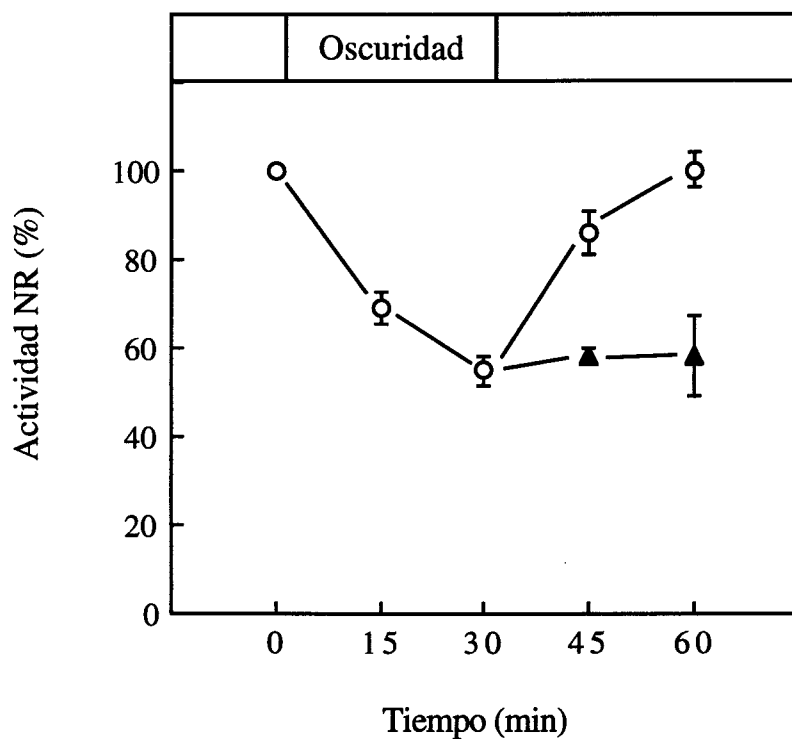
3.1.2. Dependencia por CO_2 de la actividad NR de hojas de cebada

Kaiser y Foster (1989) han puesto de manifiesto que la reducción de nitrato por hojas de espinaca depende de la disponibilidad de CO_2 de las mismas. La actividad NR de hojas de cebada es dependiente de la fijación de CO_2 .

En primer lugar, la fotomodulación de la NR de hojas de cebada depende de la disponibilidad de CO_2 . Como se mostraba en la *Fig. 2*, la NR de hojas de cebada, inactivada in vivo al someter las hojas a una transición luz-oscuridad, se reactiva al reiluminar las hojas en aire, pero en la *Fig. 5* se observa que la NR permanecía inactiva cuando la reiluminación se realizaba en una atmósfera de aire carente de CO_2 . Esto indica que la luz es condición necesaria, pero no suficiente, para producir la reactivación de la NR. Es preciso también que la reiluminación se realice en presencia de CO_2 .

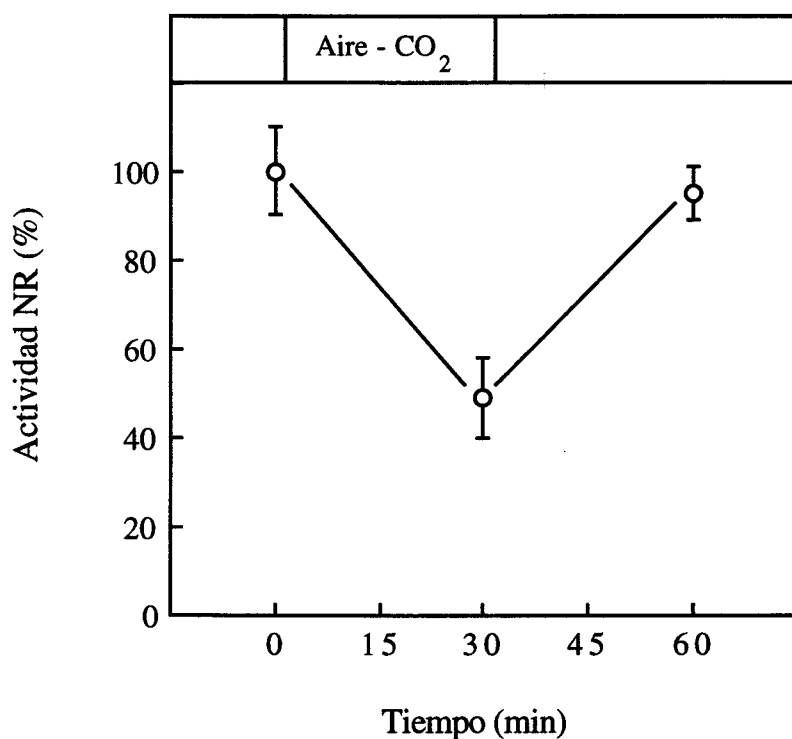
La evolución respecto al tiempo de la actividad NR extraíble de hojas de cebada sometidas, en condiciones de iluminación continua, a una transición aire-[aire libre de CO_2]-aire pone en evidencia un patrón de inactivación-reactivación muy similar al que muestra el enzima en una transición luz-oscuridad-luz. Como se observa en la *Fig. 6*, tras incubar las hojas 30 min en aire libre de CO_2 , se producía

Fig. 5 *Requerimiento por CO₂ para la reactivación por luz de la NR inactivada in vivo por oscuridad en hojas de cebada*



Se utilizaron plantas de cebada iluminadas durante 2 h en condiciones de cultivo. Las hojas cortadas, con su base sumergida en agua destilada, se dispusieron en una cámara de transpiración (M. y M. apartado 2.2) y se sometieron a 30 min de oscuridad (○) y posteriormente se reiluminaron en aire (○) o en aire libre de CO₂ (▲). A los tiempos indicados, las hojas se sumergieron rápidamente en N₂ líquido. La actividad NR se extrajo y ensayó en medio estándar (M. y M. apartado 2.3). Se presenta la media±SE de v_i (0-2 min de ensayo) de tres experimentos independientes. El 100% corresponde a una actividad NR de 21±0,2 μmol NO₂⁻ · g⁻¹ PF · h⁻¹.

Fig. 6 *Inactivación de la NR de hojas de cebada por exclusión del CO₂ de la fase gaseosa*



Se utilizaron plantas de cebada iluminadas durante 2 h en condiciones de cultivo. Las hojas cortadas, con su base sumergida en agua destilada, se dispusieron en una cámara de transpiración (M. y M. apartado 2.2) y se incubaron durante 30 min en aire libre de CO₂ y posteriormente de nuevo en aire. A los tiempos indicados, las hojas se sumergieron rápidamente en N₂ líquido. La actividad NR se extrajo y ensayó en medio magnesio (M. y M. apartado 2.3). Se presenta la media±SE de v_i (0-2 min de ensayo) de, al menos, tres experimentos independientes. El 100% corresponde a una actividad NR de 8,6±0,9 μmol NO₂⁻ · g⁻¹ PF · h⁻¹.

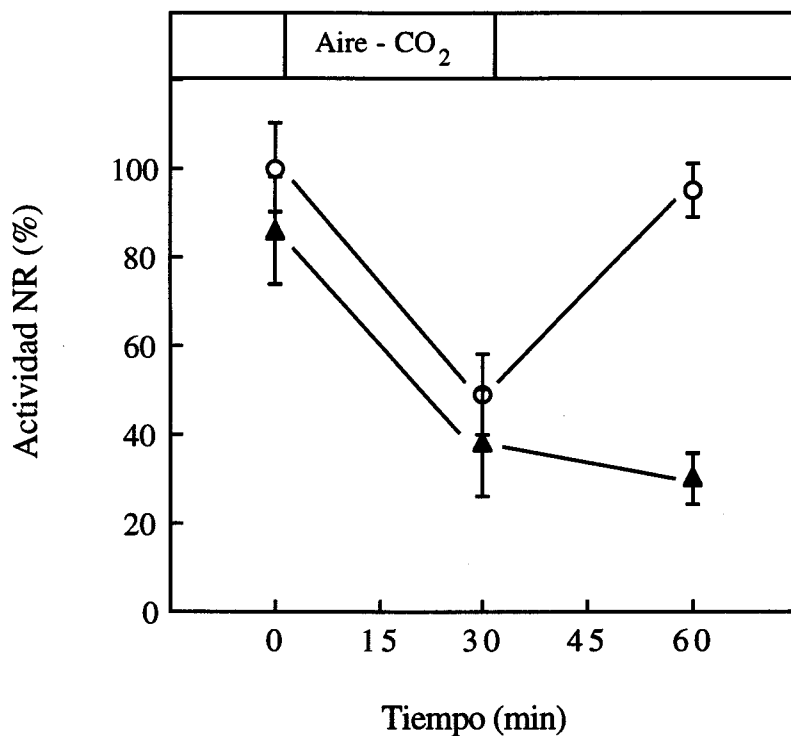
una inactivación de la NR de hasta un 50%, y la actividad se recuperaba prácticamente al 100% tras 30 min de incubación en aire.

Los trabajos de otros autores en hojas de espinaca (Mackintosh, 1992; Kaiser et al., 1993; Kaiser y Huber, 1994a) muestran que la reactivación por luz de la NR inactivada en oscuridad es sensible a inhibidores de proteínas fosfatasas tipo 1 y 2A, tales como la microcistina o el ácido okadaico. Esta es una de las evidencias en las que se sustenta la propuesta de que la actividad NR resulta modulada durante las transiciones luz-oscuridad por modificación covalente reversible por fosforilación/defosforilación. En condiciones de oscuridad, la NR sería fosforilada por una proteína kinasa, y su reactivación implicaría la correspondiente defosforilación por proteínas fosfatasas (Mackintosh, 1992; Kaiser et al., 1993; Kaiser y Huber, 1994a).

La *Fig. 7* muestra que la NR de hojas de cebada, inactivada in vivo por incubación de las hojas en aire carente de CO₂, permanecía inactiva si, previamente, se suministraba microcistina a las hojas por la corriente de transpiración. Esto indica que el mecanismo de reactivación de la NR por CO₂ es similar al de reactivación por luz, siendo ambos sensibles a microcistina.

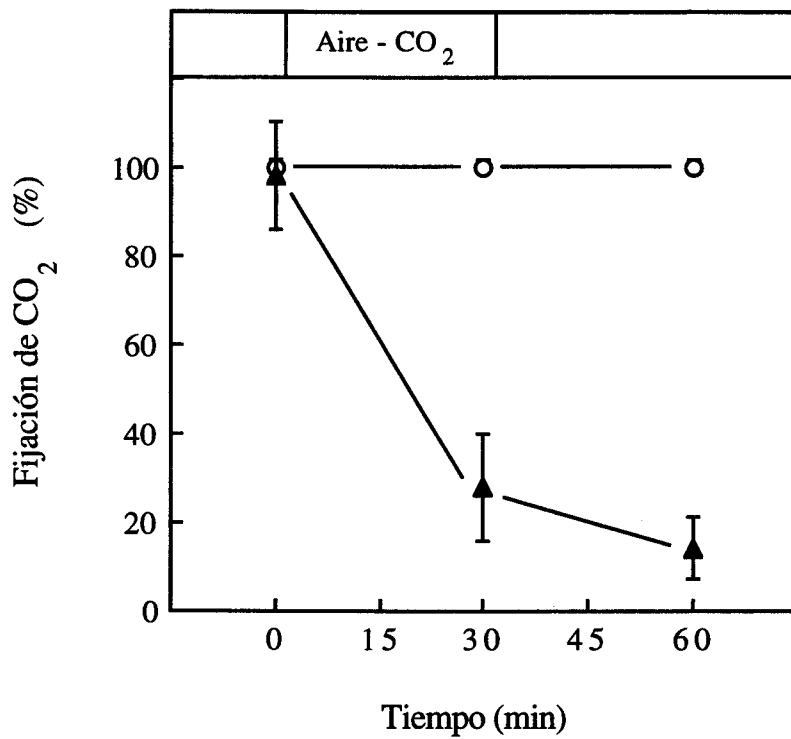
Con objeto de ensayar otros posibles efectos colaterales de la microcistina sobre el metabolismo foliar, se determinó su efecto sobre la capacidad de fijación de CO₂ en hojas incubadas en las condiciones de la *Fig. 7*. Los resultados de la *Fig. 8* muestran que la microcistina inhibe drásticamente la fijación de CO₂. Tras 30 min de suministro de microcistina a la hoja en aire, la fijación de CO₂ in vivo se reduce un 70% respecto a la de hojas control, y la inhibición aumenta hasta un 85% tras 60 min de suministro de microcistina. Por tanto, la sensibilidad a microcistina de la reactivación de la NR in vivo no puede adscribirse sólo a la inhibición de la PP2A, puesto que tras el suministro de microcistina también se inhibe la fijación de CO₂.

Fig. 7 *Sensibilidad a microcistina de la reactivación de la NR inactivada in vivo por exclusión del CO₂ de la fase gaseosa*



Se utilizaron plantas de cebada iluminadas durante 2 h en condiciones de cultivo. Las hojas cortadas, se mantuvieron con su base sumergida en una disolución de microcistina 10 μ M (▲) conteniendo 0,25% etanol; 3,8 mM Tris-HCl pH, 7,0; y 0,0025% Brij, o sólo el disolvente (O). El resto de condiciones como en la Fig. 6.

Fig. 8 *Sensibilidad a microcistina de la fijación de CO₂ de hojas de cebada*



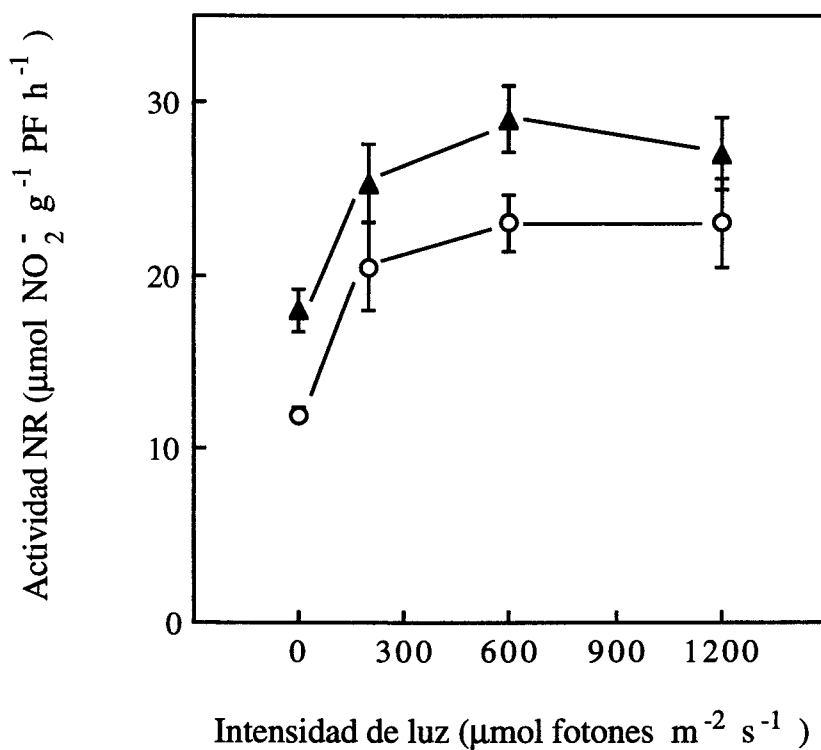
Parte de las hojas utilizadas en la Fig. 7 se transfirieron, a los tiempos indicados, a la cámara del IRGA para la determinación de la fijación de CO₂ in vivo, en atmósfera de aire y a $350 \mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (M. y M. apartado 2.4.1). El 100% corresponde a $12 \pm 0,2 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

3.1.2.1. Correlación entre actividad NR y fijación de CO₂ in vivo

Con objeto de analizar la dependencia por luz y CO₂ de la NR de hojas de cebada, se ha determinado la actividad NR en extractos de hojas incubadas en oscuridad o diferentes intensidades de luz en atmósferas de aire o de N₂ conteniendo 1000 ppm CO₂. Como se muestra en la *Fig. 9*, en las hojas incubadas en ambas atmósferas la respuesta de la NR a las condiciones de iluminación era similar y paralela. La iluminación durante 30 min a 200 $\mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ daba lugar a la activación de la NR, pero el aumento de la intensidad de luz hasta 1200 $\mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ no producía un efecto suplementario significativo ($p > 0,1$) sobre el estado de activación del enzima. En las hojas incubadas en N₂ con 1000 ppm CO₂, en las que no ocurre respiración ni fotorrespiración, la actividad NR era significativamente superior ($p < 0,005$) a cualquier intensidad de luz que en las hojas incubadas en aire. La mayor actividad NR en estas hojas en oscuridad indica que la inactivación por oscuridad de la NR disminuye al suprimir la respiración, y el comportamiento de la NR a cualquier intensidad de luz en condiciones de alto CO₂ y ausencia de O₂ indica que la activación de la NR responde mejor a condiciones que favorecen la fijación neta de CO₂ que a la iluminación en sí.

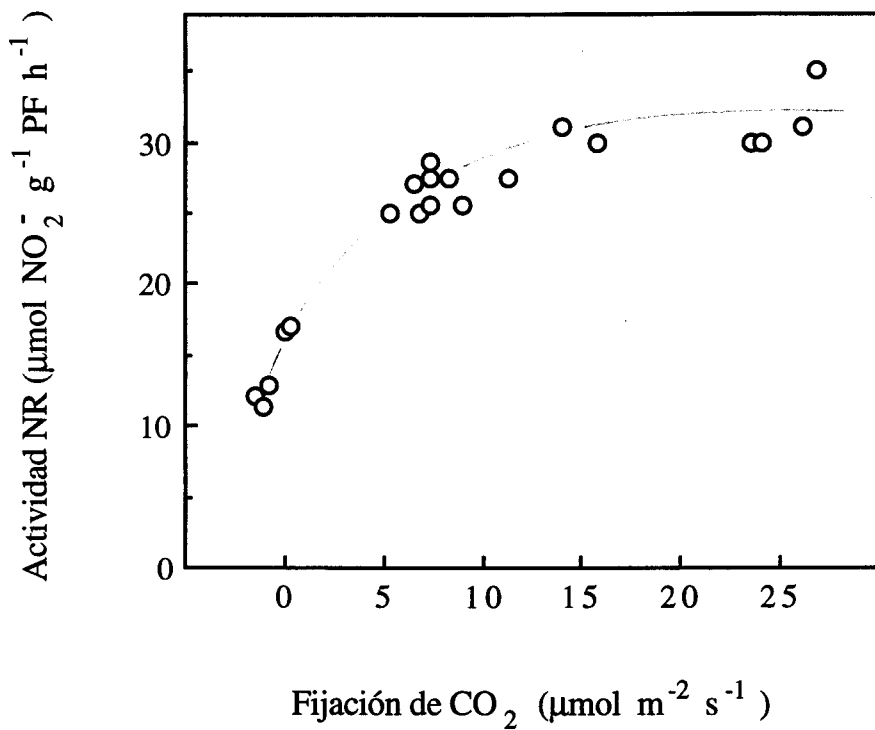
Para ensayar esta hipótesis, se determinó la actividad NR extraíble de hojas de cebada preincubadas en distintas fases gaseosas (aire ó N₂ con 400 ó 1000 ppm CO₂) y a diferentes intensidades de luz (0-1200 $\mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) que permitieron obtener un rango amplio de velocidades de fijación de CO₂. La relación entre actividad NR y velocidad de fijación de CO₂ in vivo se muestra en la *Fig. 10*. Las actividades NR más bajas (11-12 $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$) se obtuvieron en hojas en aire y oscuridad en condiciones de respiración. La actividad NR aumentó a 16 $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$ en oscuridad y anaerobiosis. La iluminación hasta 1200 $\mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ aumentó la actividad NR

Fig. 9 *Efecto de la intensidad de luz y la composición de la fase gaseosa sobre la actividad NR extraíble de hojas de cebada*



Se utilizaron plantas de cebada iluminadas durante 2 h en condiciones de cultivo. Las hojas cortadas, con su base sumergida en agua destilada, se dispusieron en una cámara de transpiración (M. y M. apartado 2.2) y se incubaron durante 30 min en aire (O) ó en N_2 con 1000 ppm CO_2 (\blacktriangle) a las intensidades de luz indicadas. La actividad NR se extrajo y ensayó en medio estándar (M. y M. apartado 2.3). Se presenta la media \pm SE de v_i (0-2 min de ensayo) de, al menos, tres experimentos independientes.

Fig. 10 *Actividad NR en función de la velocidad de fijación de CO₂ en hojas de cebada*



Se utilizaron plantas de cebada iluminadas durante 2 h en condiciones de cultivo. Las hojas cortadas, con su base sumergida en agua destilada, se mantuvieron durante 20 min en la cámara del IRGA (M. y M. apartado 2.4.1) en oscuridad ó a intensidades de luz de 200 a 1200 μmol de fotones $\cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ en aire ó N₂ con 400 ó 1000 ppm de CO₂. Tras medir la velocidad de fijación de CO₂, se determinó inmediatamente la actividad NR en medio estándar (M. y M. apartado 2.3). Los valores corresponden a v_i (0-2 min de ensayo). Se presentan datos de siete experimentos independientes.

hasta valores de $24-28 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$ en hojas en aire ó N_2 con 400 ppm CO_2 y de $25-35 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$ en aire ó N_2 con 1000 ppm CO_2 . De la **Fig. 10** se deduce la existencia de una correlación hiperbólica entre actividad NR y velocidad de fijación de CO_2 . Esto sugiere que la actividad NR de la hoja muestra una cinética de saturación respecto a la velocidad de fijación de CO_2 , en la que la activación semimáxima de la NR se correspondería con valores de fijación de CO_2 del orden de $6 \mu\text{moles CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Los datos apoyan la idea de que el sistema de activación de la NR se satura por productos de la fijación de CO_2 , y que tanto la fotomodulación del enzima como su dependencia por CO_2 estarían mediados por una señal común. En consecuencia, la fotomodulación de la NR sería simplemente un reflejo de su dependencia por la fijación de CO_2 .

3.1.2.2. Implicación de productos de la fijación de CO_2 en el control de la actividad NR de hojas de cebada

Con objeto de analizar la hipótesis anterior, se procedió a estudiar el efecto de diversos productos de la fijación de CO_2 (azúcares y azúcares-fosfato), sobre la modulación de la actividad NR de hojas de cebada.

Cuando se suministraba a la hoja glucosa, glucosa 6-fosfato, fructosa 6-fosfato, DHAP o P_i a través de la corriente de transpiración, se observó un aumento de la actividad NR en iluminación sobre la obtenida en hojas control con agua ($p < 0,05$). Esto es particularmente significativo en las hojas suministradas con glucosa 6-fosfato, cuya actividad NR aumentaba más del 50% (**Tab. 3**). Por otra parte, el suministro de azúcares o azúcares-fosfato protegió parcial o totalmente a la NR de la inactivación por oscuridad. Este efecto se evidencia claramente en el caso del suministro de DHAP, que producía una actividad NR en oscuridad similar a la del

Tabla 3. Efecto del suministro de hexosas, hexosas-fosfato, dihidroxiacetona-fosfato y P_i sobre la actividad NR extraíble de hojas de cebada en iluminación y oscuridad

Tratamiento	Actividad NR (% del control luz)	
	Luz	Oscuridad
Control, agua	100	50±3
Glucosa	122±9	83±3
Glucosa 6-fosfato	157±7	78±10
Fructosa	95±2	64±3
Fructosa 6-fosfato	119±3	69±2
Fructosa 1,6-bisfosfato	98±1	81±3
Dihidroxiacetona-fosfato	121±9	105±7
P_i	123±8	85±14

Se utilizaron plantas de cebada iluminadas durante 2 h en condiciones de cultivo. Las hojas cortadas, con su base sumergida en agua destilada o en las soluciones correspondientes a una concentración de 10 mM, se dispusieron en una cámara de transpiración (M. y M. apartado 2.2). Después de 30 min en iluminación se sacaron la mitad de las hojas y se congelaron en N_2 líquido. El resto de las hojas permanecieron en la cámara durante otros 30 min en oscuridad, antes de su congelación en N_2 líquido. La actividad NR se extrajo y ensayó en medio estándar (M. y M. apartado 2.3). Se presenta la media±SE de la v_i (0-2 min de ensayo) de, al menos, tres experimentos independientes. El 100% corresponde a $20 \pm 1 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$.

control en iluminación ($p < 0,005$; *Tab. 3*). Estos datos indican que el suministro de azúcares-fosfato a la hoja aumenta el estado de activación de la NR en iluminación y protege al enzima contra la inactivación en oscuridad. Resultados similares a los presentados en la *Tab. 3*, obtenidos con extractos crudos, se obtuvieron en el mismo tipo de experimentos realizados con extractos desalados (datos no mostrados), lo cual indica que la activación observada sobre la NR se produce in vivo y se mantiene estable después de desalar los extractos.

El glicolaldehído y la manosa, son inhibidores de la fijación de CO₂ con distintos mecanismos de acción. El glicolaldehído se ha descrito en cianobacterias y en cloroplastos aislados, como inhibidor de la regeneración de ribulosa 1,5-bisfosfato a partir de triosas-fosfato en el ciclo de Calvin (Sicher, 1984; Miller y Canvin, 1989). Suministrado in vivo a hojas de cebada a concentraciones de 30 mM, el glicolaldehído produce inhibiciones de la fijación de CO₂ superiores al 80% tras 20 min de tratamiento (Delgado, 1995). La manosa inhibe la fijación de CO₂ en hojas al actuar como agente secuestrador de P_i. En el citoplasma de las células del mesófilo, la manosa es fosforilada por la hexokinasa a manosa 6-fosfato, un producto no metabolizable, lo cual crea un déficit de P_i que limita la velocidad de reciclaje de P_i al cloroplasto, y en consecuencia la fotofosforilación (Herold et al., 1976, Herold y Lewis, 1977; Sivak y Walker, 1986; Leegood, 1989).

Cuando se suministraba glicolaldehído 50 mM a las hojas, se producía una inhibición de la fijación de CO₂ superior a un 80% (*Tab. 4*) y, paralelamente, un decremento significativo en la actividad NR de hojas en iluminación ($p < 0,05$), que se mantenía en valores similares a los de hojas control en oscuridad (*Fig. 11*). Estos datos son consistentes con la idea de que los productos de la fijación de CO₂ actúan como mediadores de la activación por luz de la NR.

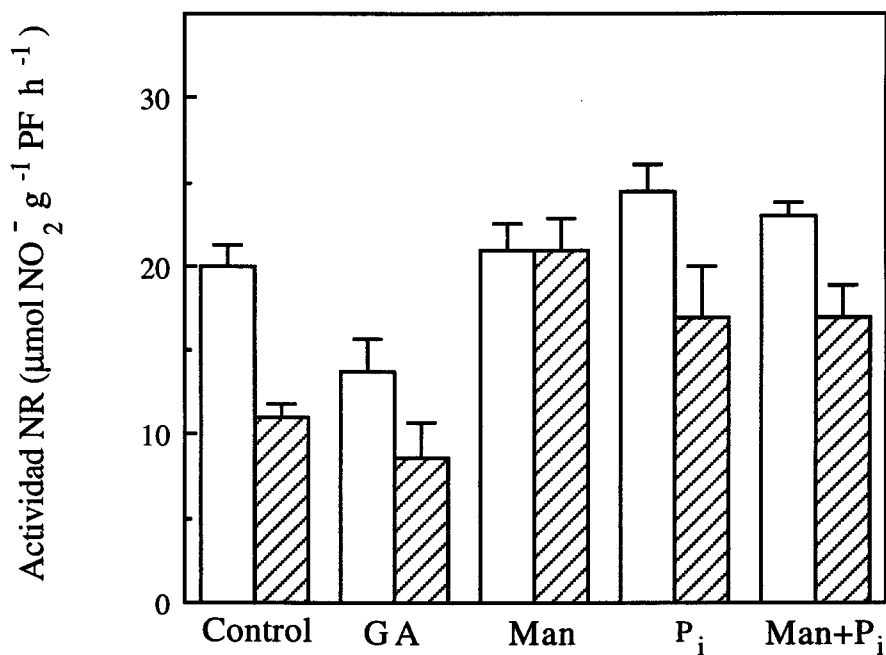
Sin embargo, cuando se suministraba a la hoja manosa 10 mM, también se producía una inhibición de la fijación de CO₂ de alrededor de un 35% (*Tab. 4*)

Tabla 4. Efecto del suministro de glicolaldehído, manosa y/o P_i sobre la fijación de CO_2 en hojas de cebada

Tratamiento	Fijación CO_2 (% del control)
Control, agua	100
Glicolaldehído, 50 mM	14±5
Manosa, 10 mM	65±2
P_i , 10 mM	99±5
Manosa, 10 mM + P_i , 10 mM	95±2

Se utilizaron plantas de cebada iluminadas durante 2 h en condiciones de cultivo. Las hojas cortadas, con su base sumergida en agua destilada o en las soluciones correspondientes, se dispusieron en una cámara de transpiración (M. y M. apartado 2.2). Después de 30 min en iluminación, las hojas se transfirieron a la cámara del IRGA en aire y a $350 \mu\text{mol}$ de fotones $\cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (M. y M. apartado 2.4.1) para la determinación de la fijación de CO_2 in vivo. Se presenta la media±SE de, al menos, tres experimentos independientes. El 100% corresponde a $9,1 \pm 0,2 \mu\text{mol } CO_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Fig. 11 *Efecto del suministro de glicolaldehído, manosa, y/o P_i sobre la actividad NR extraíble de hojas de cebada*



Se utilizaron plantas de cebada iluminadas durante 2 h en condiciones de cultivo. Las hojas cortadas, con su base sumergida en agua destilada o en las soluciones correspondientes, glicolaldehído 50 mM, manosa 10 mM y/o P_i 10 mM, se dispusieron en una cámara de transpiración (M. y M. apartado 2.2). Después de 30 min en iluminación (\square) y, en su caso, de 30 min en oscuridad (▨) se congelaron rápidamente en N_2 líquido. La actividad NR se extrajo y ensayó en medio estándar (M. y M. apartado 2.3). Se presenta la media \pm SE de la v_i (0-2 min de ensayo) de, al menos, tres experimentos independientes.

pero, en este caso, no sólo no se producía inhibición de la actividad NR de hojas en iluminación sino que se prevenía completamente su inactivación por oscuridad (*Fig. 11*). Este efecto protector de la manosa se ha descrito previamente en la NR de hojas de espinaca (Kaiser y Spill, 1991) y se ha interpretado como una consecuencia de la disminución de la concentración de P_i en el citoplasma y, por tanto, de los niveles de ATP, que limitarían la fosforilación (inactivación) de la NR. Si esto fuera así, el suministro de P_i , solo o simultáneamente con manosa, debería producir la inactivación de la NR tanto en luz como en oscuridad. Los datos de la *Fig. 11* muestran que este no es el caso. El suministro de P_i , o de manosa más P_i , producía también un incremento significativo ($p < 0,05$) en la actividad NR extraíble de hojas en iluminación y una protección del enzima contra la inactivación por oscuridad ($p < 0,02$). Es oportuno señalar que, el suministro de P_i junto con la manosa previene la inhibición ejercida por el suministro de manosa sobre la fijación de CO_2 (*Tab. 4*; Walker y Osmond, 1986).

El efecto positivo que sobre la actividad NR de hojas en luz y en oscuridad tiene el suministro de P_i descarta la posibilidad de que el efecto protector de la manosa frente a la inactivación en oscuridad de la NR pueda deberse a su capacidad de secuestrar P_i . Interpretamos que la protección por manosa contra la inactivación de la NR en oscuridad se produce como consecuencia de la acumulación en el citoplasma de manosa 6-fosfato, un análogo estructural de la glucosa 6-fosfato. Esto sugiere que la acumulación de una hexosa 6-fosfato es condición suficiente para prevenir la inactivación de la NR por oscuridad o por inhibición de la fijación de CO_2 .

3.1.3. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la actividad NR de hojas de cebada

En este apartado se ha planteado estudiar el efecto del aporte de nitrógeno sobre la actividad NR de la hoja en dos situaciones experimentales: a) suministrándolo a hojas de plantas cultivadas con nitrato a través de la corriente de transpiración, y b) cultivando las plantas con distintas fuentes de nitrógeno: nitrato, amonio, o nitrato y amonio en distintas proporciones.

El suministro de nitrato o amonio (a concentraciones de entre 2 y 10 mM durante 20 a 60 min) a hojas de cebada, vía corriente de transpiración, no producía cambios significativos ($p > 0,2$) en la actividad NR extraíble de las mismas respecto a la de hojas control a las que se le suministraba agua (*Tab. 5*). Si tras el tratamiento anterior, realizado en condiciones limitantes para la fijación de CO₂ (aire y 350 μmol de fotones $\cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), las hojas se incubaban durante otros 10 min en condiciones de fotosíntesis máxima (luz y CO₂ saturantes), la actividad NR extraída de las hojas era significativamente más alta ($p < 0,03$) que la obtenida tras el primer tratamiento, pero el incremento en actividad era el mismo en las hojas control y en las suministradas con nitrato o con amonio (*Tab. 5*). Estos resultados indican que la actividad NR no es sensible a un aumento de las concentraciones de nitrato o amonio en la hoja, y adicionalmente, son consistentes con la hipótesis inicial de que el sistema de activación del enzima responde fundamentalmente a las condiciones que favorecen la fijación de CO₂ in vivo.

Como se ha indicado en el Apartado 1.1 (Introducción), en plantas herbáceas como la cebada, el sitio fundamental de asimilación de nitrato hasta aminoácidos es la hoja, a donde este anión llega desde la raíz, vía xilema. Cuando la única fuente de nitrógeno disponible es el nitrato, la hoja exporta a los tejidos no fotosintéticos los aminoácidos sintetizados, vía floema. Cuando la fuente de nitrógeno disponible es el amonio, la situación fisiológica cambia, puesto que este

Tabla 5. Actividad NR extraíble de hojas de cebada en distintas condiciones de fotosíntesis tras el suministro de nitrato o amonio

Tratamiento	Actividad NR ($\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$)	
	CO ₂ y luz limitantes	CO ₂ y luz saturantes
Control, agua	20,5±1	26,4±2,6
Nitrato	20,0±0,6	25,6±1,4
Amonio	21,0±1,1	28,9±2,6

Se utilizaron plantas de cebada iluminadas durante 2 h en condiciones de cultivo. Las hojas cortadas, con su base sumergida en agua destilada, 2 mM KNO₃ ó 2 mM NH₄Cl se dispusieron en una cámara de transpiración (M. y M. apartado 2.2) en aire y 350 μmol de fotones $\cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (CO₂ y luz limitantes) durante 30 min. Parte las hojas se congelaron en N₂ líquido y el resto se incubaron 10 min en aire con 5% de CO₂ a 1500 μmol de fotones $\cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (CO₂ y luz saturantes). La actividad NR se extrajo y ensayó en medio estándar (M. y M. apartado 2.3). Se representa la media±SE de la v_i (0-2 min de ensayo) de, al menos, tres experimentos independientes.

ion es asimilado hasta aminoácidos en la misma raíz, no existiendo translocación de amonio a la hoja (Lewis et al., 1986). En estas condiciones, la raíz requiere un aporte extra de esqueletos carbonados desde la hoja para la biosíntesis de aminoácidos, que serán luego exportados al resto de la planta. Cuando en el medio de cultivo coexisten el nitrato y el amonio es posible alterar la relación fuente-sumidero de las hojas variando la proporción de nitrato y amonio suministrados a la planta en el medio de cultivo. De este modo, se modifica la proporción de fotosintato utilizado en la hoja respecto del exportado a la raíz para suministrar los esqueletos carbonados necesarios para incorporar el nitrógeno amínico en uno u otro órgano.

La *Tab. 6* muestra que la actividad NR final (v_f , que refleja la cantidad de enzima) extraída de hojas en iluminación era muy similar ($p > 0,05$) en plantas cultivadas con nitrato (a concentraciones de 15 ó 8,7 mM) y en plantas cultivadas con medios conteniendo amonio 8 mM y concentraciones decrecientes de nitrato (3, 1,5 y 0,7 mM). Esto indica que la utilización de amonio como fuente de nitrógeno no tiene efectos negativos sobre la expresión de la NR en la hoja, y que concentraciones de nitrato tan bajas como 0,7 mM en un medio basado en amonio son suficientes para inducir la expresión del enzima foliar en niveles similares a los expresados en otros medios con nitrato como única fuente de nitrógeno. Examinando las respectivas actividades NR iniciales (v_i), que reflejan el estado de activación de la NR, en extractos de hojas en condiciones de iluminación (*Tab. 6*), se observa que éstas eran similares en hojas de plantas cultivadas con nitrato como única fuente de nitrógeno y en hojas de plantas cultivadas con amonio y concentraciones decrecientes de nitrato hasta 1,5 mM. Sin embargo, en hojas de plantas cultivadas con amonio y 0,7 mM de nitrato, la actividad NR inicial era significativamente menor ($p < 0,005$) para una misma actividad final. Estos datos indican que el estado de activación de la NR de la hoja en condiciones de iluminación no cambia aunque se varíe la proporción de nitrógeno suministrado

Tabla 6. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la actividad NR extraíble de hojas de cebada en luz y oscuridad

Fuente de N		Actividad NR ($\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$)			
Nitrato (mM)	Amonio (mM)	v_i		v_f	
		Luz	Oscuridad	Luz	Oscuridad
15,0	0	20±0,5	9±0,5	24±0,3	19±0,9
8,7	0	19±1,1	8±0,3	22±0,5	18±0,7
3,0	8,0	20±0,5	8±0,6	25±0,2	19±0,8
1,5	8,0	17±0,8	7±0,7	23±0,3	19±0,9
0,7	8,0	7±1,0	4±0,4	19±1,4	16±0,5

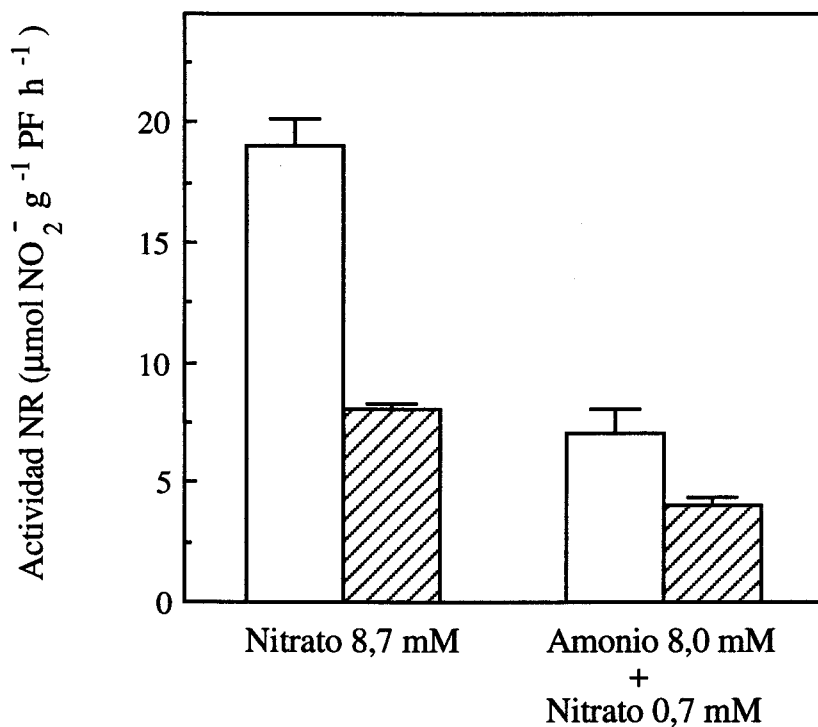
Hojas de cebada cultivada con distintas proporciones de nitrato y amonio como fuente de nitrógeno (M. y M. apartado 2.1.2.2), se sometieron a 2 h de iluminación en condiciones de cultivo, seguidas, en su caso, de 30 min de oscuridad. Tras el tratamiento, las hojas se congelaron en N₂ líquido. La actividad NR se extrajo y ensayó en medio estándar (M. y M. apartado 2.3). Se presenta la media±SE de la actividad NR inicial (0-2 min de ensayo, v_i) y final (6-10 min de ensayo, v_f) de, al menos, cuatro experimentos independientes.

como amonio desde el 0 hasta el 84% del nitrógeno total. Pero si la concentración de amonio suministrado es superior al 90% del nitrógeno total se aprecia un descenso significativo en el estado de activación de la NR, resultando el valor de v_i en estas condiciones inferior al 50% del observado en las hojas de plantas cultivadas en cualquiera de los otros medios de cultivo (*Tab. 6*). Estos datos sugieren que, a partir de un cierto valor umbral, la asimilación predominante de amonio en la raíz produce un déficit en los niveles de carbohidratos de la hoja que redundan en una inactivación reversible de la NR aún en condiciones de iluminación.

Además, cuando, tras 2 h de iluminación en condiciones de cultivo, las plantas cultivadas con distintas fuentes de nitrógeno se sometían a un período de 30 min de oscuridad se observaba que, para v_f similares a las determinadas en iluminación, los valores de v_i eran significativamente más bajos ($p < 0,05$), como corresponde a la manifestación de la inactivación inducida por oscuridad (*Tab. 6*). En estas condiciones, la v_i de la NR extraída de hojas de plantas cultivadas en medios con amonio conteniendo sólo 0,7 mM nitrato era también significativamente inferior ($p < 0,05$) (aproximadamente la mitad) a la determinada en hojas de plantas cultivadas en los demás medios de cultivo. Esto indica que la NR en estas condiciones puede alcanzar mayores niveles de inactivación por oscuridad y que el sistema tiene aún capacidad de respuesta a los cambios metabólicos que experimenta la planta en la transición luz-oscuridad.

Esto se ilustra más claramente en la *Fig. 12* en la que se comparan las actividades NR (v_i) extraídas en luz y oscuridad de hojas de plantas cultivadas con nitrato 8,7 mM como única fuente de nitrógeno y con nitrato 0,7 mM más amonio 8 mM (nótese en la *Tab. 6* que las actividades NR finales son similares en los dos casos). En las hojas de plantas cultivadas con 8,0 mM amonio y 0,7 mM nitrato, la actividad NR en iluminación fue prácticamente idéntica a la determinada en oscuridad en hojas de plantas cultivadas con 8,7 mM nitrato. Estos datos son

Fig. 12 *Actividad NR extraíble de hojas de cebada cultivadas con nitrato o con amonio + nitrato como fuente de nitrógeno*



Se representa la actividad NR inicial (\square luz, \square osc; media \pm SE) de las dos situaciones correspondientes en la Tab. 4.

nuevamente consistentes con nuestra hipótesis de trabajo: los niveles de productos de la asimilación de CO₂, que actuarían de efectores positivos de la actividad NR, serían similarmente bajos en ambas situaciones: en las hojas de plantas cultivadas con nitrato, como consecuencia del período de oscuridad; en las hojas iluminadas de plantas cultivadas fundamentalmente con amonio, como resultado de la translocación de carbohidratos a la raíz para aportar los esqueletos carbonados requeridos en la asimilación de amonio. En las hojas de plantas cultivadas fundamentalmente con amonio, el sometimiento a un período de oscuridad disminuye aún más el estado de activación de la NR, indicando la sensibilidad del sistema a una disminución suplementaria en los niveles de carbohidratos de la hoja.

3.2. MODULACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD NR FOLIAR

En este capítulo se ha estudiado comparativamente la sensibilidad in vitro de la NR extraída de hojas de cebada y espinaca en iluminación y oscuridad a distintos posibles efectores.

Por una parte, los estudios in vivo descritos en el capítulo anterior muestran que en cebada, la NR se inactiva rápida y reversiblemente al someter a las hojas a transiciones luz-oscuridad o al transferirlas a atmósferas carentes de CO₂. Esta inactivación in vivo del enzima de hojas de cebada se manifiesta tanto en presencia como en ausencia de cationes divalentes en los medios de extracción y ensayo e incluso en presencia de agentes quelantes. Por el contrario, la inactivación por oscuridad o ausencia de CO₂ de la NR de hojas de espinaca sólo se observa cuando se ensaya en presencia de concentraciones milimolares de Ca²⁺ o Mg²⁺, por lo que se ha propuesto que la NR, fosforilada in vivo en la oscuridad, se haría sensible a la inhibición por cationes divalentes, especialmente Mg²⁺, de ahí que esta inhibición no se manifieste en presencia de agentes quelantes como EDTA y/o P_i (Kaiser y Spill, 1991; Huber et al., 1992). Esta diferencia de comportamiento entre la NR de hojas de espinaca y la de cebada sugiere una distinta sensibilidad del enzima de estos orígenes a la inhibición por Mg²⁺, que podría implicar diferencias en el mecanismo de control.

Por otra parte, nuestros estudios in vivo con hojas de cebada en distintas condiciones de iluminación y disponibilidad de CO₂ descritos en el capítulo anterior permiten proponer que determinados productos de la asimilación de CO₂ actúan como factores reguladores positivos de la actividad NR y están implicados tanto en la fotomodulación del enzima como en la dependencia de éste por la disponibilidad de CO₂.

También, como se ha indicado en la Introducción, la NR de hojas de espinaca se inactiva *in vitro* tras incubación de los extractos crudos con ATP y se ha propuesto que este efecto se debe a fosforilación *in vitro* del enzima (Kaiser y Spill, 1991; Kaiser et al., 1992; Huber et al., 1992).

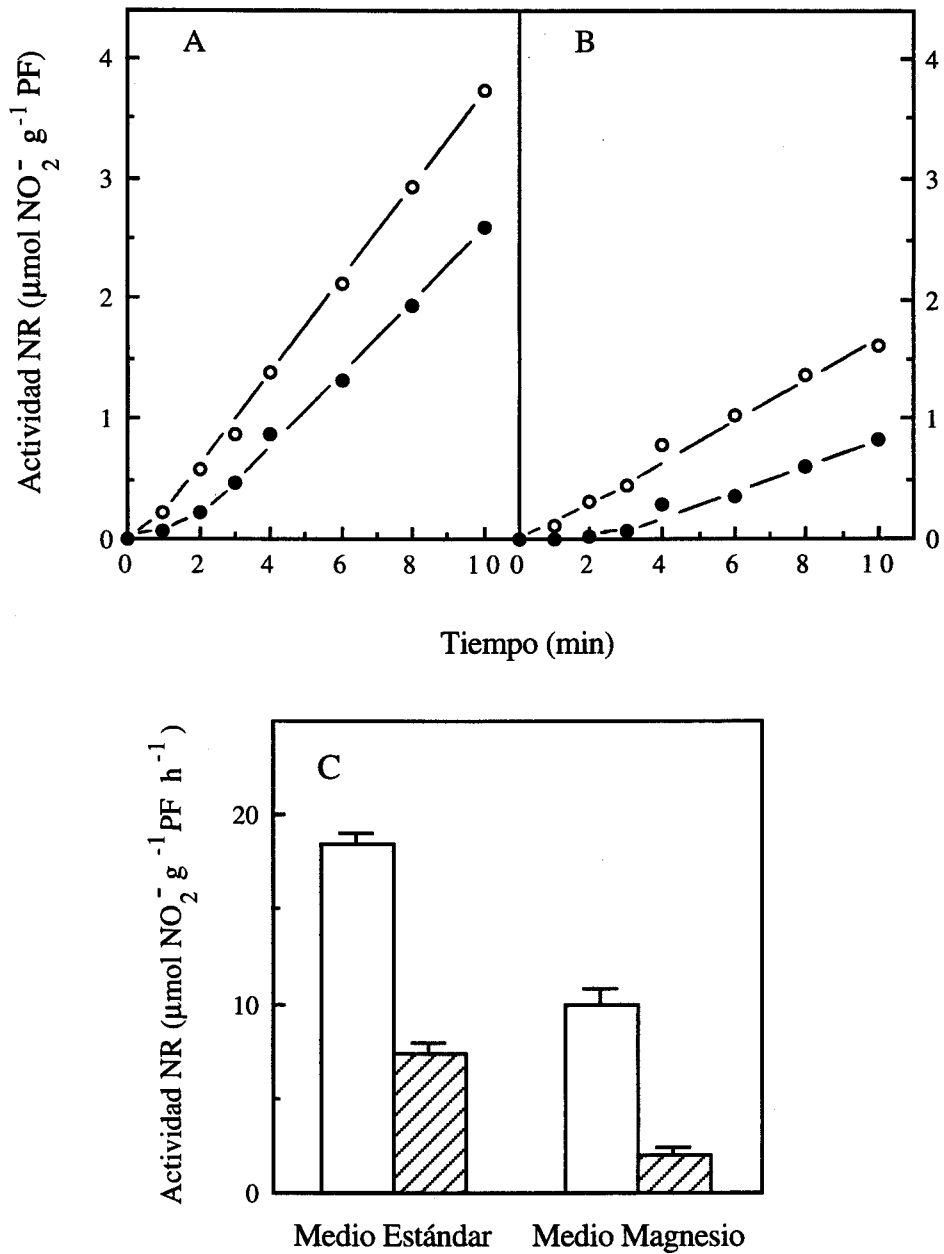
Por todo ello, se han estudiado comparativamente los efectos *in vitro* de Mg^{2+} , P_i , hexosas, hexosas-fosfato, triosas-fosfato y ATP sobre la NR foliar de ambas especies, cebada y espinaca.

3.2.1. Sensibilidad a Mg^{2+} de la NR extraída de hojas de cebada y espinaca

La *Fig. 13* muestra la actividad NR de hojas de cebada extraída y ensayada en medio estándar (conteniendo EDTA y P_i ; *Fig. 13A*) o en medio magnesio (*Fig. 13B*). Es evidente que el enzima extraído de hojas en iluminación o en oscuridad resultaba inhibido *in vitro* por Mg^{2+} , y que la inactivación *in vivo* por oscuridad se observa en ambos medios. Así, en medio estándar se observa un 60% de inactivación por oscuridad (*Fig. 13A, C*). En medio magnesio, las actividades NR en luz y en oscuridad resultaron muy inferiores a las determinadas en medio estándar, y la inactivación por oscuridad fue del 80% (*Fig. 13B, C*). Por tanto, en la NR de hojas de cebada, podemos distinguir dos inhibiciones aditivas: una inactivación por oscuridad *in vivo*, independiente de Mg^{2+} , y una inhibición *in vitro* por Mg^{2+} que se superpone a la anterior.

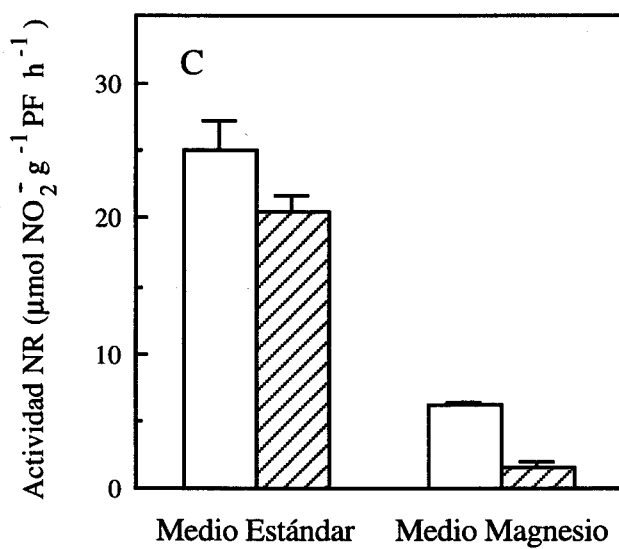
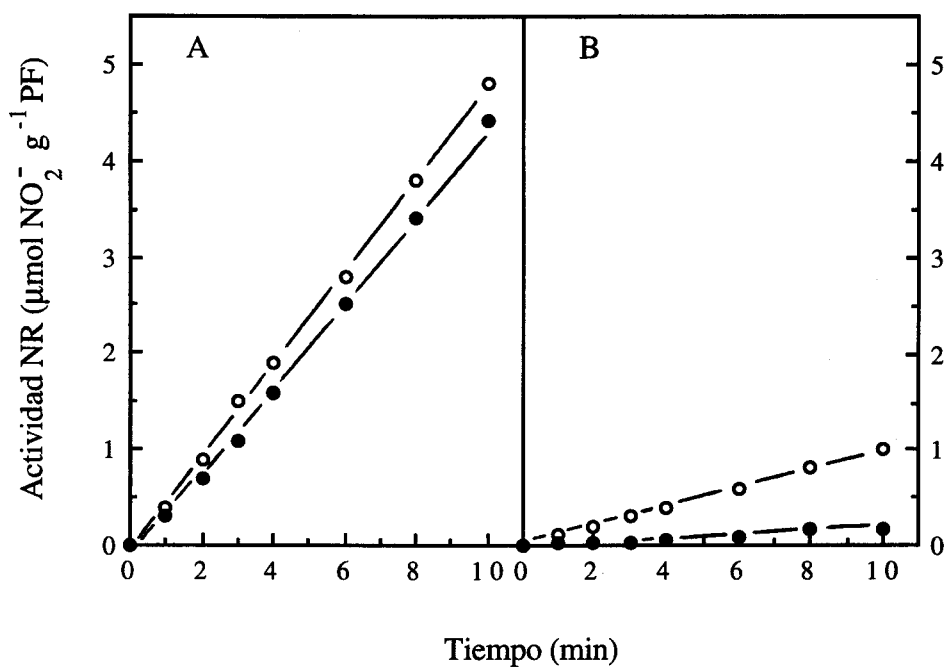
En cambio, en hojas de espinaca, la actividad NR extraída y ensayada en medio estándar era similar en luz y en oscuridad, observándose alrededor de un 20% de inactivación (*Fig. 14A, C*). En consonancia con el comportamiento descrito por otros autores (Kaiser y Spill, 1991; Kaiser et al., 1992; Huber et al., 1992), la inactivación por oscuridad sólo se manifiesta inequívocamente en el

Fig. 13 *Sensibilidad a Mg^{2+} de la actividad NR extraída de hojas de cebada en luz y en oscuridad*



Se utilizaron extractos crudos, preparados y ensayados en medio estándar (A) o en medio magnesio (B) (M. y M. apartado 2.3), de hojas iluminadas 2 h en condiciones de cultivo (○, □) y posteriormente sometidas a 30 min de oscuridad (●, ▨). A y B, datos de un experimento representativo; C, media \pm SE de v_i (0-2 min de ensayo) de, al menos, tres experimentos independientes.

Fig. 14 *Sensibilidad a Mg^{2+} de la actividad NR extraída de hojas de espinaca en luz y en oscuridad*



Condiciones como en la Fig. 13.

enzima extraído y ensayado con medio magnesio, en donde se registra una pérdida de actividad de un 80% en extractos procedentes de hojas en oscuridad (*Fig. 14B, C*). Por tanto, en hojas de espinaca, la inactivación in vivo de la NR por oscuridad es dependiente de Mg^{2+} , en contraposición con la de hojas de cebada que no lo es. Sin embargo, es también evidente que la actividad NR extraída de hojas de espinaca en iluminación u oscuridad es muy sensible a la inhibición por Mg^{2+} in vitro, de hecho es más sensible que la de hojas de cebada.

Estas diferencias se resumen en la *Tabla 7*, en donde se observa que en hojas de cebada la inactivación in vivo de la NR por oscuridad es independiente de Mg^{2+} y más fuerte que en el enzima de espinaca, mientras que el grado de inhibición por Mg^{2+} de la NR de espinaca es significativamente más alto que el de la NR de cebada.

El requerimiento por Mg^{2+} de la NR de espinaca para que se manifieste la inactivación in vivo por oscuridad se ha interpretado en base a que, en condiciones de oscuridad o ausencia de CO_2 , el enzima se encontraría fundamentalmente fosforilado, lo que le confiere la capacidad para formar un complejo con el NIP y el Mg^{2+} que da lugar a una NR inactiva (Bachmann et al., 1995; Mackintosh et al., 1995; Glaab y Kaiser, 1995). En este modelo, el enzima procedente de hojas en iluminación se encontraría fundamentalmente defosforilado y no sería sensible a la inhibición in vitro por Mg^{2+} , al no poder formarse el complejo inactivo NR-fosforilada/ Mg^{2+} /NIP (Kaiser y Spill, 1991; Kaiser et al., 1992; Huber et al., 1992). Sin embargo, en nuestro caso el enzima procedente de hojas de espinaca en iluminación es también sensible a la inhibición in vitro por Mg^{2+} . La discrepancia entre nuestros resultados y los de otros autores (insensibilidad a Mg^{2+} del enzima extraído de hojas de espinaca en iluminación, Kaiser y Spill, 1991; Kaiser et al., 1992; Huber et al., 1992) puede ser debida al protocolo de extracción y ensayo. Así como los medios utilizados son prácticamente idénticos, otros autores extraen el enzima en ausencia de Mg^{2+} y lo

Tabla 7. Inactivación por oscuridad e inhibición in vitro por Mg^{2+} de la NR de hojas de cebada y espinaca

Especies	Actividad NR			
	% Inactivación por oscuridad		% Inhibición in vitro por Mg^{2+}	
	Medio estándar	Medio magnesio	Luz	Oscuridad
Cebada	60	80	46	73
Espinaca	18	75	76	95

Los porcentajes de inactivación por oscuridad e inhibición in vitro por Mg^{2+} se han obtenido a partir de las medias representadas en las Figs. 13C y 14C.

añaden en el momento de ensayo. En nuestro caso, el enzima que ha de ser ensayado en presencia de Mg^{2+} se extrae también en ese medio, con lo que la inhibición por Mg^{2+} es mucho más evidente (datos no mostrados).

3.2.2. Activación in vitro de la NR extraída de hojas de cebada y espinaca por productos de la fijación de CO_2

La *Tabla 8* muestra la activación in vitro de la NR por glucosa 6-fosfato, fructosa 6-fosfato, 6-fosfogluconato, DHAP o P_i , a concentraciones de 5 y 25 mM en extractos desalados procedentes de hojas de cebada en iluminación y oscuridad, obtenidos y ensayados en medio magnesio. Para concentraciones de efectores de 5 mM, añadidos al medio de ensayo a tiempo cero, se observó que la actividad NR de extractos de hojas en iluminación aumentaba significativamente en todos los casos, aunque el grado de activación varió desde alrededor de un 15%, en el caso de la fructosa 6-fosfato, hasta aproximadamente un 50% en el caso de la glucosa 6-fosfato o el P_i . En estas mismas condiciones, la NR de hojas en oscuridad registró una activación más acusada, desde aproximadamente un 50% en presencia de 6-fosfogluconato, fructosa 6-fosfato o DHAP, a un 200% en presencia de P_i , y hasta un 275% en presencia de glucosa 6-fosfato. Utilizando concentraciones de efectores de 25 mM, añadidos también a tiempo cero, se observó una activación de la NR de extractos en iluminación de alrededor de dos veces en todos los casos. En los extractos procedentes de hojas en oscuridad, se observaron activaciones de la NR también más altas que en los de iluminación, de prácticamente tres veces en presencia de 6-fosfogluconato, fructosa 6-fosfato y P_i , de cuatro veces con DHAP y de más de cinco veces con glucosa 6-fosfato (*Tab. 8*).

Así pues, los cinco efectores ensayados in vitro produjeron una activación más marcada de la NR en extractos procedentes de oscuridad que en extractos

Tabla 8. Activación in vitro por hexosas-fosfato, dihidroxiacetona-fosfato y P_i de la NR extraída de hojas de cebada en iluminación y en oscuridad en medio magnesio

Tratamiento		Actividad NR (% del control)	
		Luz	Oscuridad
Control		100	100
Glucosa 6-fosfato	5 mM	146±14	275±8
6-fosfogluconato	"	125±6	157±15
Fructosa 6-fosfato	"	115±8	147±11
Dihidroxiacetona-fosfato	"	126±2	145±17
P_i	"	147±31	201±29
Glucosa 6-fosfato	25 mM	224±10	558±17
6-fosfogluconato	"	173±11	284±59
Fructosa 6-fosfato	"	175±16	290±33
Dihidroxiacetona-fosfato	"	199±18	397±93
P_i	"	189±8	292±16



Se utilizaron plantas de cebada iluminadas durante 2 h en condiciones de cultivo y, en su caso, sometidas a continuación a 30 min de oscuridad. Tras el tratamiento, las hojas se congelaron en N_2 líquido. Los extractos se prepararon y desalaron en medio magnesio (M. y M. apartado 2.3). La actividad NR se determinó en el mismo medio en ausencia o presencia de los metabolitos indicados a concentraciones de 5 y 25 mM, añadidos a tiempo cero. Se presenta la media±SE de la v_i (0-2 min de ensayo) de, al menos, seis experimentos independientes. El 100% de actividad NR corresponde a $6,6\pm 1 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$ en extractos de hojas en iluminación y de $2,3\pm 0,5 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$ en los de hojas en oscuridad.

procedentes de iluminación. Esta activación dependía de la concentración de efector presente en el medio de ensayo, siendo significativamente más alta a concentraciones de 25 mM. Entre los distintos azúcares-fosfato ensayados, la glucosa 6-fosfato era el más efectivo como activador in vitro de la NR en todas las situaciones ensayadas. El P_i también era un activador efectivo del enzima, que produce una activación similar a la de la glucosa 6-fosfato a concentraciones de 5 mM en extractos de hojas en iluminación. Sin embargo, la activación que produce sobre el enzima de extractos de oscuridad es significativamente menor que la producida por la glucosa 6-fosfato, tanto a concentraciones de 5 ó de 25 mM.

Resultados similares a los mostrados en la *Tabla 8* se observaron preincubando los extractos de hojas en iluminación u oscuridad con los distintos efectores 5 min antes del comienzo del ensayo (datos no mostrados). Esto indica que la activación producida sobre la NR es muy rápida, puesto que se manifiesta de forma inmediata a la adición del efector.

La *Tabla 9* muestra la actividad NR en extractos desalados de hojas de cebada en iluminación y en oscuridad preparados, como en el caso anterior, en medio magnesio y ensayados en presencia de glucosa, fructosa y dihidroxiacetona a una concentración de 25 mM. Es evidente que ni las hexosas ni la triosa modificaron significativamente la actividad NR de extractos de hojas en luz o en oscuridad. Por tanto, la presencia de un grupo fosfato en la molécula de azúcar es esencial para producir la activación in vitro de la NR. Los azúcares libres carecen de capacidad para activar el enzima in vitro.

La activación in vitro que producen los azúcares-fosfato o el P_i sobre la NR no se manifestaba cuando la extracción y el ensayo de la actividad NR se realizaban en medio sin magnesio. La *Tabla 10* muestra la actividad NR de extractos desalados procedentes de hojas de cebada en iluminación y oscuridad (obtenidos y ensayados en medio base) en presencia de glucosa, glucosa 6-fosfato

Tabla 9. Efecto in vitro de hexosas y dihidroxiacetona sobre la NR extraída de hojas de cebada en iluminación y en oscuridad en medio magnesio

Tratamiento	Actividad NR (% del control)	
	Luz	Oscuridad
Control	100	100
Glucosa	107±10	99±9
Fructosa	101±3	100±9
Dihidroxiacetona	95±10	102±2

Las condiciones experimentales son idénticas a las descritas en la Tab. 8. Los azúcares indicados se añadieron a concentraciones de 25 mM, a tiempo cero. Se presenta la media±SE de la v_i (0-2 min de ensayo) de, al menos, seis experimentos independientes. El 100% de actividad NR corresponde a $7,2\pm 1 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$ en extractos de hojas en iluminación y de $3,4\pm 0,2 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$ en los de hojas en oscuridad.

Tabla 10. Efecto *in vitro* de hexosas, hexosas-fosfato y P_i sobre la NR extraída de hojas de cebada en iluminación y en oscuridad en ausencia de Mg^{2+}

Tratamiento	Actividad NR (% del control)	
	Luz	Oscuridad
Control	100	100
Glucosa	95±5	102±5
Glucosa 6-fosfato	104±4	108±7
P_i	119±10	117±10

Se utilizaron plantas de cebada iluminadas durante 2 h en condiciones de cultivo y, en su caso, sometidas a continuación a 30 min de oscuridad. Tras el tratamiento, las hojas se congelaron en N_2 líquido. Los extractos se prepararon y desalaron en medio base (M. y M. apartado 2.3). La actividad NR se determinó en el mismo medio en ausencia o presencia de los metabolitos indicados a concentraciones de 5 mM, añadidos a tiempo cero. Se presenta la media±SE de la v_i (0-2 min de ensayo) de, al menos, seis experimentos independientes. El 100% de actividad NR corresponde a $11±1 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$ en extractos de hojas en iluminación y de $6,5±1 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$ en los de hojas en oscuridad.

y P_i . En ningún caso se produjeron modificaciones significativas de la actividad NR de extractos de hojas en luz o en oscuridad. Esto indica que la activación in vitro de la NR por azúcares-fosfato observada en la *Tabla 8* es de hecho una protección frente a la inhibición por Mg^{2+} del enzima.

La *Tabla 11* muestra la activación por glucosa 6-fosfato, fructosa 6-fosfato, DHAP y P_i de la NR de extractos desalados procedentes de hojas de espinaca en iluminación y oscuridad, obtenidos y ensayados en medio magnesio. A concentraciones de efectores de 5 mM, añadidos al medio de ensayo a tiempo cero, se observó un aumento de alrededor de dos veces en la actividad NR de extractos de iluminación, y de entre dos y cuatro veces en los extractos de oscuridad. También en este caso, la activación observada in vitro sobre el enzima extraído de hojas en oscuridad fue significativamente mayor que la observada sobre el extraído de hojas en iluminación. La glucosa 6-fosfato resultó más efectiva que los demás azúcares-fosfato ensayados, y similar en su capacidad de activación al P_i (*Tab. 11*). Es interesante señalar que, en estas condiciones, la NR de espinaca es más sensible que la de cebada a la activación in vitro para concentraciones de efectores de 5 mM.

Al igual que se observaba con la NR de hojas de cebada, la adición de glucosa, fructosa o dihidroxiacetona a extractos de hojas de espinaca no produjo cambios significativos sobre la actividad NR (datos no mostrados), confirmando que es necesario el grupo fosfato para producir la activación in vitro de la NR. Paralelamente, esta activación in vitro ejercida por las hexosas-fosfato, triosas-fosfato y P_i sobre la NR de hojas de espinaca, tampoco se manifestaba cuando la extracción y el ensayo se realizaban en medio sin magnesio (datos no mostrados), indicando que al igual que en cebada, los azúcares-fosfato y el fosfato protegen al enzima frente a la inhibición por Mg^{2+} .

Tabla 11. Activación in vitro por hexosas-fosfato, dihidroxiacetona-fosfato y P_i de la NR extraída de hojas de espinaca en iluminación y en oscuridad en medio magnesio

Tratamiento	Actividad NR (% del control)	
	Luz	Oscuridad
Control	100	100
Glucosa 6-fosfato	184±28	428±92
Fructosa 6-fosfato	172±12	235±16
Dihidroxiacetona-fosfato	177±21	274±35
P_i	244±39	423±39

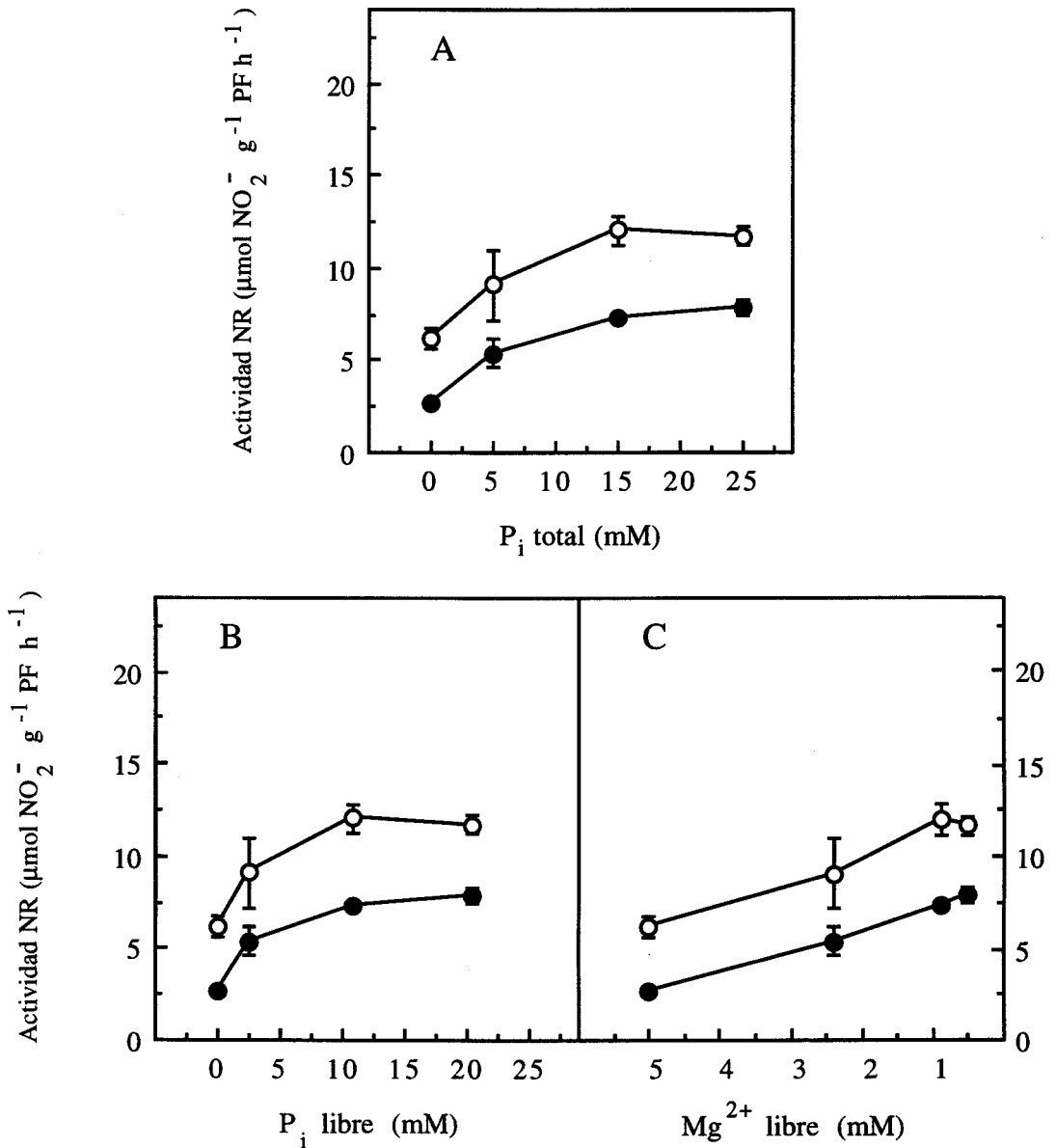
Se utilizaron plantas de espinaca iluminadas durante 2 h en condiciones de cultivo, y en su caso, sometidas a continuación a 30 min de oscuridad. Tras el tratamiento, las hojas se congelaron en N_2 líquido. Los extractos se prepararon y desalaron en medio magnesio (M. y M. apartado 2.3). La actividad NR se determinó en el mismo medio en ausencia o presencia de los metabolitos indicados a concentraciones de 5 mM, añadidos a tiempo cero. Se presenta la media±SE de la v_i (0-2 min de ensayo) de, al menos, seis experimentos independientes. El 100% de actividad NR corresponde a $4,7\pm0,3 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$ para extractos de hojas en iluminación y de $0,9\pm0,1 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$ para los de hojas en oscuridad.

Es evidente que un posible mecanismo de protección por glucosa 6-fosfato o P_i de la inhibición por magnesio de la NR sería la quelación por el grupo fosfato de los iones Mg^{2+} , disminuyendo su concentración efectiva en el medio de ensayo. Resulta por ello necesario analizar esta posibilidad en nuestras condiciones de ensayo, en función de las concentraciones de efectores, calculando las concentraciones de Mg^{2+} libre en cada caso a partir de las constantes de estabilidad de los complejos $[Mg\text{-glucosa 6-fosfato}]$ y $[Mg\text{-}P_i]$ (*Tab. 2*).

La *Fig. 15* muestra las curvas de activación por P_i de la NR de hojas de cebada en iluminación y oscuridad, extraída y desalada en medio magnesio. Para concentraciones de P_i total superiores a 15 mM, se alcanzaba la máxima activación de la NR en ambos extractos (*Fig. 15A*), que resultaba de dos veces la actividad control en extractos de hojas en iluminación y de tres veces en los de oscuridad. Representando la actividad NR en función de la concentración de P_i libre (*Fig. 15B*), se observó un patrón de activación similar al de la *Fig. 15A*, apareciendo la activación máxima a concentraciones de P_i libre superiores a 10 mM. Cuando los datos se representaron en función de la concentración de Mg^{2+} libre (*Fig. 15C*), puede observarse que las máximas activaciones de la NR por P_i corresponden a concentraciones de Mg^{2+} libre entre 1 y 0,5 mM. Por tanto, en este caso, la protección por P_i de la inhibición por Mg^{2+} podría deberse, total o parcialmente, al efecto quelante sobre el Mg^{2+} .

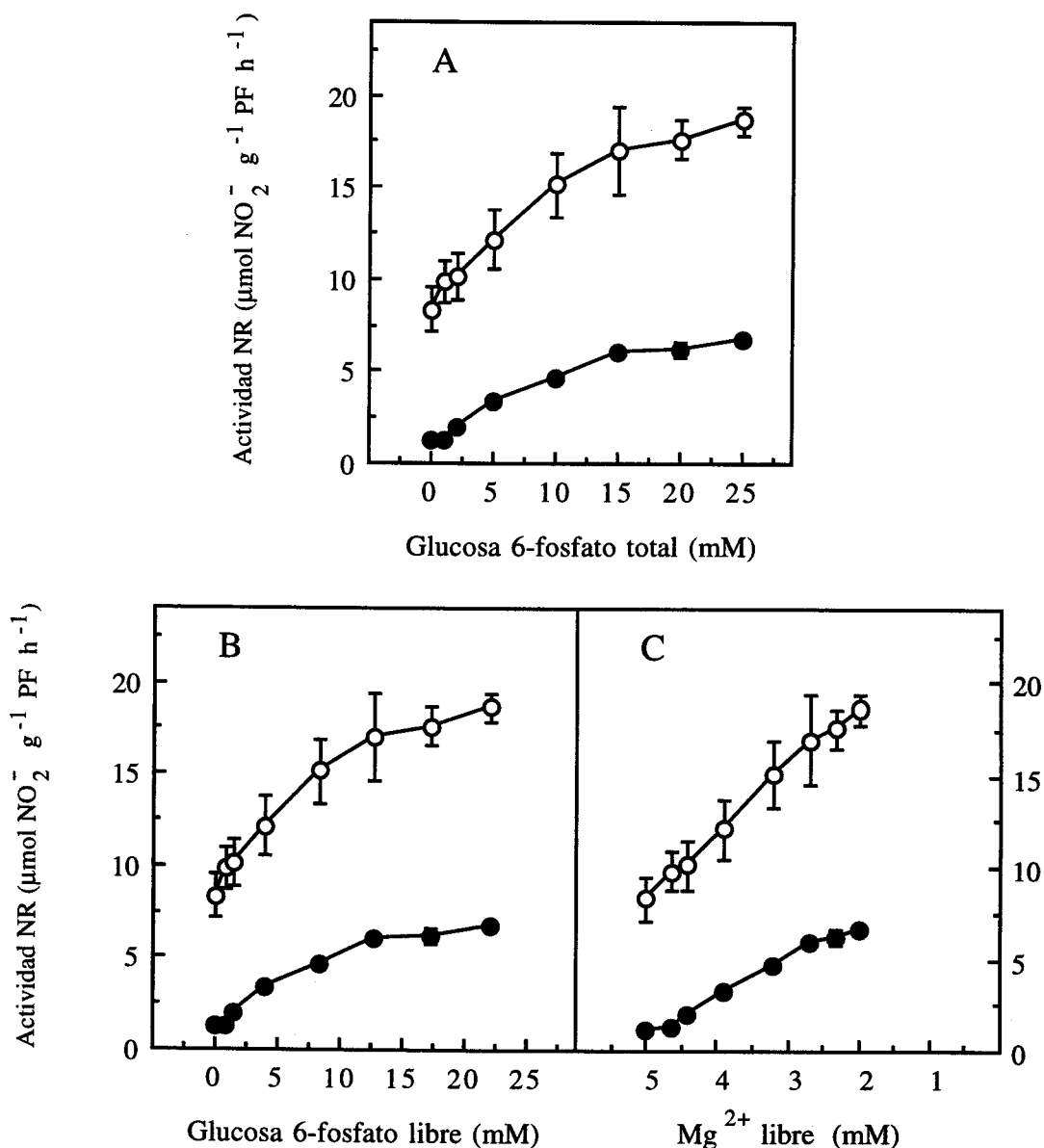
La *Fig. 16* muestra las curvas de activación por glucosa 6-fosfato de la NR de hojas de cebada en iluminación y oscuridad, extraída y desalada en medio magnesio. Representando la actividad NR en función de la concentración total de glucosa 6-fosfato, se observó una activación hiperbólica de la NR, que alcanzaba en extractos de hojas en iluminación actividades máximas de más del doble de la control a concentraciones de efector superiores a 15 mM, con activación semimáxima a aproximadamente 7,5 mM. En extractos de hojas en oscuridad se

Fig. 15 *Protección in vitro por P_i de la inhibición por Mg^{2+} de la NR extraída de hojas de cebada en iluminación y oscuridad en medio magnesio*



Las condiciones experimentales son idénticas a las descritas en la Tab. 8. (○) corresponde a la actividad NR de extractos de hojas en iluminación y (●) en oscuridad. Se presenta la media \pm SE de la v_i (0-2 min de ensayo) de, al menos, tres experimentos independientes. Las concentraciones de efectores libres se calcularon como se indica en el apdo. 2.3.3 de M. y M.

Fig. 16 *Activación in vitro por glucosa 6-fosfato de la NR extraída de hojas de cebada en iluminación y en oscuridad en medio magnesio*



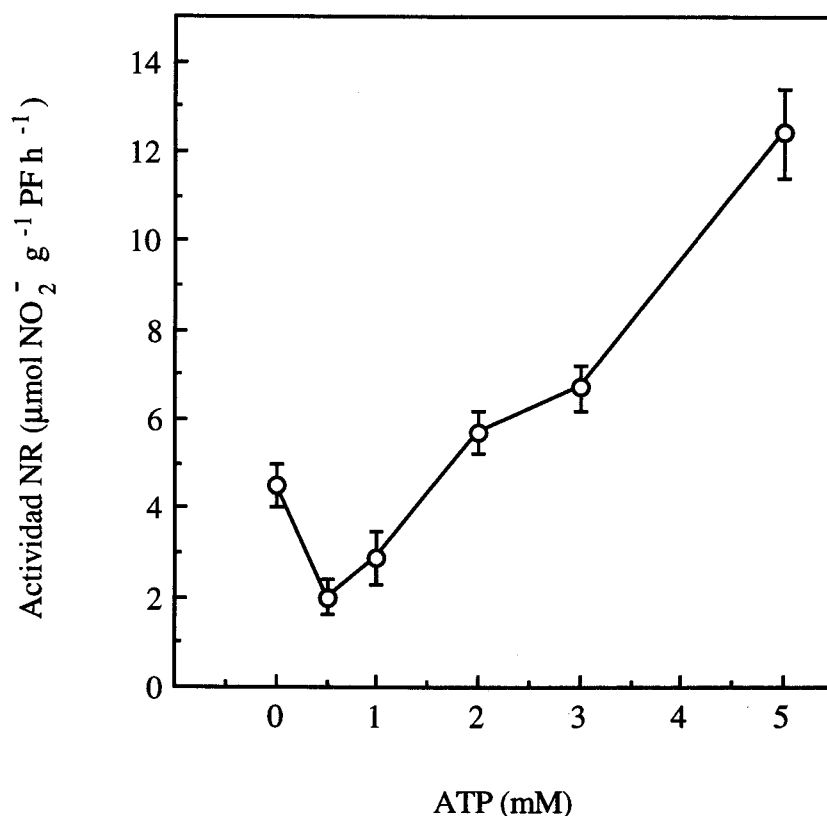
Las condiciones experimentales son idénticas a las descritas en la Tab. 8. (○) corresponde a la actividad NR de extractos de hojas en iluminación y (●) en oscuridad. Se presenta la media \pm SE de la v_i (0-2 min de ensayo) de, al menos, tres experimentos independientes. Las concentraciones de efectores libres se calcularon como se indica en el apdo. 2.3.3 de M. y M.

produjeron activaciones máximas de la NR del orden de cinco veces de la actividad control a concentraciones de glucosa 6-fosfato superiores a 15 mM, observándose también activación semimáxima a concentraciones de efector de 7,5 mM (*Fig. 16A*). Cuando los datos se representaban en función de la concentración de glucosa 6-fosfato libre (*Fig. 16B*), se observa una curva de activación muy similar a la anterior, con activaciones semimáximas a aproximadamente 6 mM en ambos extractos. Representando la activación de la NR por glucosa 6-fosfato en función de la concentración de Mg^{2+} libre (*Fig. 16C*), se observa que las activaciones máximas se corresponden con concentraciones de Mg^{2+} libre de 2 mM. Si el efecto positivo in vitro de la glucosa 6-fosfato se debiera a su efecto quelante sobre los iones Mg^{2+} , cabría esperar resultados similares a los descritos para el P_i (*Fig. 15C*). Evidentemente, este no es el caso. La disminución de la concentración de Mg^{2+} libre de 5 a 2 mM en presencia de P_i sólo producía un 40% de activación sobre la NR de extractos en iluminación y de un 85% en los de oscuridad (*Fig, 15C*). En cambio, una disminución similar de la concentración de Mg^{2+} libre en presencia de glucosa 6-fosfato se corresponde con activaciones de la NR de un 200% y 500% en los extractos de iluminación y oscuridad, respectivamente (*Fig. 16C*). Estos datos indican que la protección que ejerce la glucosa 6-fosfato contra la inhibición in vitro por Mg^{2+} de la NR no se debe a su acción quelante de los iones Mg^{2+} , y apuntan a una interacción directa de la glucosa 6-fosfato con el propio enzima, que disminuiría la sensibilidad de la NR a la inhibición por Mg^{2+} .

3.2.3. Efectos in vitro del ATP sobre la NR de hojas de cebada y espinaca

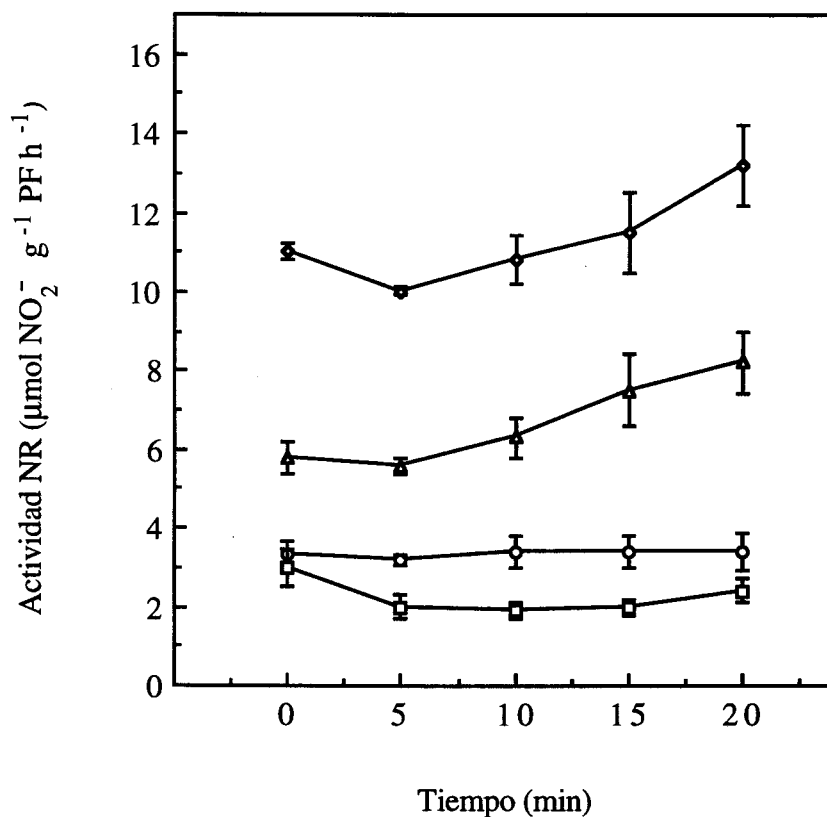
La inactivación in vitro por ATP de la NR de hojas de espinaca ha sido una de las evidencias que sustentan la implicación de un mecanismo de fosforilación

Fig. 17 *Efecto in vitro del ATP sobre la actividad NR de hojas de espinaca en iluminación*



Las plantas se iluminaron durante 2 h en condiciones de cultivo e inmediatamente se congelaron las hojas en N_2 líquido. Los extractos se prepararon y desalaron en medio magnesio (M. y M. apartado 2.3) y se incubaron durante 10 min a 25°C en agitación continua con las concentraciones de ATP indicadas. A continuación, se determinó la actividad NR en medio magnesio. Se presenta la media \pm SE de la v_i (0-2 min de ensayo) de, al menos, cuatro experimentos independientes.

Fig. 18 *Efecto in vitro del ATP sobre la actividad NR de hojas de espinaca en iluminación en función del tiempo de incubación*

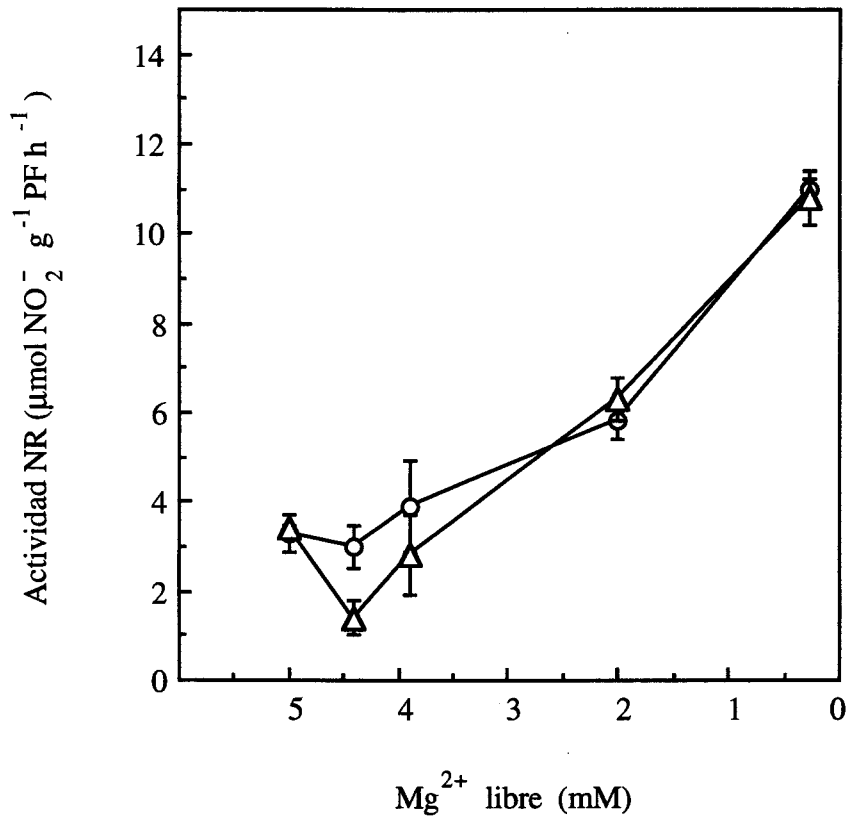


Las plantas se iluminaron durante 2 h en condiciones de cultivo e inmediatamente se congelaron las hojas en N₂ líquido. Los extractos se prepararon y desalaron en medio magnesio (M. y M. apartado 2.3) y se incubaron hasta 20 min a 25° C con agitación continua en ausencia (○) o en presencia de 0,5 (□), 3 (△) y 5 (◆) mM ATP. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para la determinación de la actividad NR en medio magnesio. Se presenta la media±SE de la v_i (0-2 min de ensayo) de, al menos, cuatro experimentos independientes.

El ATP tiene gran capacidad para formar un complejo con Mg^{2+} (Tab. 2; Morrison, 1979), de forma que prácticamente todo el ATP presente en el medio de ensayo se encuentra formando parte del complejo [Mg-ATP]. Si se representa el efecto del ATP sobre la actividad NR en función de la concentración de Mg^{2+} libre en el medio de ensayo (Fig. 19), se observa que, en los extractos sin preincubación, en donde no se manifiesta inhibición por ATP, la activación de la NR observada a concentraciones de ATP de 3 y 5 mM corresponde a concentraciones de Mg^{2+} libre iguales o inferiores a 2 mM, alcanzándose la máxima activación por ATP a concentraciones de Mg^{2+} libre de 0,2 mM. Sin embargo, en los extractos preincubados 10 min con ATP, puede observarse que la inactivación por 0,5 mM ATP se corresponde con concentraciones de Mg^{2+} libre de 4,5 mM, mientras que a concentraciones de ATP de 3-5 mM se manifiesta la activación de la NR en las mismas proporciones que en los extractos sin preincubar (Fig. 19). Los datos sugieren que la inhibición de la actividad NR por ATP a concentraciones de 0,5 mM podría ser debida, como proponen otros autores (Kaiser y Spill, 1991; Huber et al., 1992; Mackintosh, 1992), a fosforilación in vitro por proteínas kinasas presentes en el extracto que utilizan como sustrato al complejo [Mg-ATP], y requiere una preincubación para manifestarse, mientras que la activación de la NR en presencia de altas concentraciones de ATP, de la que no hay constancia en la literatura, sería un reflejo de la disminución de la concentración efectiva de Mg^{2+} libre en el medio de incubación y ensayo, creándose una situación similar al ensayo de la actividad NR de hojas de espinaca inactivada in vivo por oscuridad en presencia de agentes quelantes, donde no se manifiesta su inactivación, y los valores de actividad NR son siempre altos, independientemente del estado de fosforilación del enzima (Kaiser y Huber, 1994a).

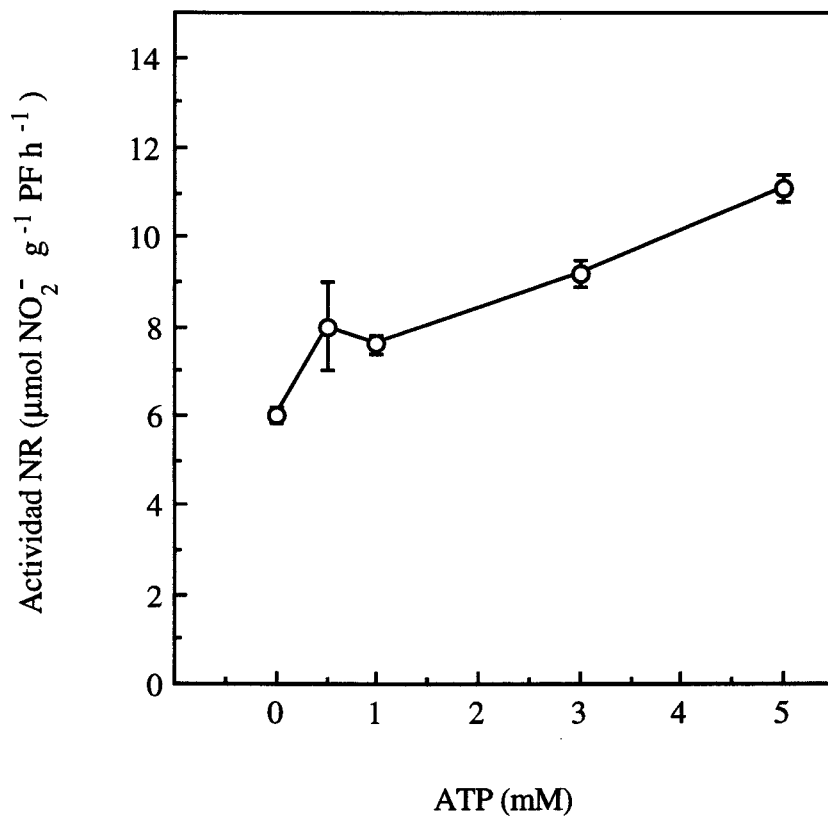
Cuando se ensayó el efecto del ATP sobre la NR de hojas de cebada se obtuvieron resultados diferentes. La Fig. 20 muestra la variación de la actividad

Fig. 19 *Efecto in vitro del ATP sobre la actividad NR de hojas de espinaca en iluminación en función de la concentración de Mg^{2+} libre*

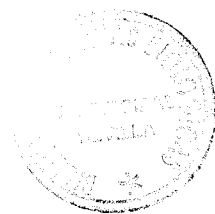


Se representan los datos correspondientes a tiempo cero (○) y 10 min (Δ) de preincubación de la Fig. 18. Las concentraciones de efectores libres se calcularon como se indica en el apartado 2.3.3 de M. y M.

Fig. 20 *Activación in vitro por ATP de la NR de hojas de cebada en iluminación*



Las plantas se iluminaron durante 2 h en condiciones de cultivo e inmediatamente se congelaron las hojas en N_2 líquido. Los extractos se prepararon y desalaron en medio magnesio (M. y M. apartado 2.3) y se incubaron durante 10 min a 25°C en agitación continua con las concentraciones de ATP indicadas. A continuación se determinó la actividad NR en medio magnesio. Se presenta la media \pm SE de la v_i (0-2 min de ensayo) de, al menos, cuatro experimentos independientes.



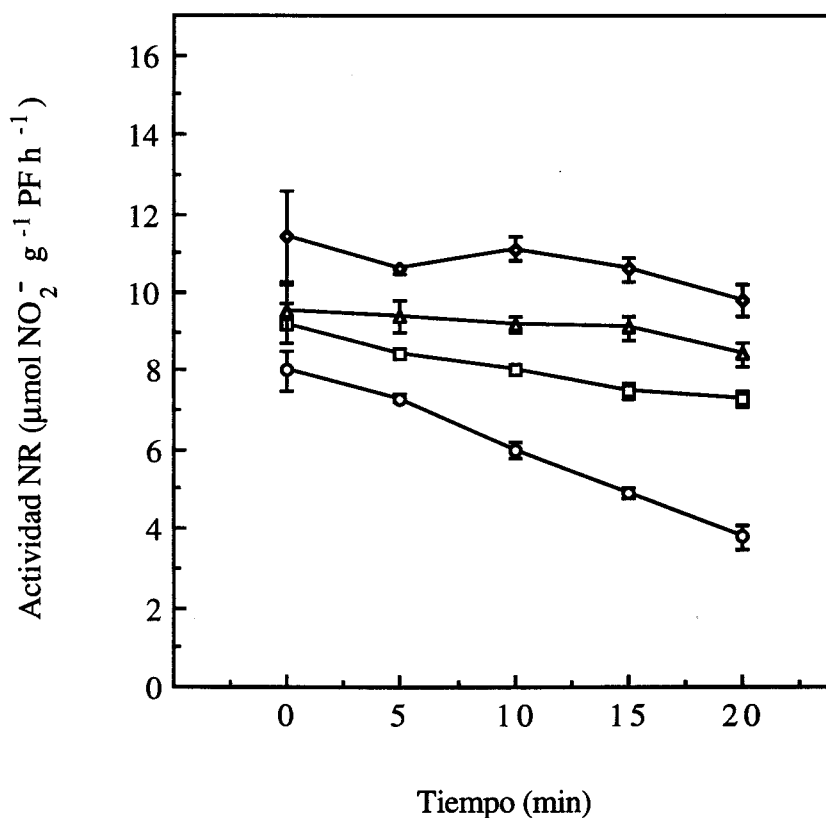
NR de hojas de cebada en iluminación, extraída y desalada en medio magnesio, y ensayada en presencia de concentraciones crecientes de ATP entre 0,5 y 5 mM, preincubando durante 10 min. A diferencia de la NR de espinaca, a todas las concentraciones de ATP ensayadas se produjo una activación de la NR de cebada. La activación fue esencialmente lineal en función de la concentración de efector, llegándose casi a duplicar la actividad NR del control (ausencia de ATP) a concentraciones de ATP de 5 mM.

Se ha ensayado también el efecto del ATP sobre la actividad NR de cebada en función del tiempo de incubación. En la *Fig. 21* se observa que la activación de la NR de hojas de cebada por ATP es inmediata, puesto que se manifiesta a tiempo cero de incubación con las tres concentraciones de ATP ensayadas (0,5, 3 y 5 mM). Por otra parte, el efecto activador del ATP se traduce esencialmente a lo largo del tiempo de incubación en la protección frente a la pérdida de actividad que en este tiempo (a 25 °C) experimenta la NR presente en el extracto control sin adición de ATP.

Si el efecto positivo del ATP sobre la actividad NR se representa en función de la concentración de Mg^{2+} libre en el medio de ensayo (*Fig. 22*), se puede observar que, en extractos sin preincubación, la activación por ATP de la NR puede considerarse también una consecuencia de la disminución de la concentración de Mg^{2+} libre, aunque no se alcanzaron porcentajes de activación tal altos como los observados con la NR de espinaca (*Fig. 19*). A concentraciones de Mg^{2+} libre de 0,2 mM, la activación de la NR era de un 30%, una proporción incluso menor que la observada a concentraciones de Mg^{2+} libre entre 1,0 y 0,5 mM en presencia de P_i (*Fig. 17*), y mucho menores que las obtenidas con glucosa 6-fosfato.

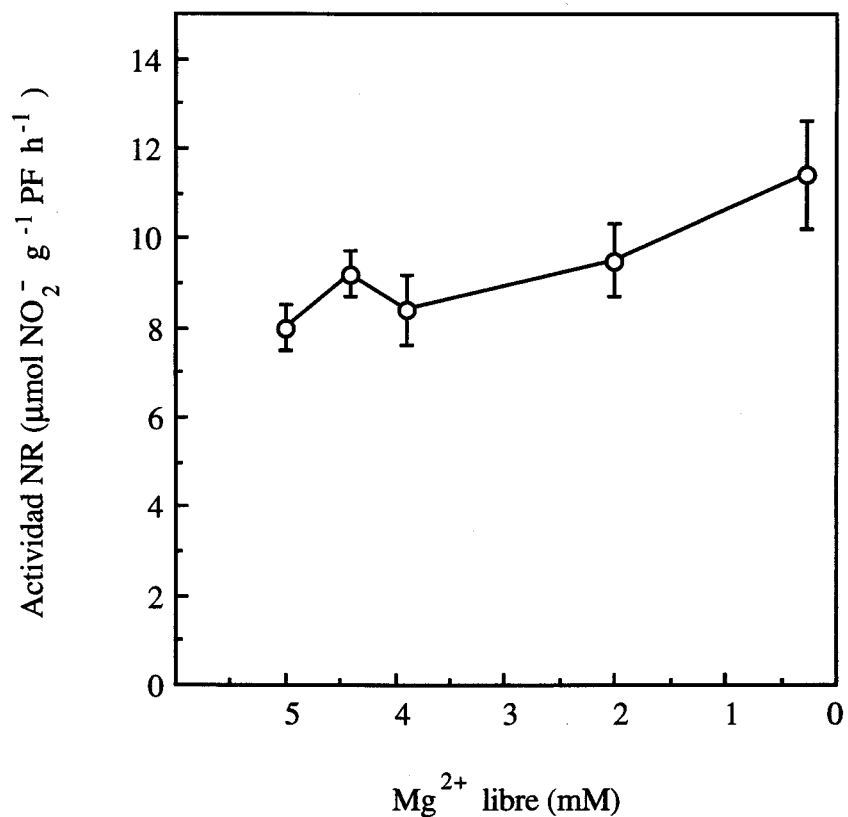
En conjunto, los resultados indican que existe una clara diferencia de comportamiento entre la NR de cebada y espinaca respecto al ATP in vitro. A

Fig. 21 *Efecto in vitro del ATP sobre la actividad NR de hojas de cebada en iluminación en función del tiempo de incubación*



Las plantas se iluminaron durante 2 h en condiciones de cultivo e inmediatamente se congelaron las hojas en N₂ líquido. Los extractos se prepararon y desalaron en medio magnesio (M. y M. apartado 2.3) y se incubaron hasta 20 min a 25° C con agitación continua en ausencia (○) o en presencia de 0,5 (□), 3 (△) y 5 (◇) mM ATP. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para la determinación de la actividad NR en medio magnesio. Se presenta la media±SE de la v_i (0-2 min de ensayo) de, al menos, cuatro experimentos independientes.

Fig. 22 *Activación in vitro por ATP de la NR de hojas de cebada en iluminación en función de la concentración de Mg^{2+} libre*



Se representan los datos correspondientes a tiempo cero de preincubación de la Fig. 21. Las concentraciones de efectores libres se calcularon como se indica en el apartado. 2.3.3 de M. y M.

concentraciones de ATP entre 0,5 y 1 mM, en consonancia con los resultados de otros autores (Kaiser y Spill, 1991; Huber et al., 1992; Mackintosh, 1992), la NR de espinaca se inhibe in vitro, mientras que la de cebada no. Esta inhibición por ATP en presencia de Mg^{2+} fue la primera evidencia de la inactivación por fosforilación de la NR de de espinaca, y es evidente que no puede aplicarse a la NR de cebada. Por otra parte, a concentraciones altas de ATP entre 3 y 5 mM, ambos enzimas se activan in vitro, probablemente debido a la capacidad del ATP para secuestrar Mg^{2+} del medio.

3.3. ESTUDIO COMPARADO DE LA MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD NR FOLIAR EN DIVERSAS ESPECIES

Los resultados anteriores muestran que existen similitudes y diferencias entre la modulación de la NR de hojas de cebada y espinaca in vivo e in vitro. Las más significativas son:

- Ambos enzimas se inactivan in vivo en condiciones en las que la fijación de CO₂ no es operativa (*e. g.* oscuridad o atmósfera carente de CO₂).
- Ambos enzimas son sensibles a la inhibición in vitro por Mg²⁺ en extractos procedentes de hojas en iluminación y oscuridad.
- En ambos casos, los azúcares-fosfato y el P_i protegen a la NR de ambos orígenes, contra la inhibición in vitro por Mg²⁺.

Sin embargo,

- La manifestación de la inactivación in vivo de la NR de hojas de espinaca es absolutamente dependiente de Mg²⁺, mientras que la de hojas de cebada no lo es.
- La NR de hojas de espinaca se inactiva in vitro por ATP, mientras que la de cebada no.

La similar dependencia in vivo de la NR de ambos orígenes por fijación de CO₂ apunta a un patrón general de control por carbono de la asimilación de nitrato, al tiempo que las diferencias observadas en cuanto a la sensibilidad a Mg²⁺ de la NR sugiere la posibilidad de que existan diferencias en el mecanismo concreto de regulación del enzima. Con objeto de ampliar la perspectiva de estas similitudes y diferencias, se ha investigado la respuesta de la NR foliar de distintas especies vegetales a transiciones luz-oscuridad, determinando la sensibilidad del enzima a la inhibición por Mg²⁺, así como su posible requerimiento para que se manifieste la inactivación por oscuridad.

Se han seleccionado un total de 13 especies vegetales, cuyas semillas están disponibles en el mercado y se pueden cultivar fácilmente en el laboratorio. Estas especies representan una variedad de familias vegetales y tienen el interés añadido de ser ampliamente cultivadas en nuestra región por su interés agrícola u hortícola: acelga, calabacín, calabaza, guisante, haba, lechuga, maíz, melón, pepino, remolacha, soja, sorgo y tabaco.

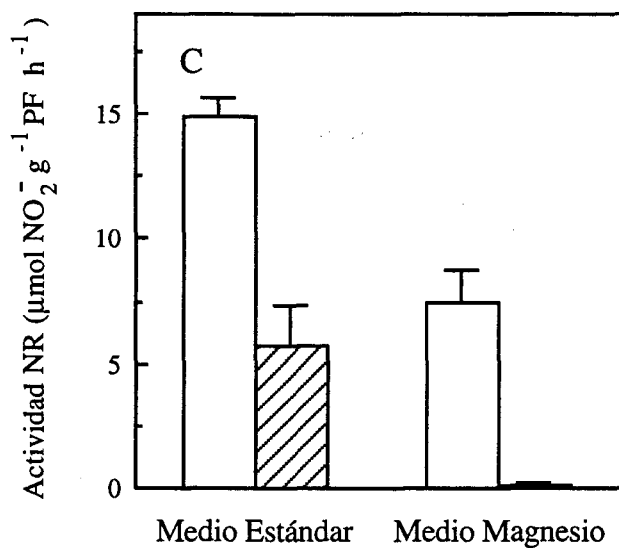
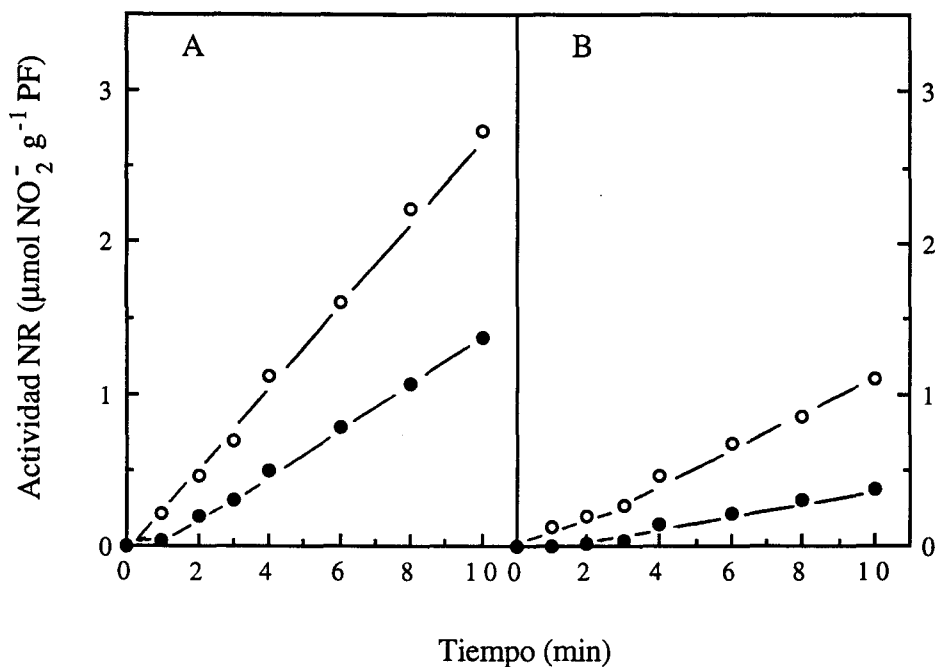
La mayoría de las especies ensayadas presentaban niveles adecuados de actividad NR en la hoja en condiciones de iluminación, tanto en medio estándar (sin Mg^{2+} y con EDTA y P_i a concentraciones de 5 mM) como en medio magnesio. Como excepción a este comportamiento, no se detectó actividad NR en estos medios de extracción y ensayo en las hojas de lechuga y sorgo.

La NR extraída de hojas de tres de las especies ensayadas, maíz (*Fig. 23*), remolacha (*Fig. 24*) y guisante (*Fig. 25*) mostró inactivación por oscuridad tanto en medio estándar como en medio magnesio.

En el caso del maíz, la actividad inicial en oscuridad resultó un 40% de la correspondiente en iluminación en medio estándar (*Fig. 23A, C*). En medio magnesio, la actividad inicial en luz resultó también inferior a la determinada en medio estándar, y la actividad inicial en oscuridad era prácticamente cero (*Fig. 23B, C*). Por tanto, la inactivación in vivo de la NR por oscuridad era evidente en ausencia de Mg^{2+} ; y tanto el enzima extraído en iluminación como el extraído en oscuridad eran sensibles a la inhibición in vitro por Mg^{2+} , aunque el grado de inhibición de la NR en oscuridad era superior al del enzima en iluminación.

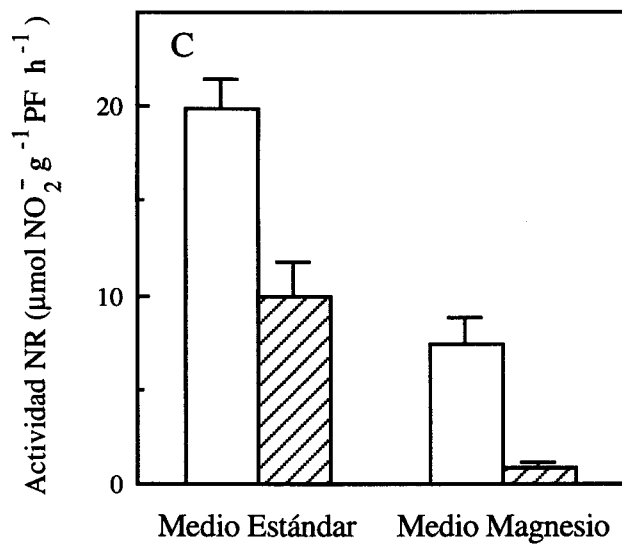
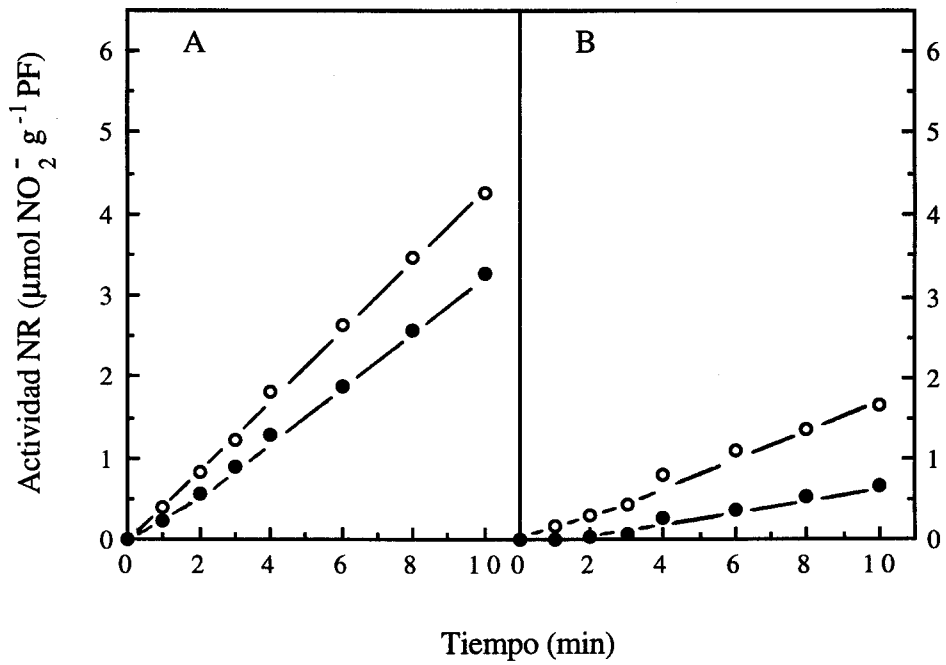
En el caso de la remolacha, la actividad NR en oscuridad alcanzó un 50% de su correspondiente en iluminación en medio estándar (*Fig. 24A, C*). En medio magnesio, la actividad inicial en luz era también muy inferior a la determinada en medio estándar, y la actividad inicial en oscuridad era un 10% de la

Fig. 23 *Respuesta a la transición luz-oscuridad y sensibilidad a Mg^{2+} de la actividad NR de hojas de maíz*



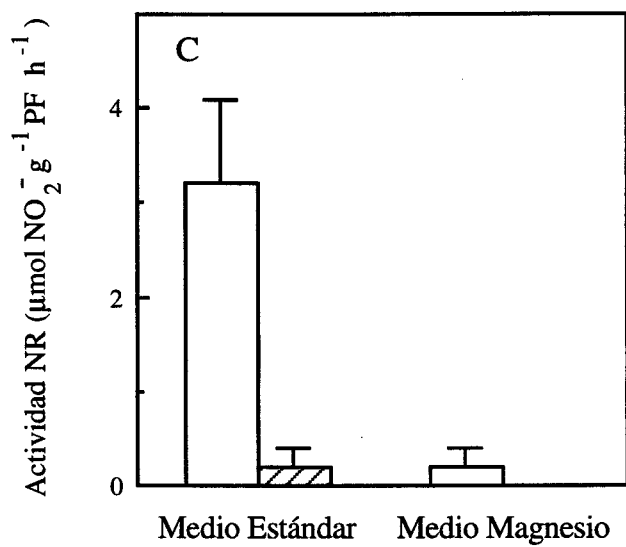
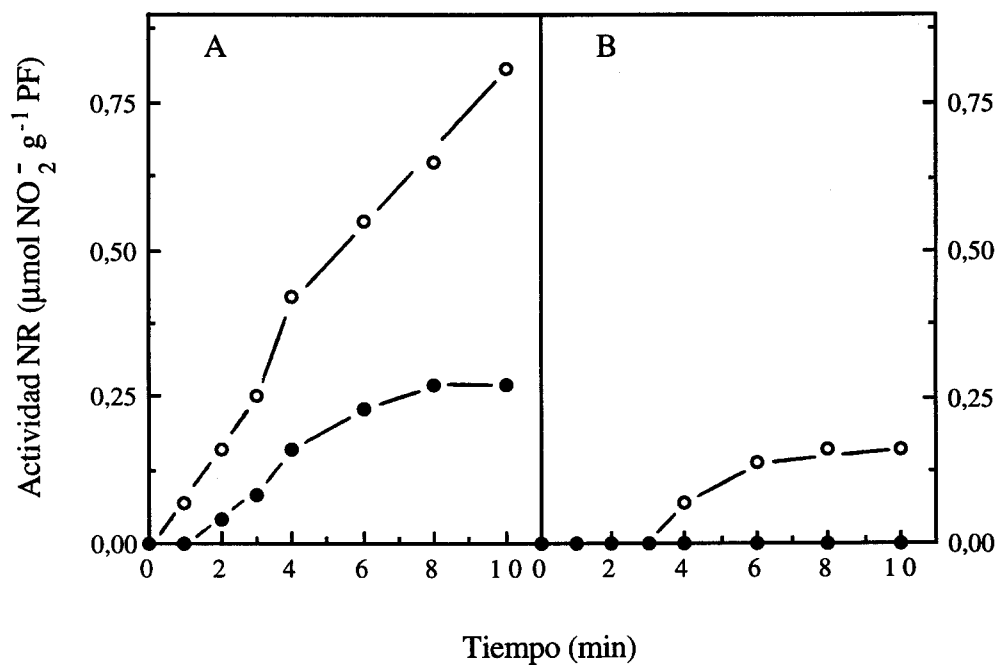
Se utilizaron extractos crudos, preparados y ensayados en medio estándar (A) o en medio magnesio (B) (M. y M. apartado 2.3), de hojas iluminadas 2 h en condiciones de cultivo (O, □) y posteriormente sometidas a 30 min de oscuridad (●, ▨). A y B, datos de un experimento representativo; C, media \pm SE de v_i (0-2 min de ensayo) de, al menos, tres experimentos independientes.

Fig. 24 *Respuesta a la transición luz-oscuridad y sensibilidad a Mg^{2+} de la actividad NR de hojas de remolacha*



Condiciones como en la Fig. 23.

Fig. 25 *Respuesta a la transición luz-oscuridad y sensibilidad a Mg^{2+} de la actividad NR de hojas de guisante*



Condiciones como en la Fig. 23.

correspondiente en iluminación (*Fig. 24B, C*), reproduciendo un comportamiento in vivo e in vitro similar al anterior.

En hojas de guisante, se detectaron actividades NR muy bajas. Mientras que en medio estándar la actividad inicial en oscuridad era de apenas un 5% de la correspondiente en iluminación (*Fig. 25A, C*), en medio magnesio las actividades NR iniciales en iluminación y oscuridad eran prácticamente nulas (*Fig. 25B, C*), aunque el enzima de extractos de hojas en iluminación se reactivaba in vitro.

El comportamiento de la NR foliar de estas tres especies, maíz, remolacha y guisante, es similar al de la cebada (*Fig. 13*), esto es, la inactivación in vivo por oscuridad se observa en ausencia y en presencia de Mg^{2+} , y tanto el enzima de luz como el de oscuridad experimentan una inhibición in vitro por Mg^{2+} , pudiéndose distinguir dos inhibiciones aditivas: una inactivación por oscuridad in vivo, independiente de Mg^{2+} , y una inhibición in vitro por Mg^{2+} que se superpone a la anterior. Por ello, estas especies se han agrupado en el *Tipo I ó Tipo Cebada*, y la sensibilidad de sus respectivas NR foliares a oscuridad y Mg^{2+} se resumen en la *Tabla 12*.

La NR extraída de hojas de siete de las especies ensayadas, pepino (*Fig. 26*), acelga (*Fig. 27*), soja (*Fig. 28*), calabacín (*Fig. 29*), calabaza (*Fig. 30*), melón (*Fig. 31*) y tabaco (*Fig. 32*) mostraron una fuerte inactivación por oscuridad únicamente en medio magnesio, pero no en medio estándar, en el que la actividad NR inicial era prácticamente similar en extractos de hojas en iluminación o en oscuridad.

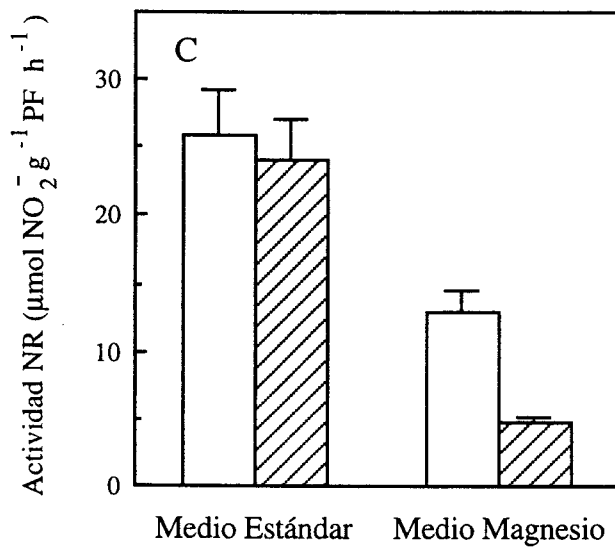
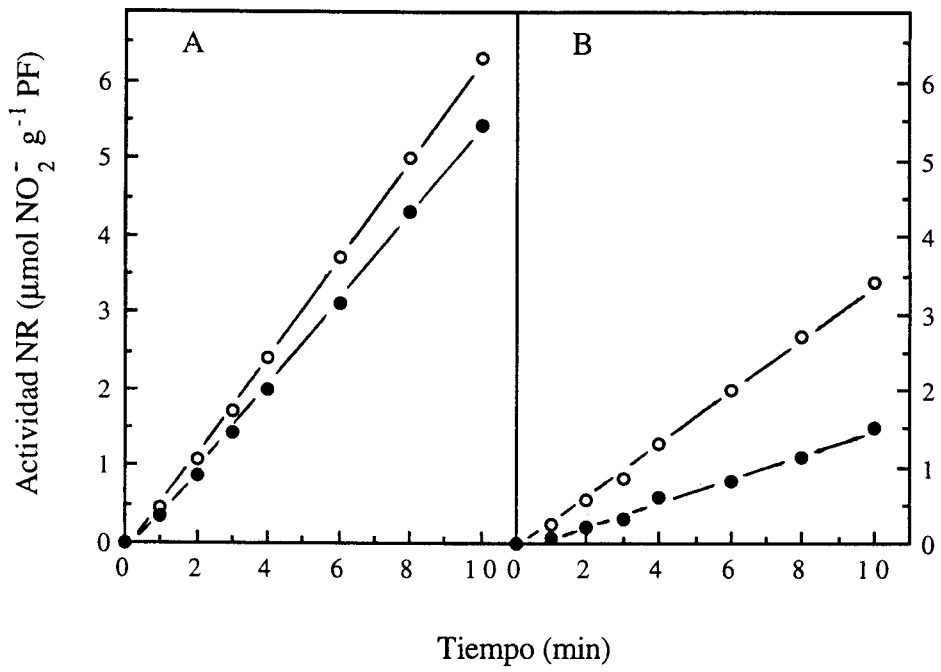
En el caso del pepino, la actividad NR inicial en oscuridad era prácticamente igual a la correspondiente en iluminación en medio estándar (*Fig. 26A, C*). En medio magnesio las actividades NR en luz y en oscuridad eran mucho menores que las determinadas en medio estándar, y se registró un 60% de inactivación por

Tabla 12. Inactivación por oscuridad e inhibición por Mg^{2+} de la NR de hojas de las especies agrupadas en el Tipo I ó Tipo Cebada

Especies	Actividad NR			
	% Inactivación por oscuridad		% Inhibición in vitro por Mg^{2+}	
	Medio estándar	Medio magnesio	Luz	Oscuridad
Cebada	60	80	46	73
Maíz	62	99	50	98
Remolacha	50	89	63	92
Guisante	94	100	94	100

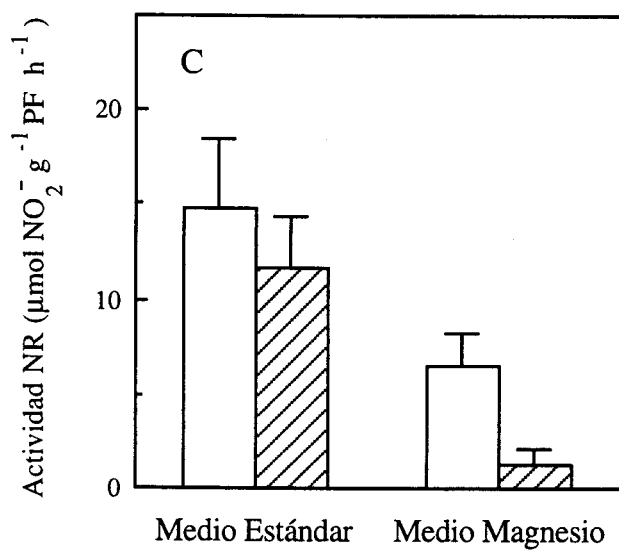
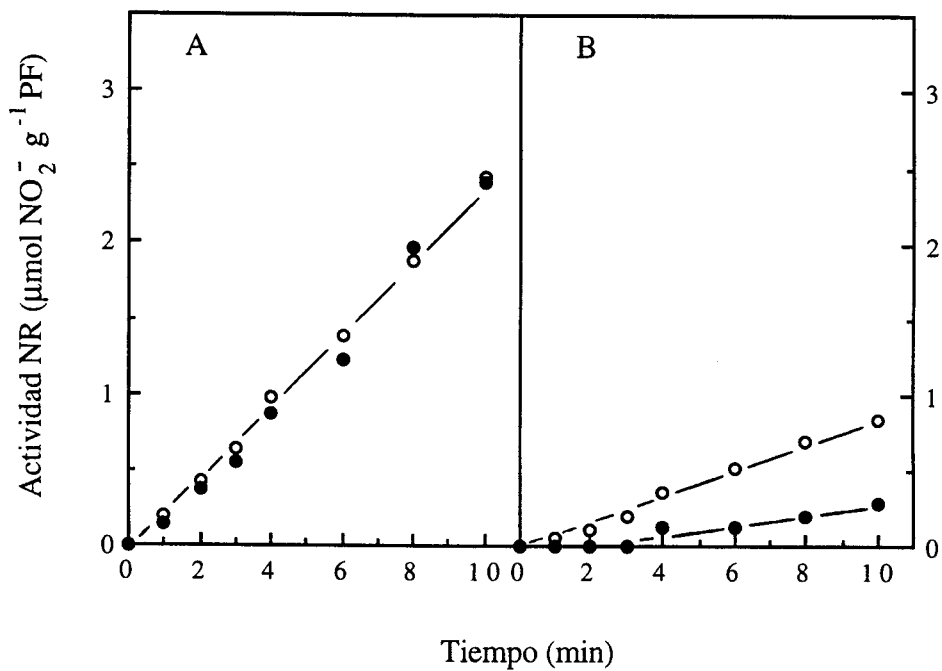
Los porcentajes de inactivación por oscuridad e inhibición por Mg^{2+} se han obtenido a partir de las medias representadas en las Figs. 13C, 23C, 24C y 25C.

Fig. 26 *Respuesta a la transición luz-oscuridad y sensibilidad a Mg^{2+} de la actividad NR de hojas de pepino*



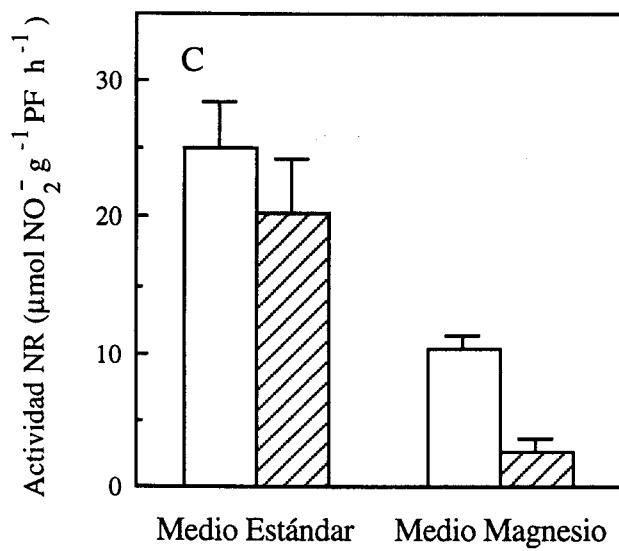
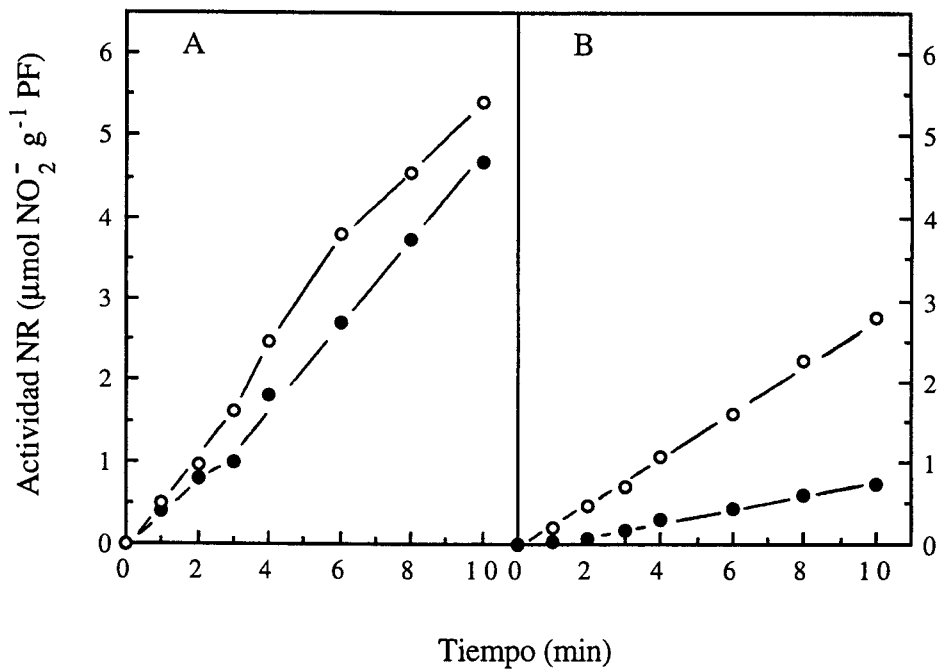
Condiciones como en la Fig. 23.

Fig. 27 *Respuesta a la transición luz-oscuridad y sensibilidad a Mg^{2+} de la actividad NR de hojas de acelga*



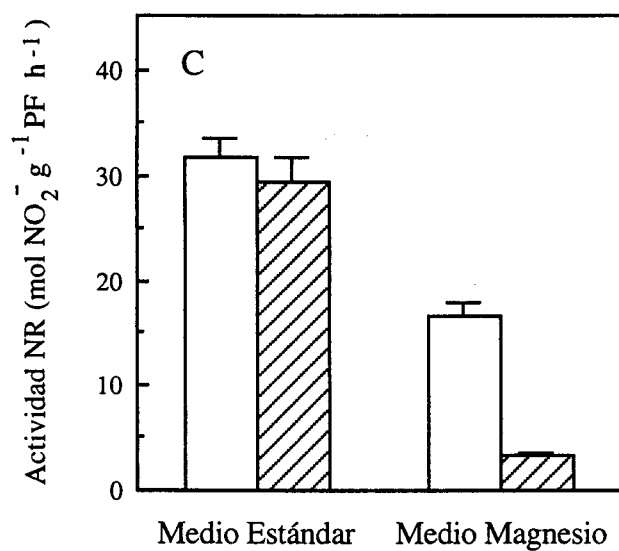
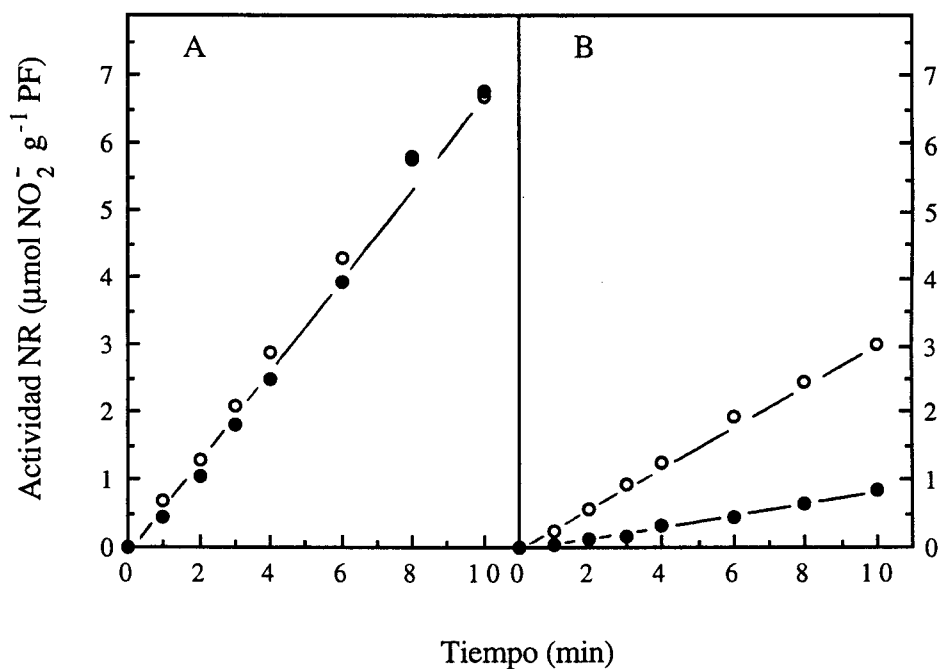
Condiciones como en la Fig. 23.

Fig. 28 *Respuesta a la transición luz-oscuridad y sensibilidad a Mg^{2+} de la actividad NR de hojas de soja*



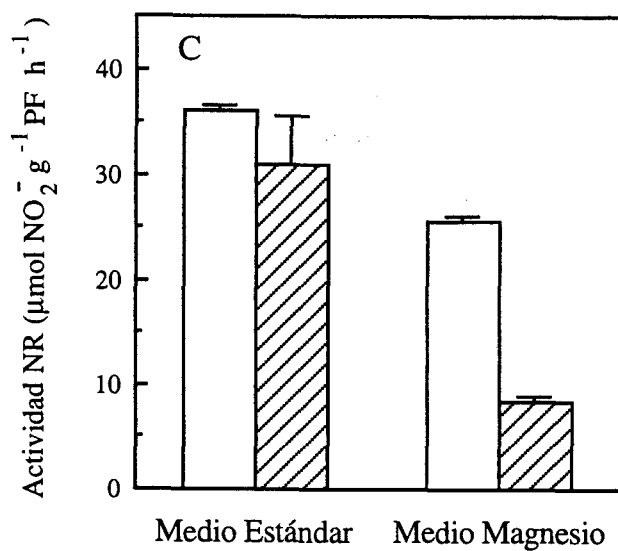
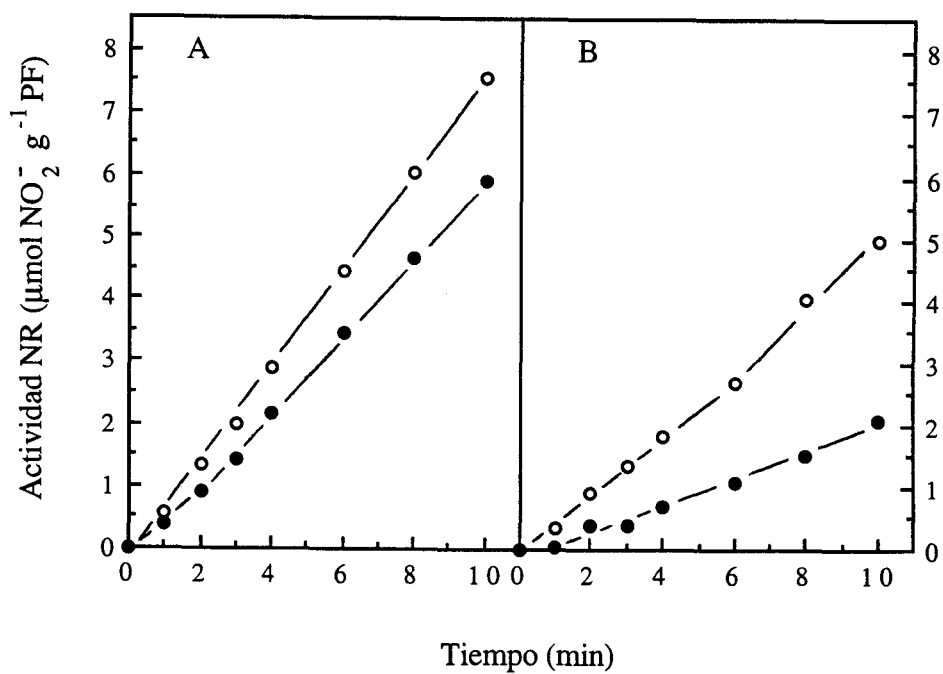
Condiciones como en la Fig. 23.

Fig. 29 *Respuesta a la transición luz-oscuridad y sensibilidad a Mg^{2+} de la actividad NR de hojas de calabacín*



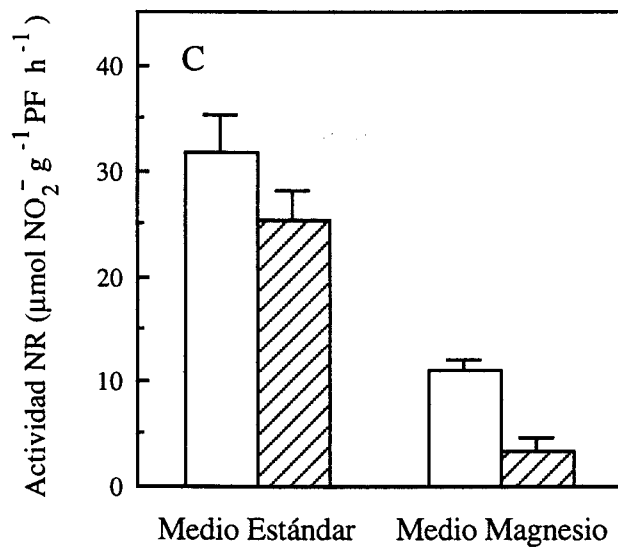
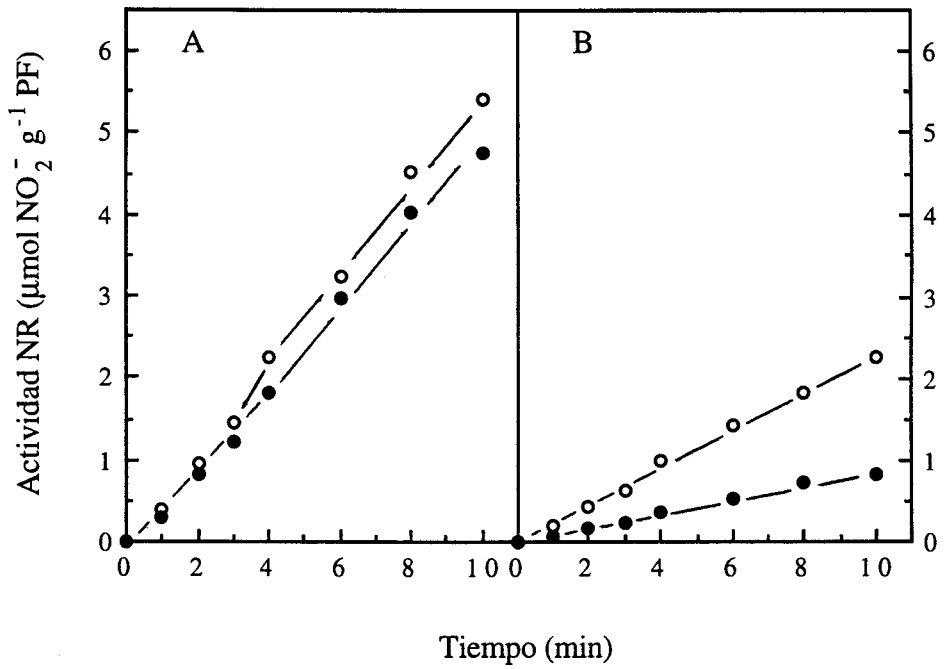
Condiciones como en la Fig. 23.

Fig. 30 *Respuesta a la transición luz-oscuridad y sensibilidad a Mg^{2+} de la actividad NR de hojas de calabaza*



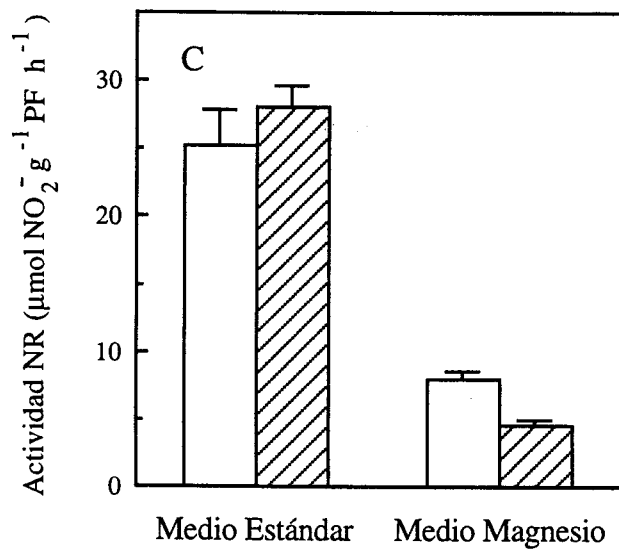
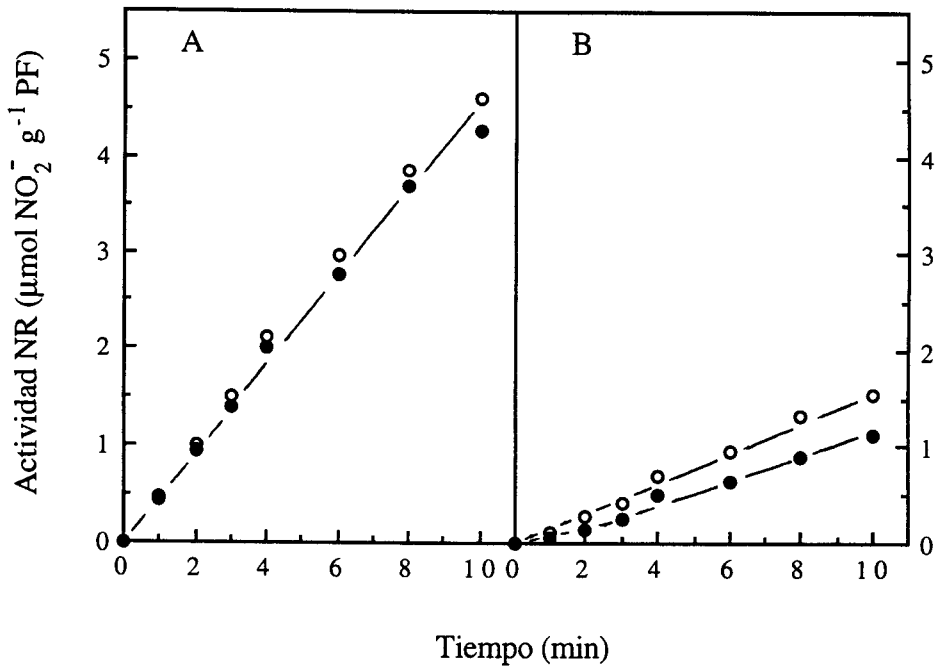
Condiciones como en la Fig. 23.

Fig. 31 *Respuesta a la transición luz-oscuridad y sensibilidad a Mg^{2+} de la actividad NR de hojas de melón*



Condiciones como en la Fig. 23.

Fig. 32 *Respuesta a la transición luz-oscuridad y sensibilidad a Mg^{2+} de la actividad NR de hojas de tabaco*



Condiciones como en la Fig. 23.

oscuridad (*Fig. 26B, C*), observándose reactivación in vitro en los extractos en oscuridad.

En la acelga tampoco se encontraron diferencias significativas entre las actividades NR de extractos de hojas en iluminación o en oscuridad en medio estándar (*Fig. 27A, C*). En medio magnesio las actividades NR eran significativamente más bajas que en medio estándar, resultando la actividad inicial en oscuridad un 20% de la correspondiente en iluminación (*Fig. 27B, C*).

En el caso de la soja, la actividad NR inicial en oscuridad era también similar a la correspondiente en iluminación en medio estándar (*Fig. 28A, C*). En medio magnesio las actividades NR eran menores que las determinadas en medio estándar, y la actividad inicial en oscuridad era de un 25% de la correspondiente en iluminación (*Fig. 28B, C*).

En el calabacín tampoco se encontraron diferencias significativas entre las actividades NR de extractos de hojas en iluminación o en oscuridad en medio estándar (*Fig. 29A, C*). En medio magnesio las actividades NR eran más bajas que en medio estándar, y la actividad inicial en oscuridad era un 20% de la correspondiente en iluminación (*Fig. 29B, C*).

En el caso de la calabaza la actividad NR era también similar en extractos de hojas en iluminación o en oscuridad en medio estándar (*Fig. 30A, C*). En medio magnesio las actividades NR eran menores que las determinadas en medio estándar; la actividad inicial en oscuridad resultó un 30% de la correspondiente en iluminación (*Fig. 30B, C*), y se observó reactivación in vitro del enzima en los extractos en oscuridad.

En el melón, la actividad NR inicial en oscuridad resultó similar a la correspondiente en iluminación en medio estándar (*Fig. 31A, C*). En medio magnesio las actividades NR eran muy inferiores a las determinadas en medio

estándar, y la actividad inicial en oscuridad era de un 30% de la correspondiente en iluminación (*Fig. 31B, C*).

En el caso del tabaco tampoco se encontraron diferencias significativas entre la actividad NR de hojas en iluminación y en oscuridad en medio estándar (*Fig. 32A, C*). En medio magnesio las actividades NR eran muy inferiores a las obtenidas en medio estándar, registrándose una de las mayores inhibiciones por Mg^{2+} del extracto en iluminación. En presencia de Mg^{2+} la actividad inicial en oscuridad era de un 60% de la correspondiente en iluminación (*Fig. 32B, C*).

El comportamiento de la NR foliar de estas siete especies es similar al de la espinaca (*Fig. 14*), por lo que se han agrupado en el *Tipo II o Tipo Espinaca* (*Tab. 13*). En este grupo es necesaria la presencia de Mg^{2+} para que se manifieste inequívocamente la inactivación in vivo de la NR por oscuridad, mostrando de esta forma su dependencia por Mg^{2+} . En estas especies es también evidente que la actividad NR extraída de hojas en iluminación y, especialmente, en oscuridad es muy sensible a la inhibición por Mg^{2+} in vitro.

Por último, en otra de las especies ensayadas, el haba, no se observaron diferencias significativas entre las actividades NR de hojas en iluminación y en oscuridad ensayadas en medio estándar o medio magnesio (*Fig. 33*). En este último medio, las actividades iniciales en luz y en oscuridad resultaron prácticamente indetectables, aunque era posible observar en ambos casos, una reactivación in vitro del enzima, tras lo cual se alcanzaron velocidades finales también similares en los extractos en iluminación y oscuridad. Sin embargo, la NR mostró una manifiesta sensibilidad al Mg^{2+} ; tanto el enzima de luz como el de oscuridad se inhibieron casi por completo en medio magnesio.

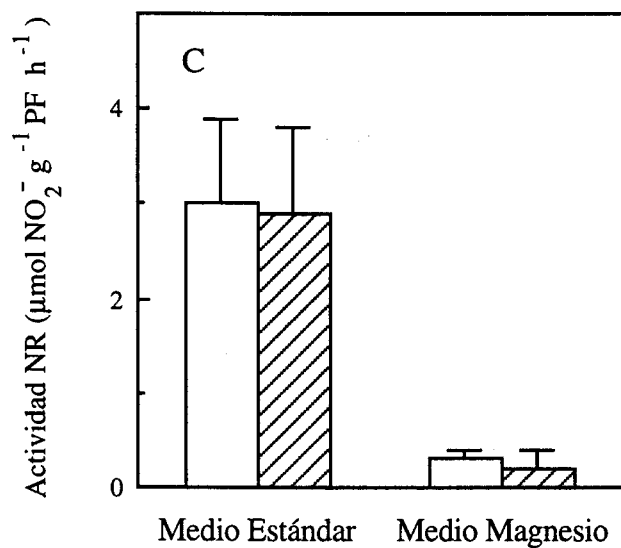
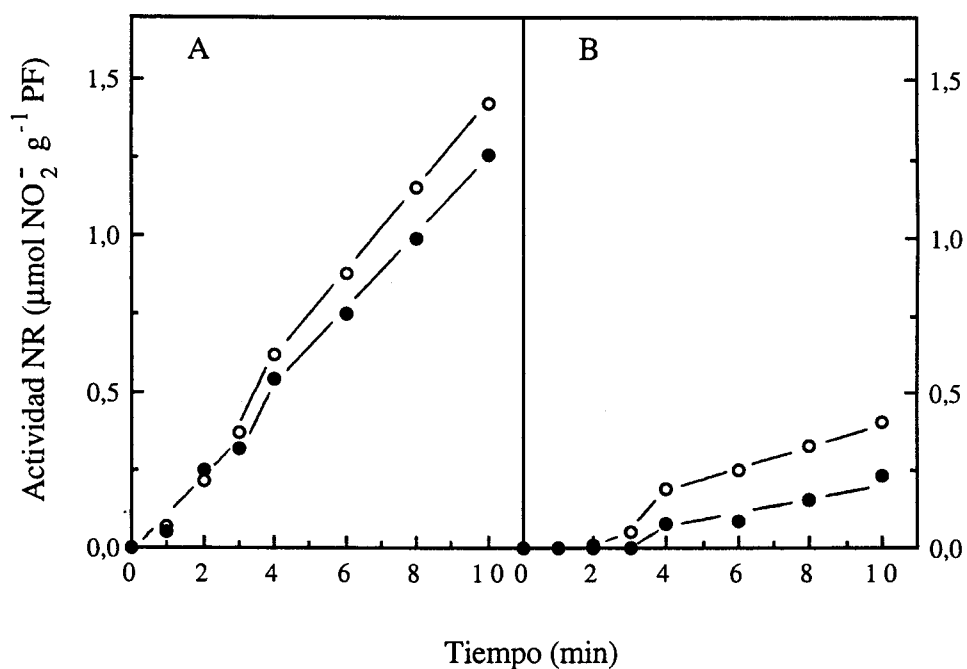
Resulta evidente que en todas las especies ensayadas, la NR extraída de hojas en iluminación o en oscuridad era sensible a Mg^{2+} , aunque en la mayoría de ellas el efecto inhibitor del Mg^{2+} sobre el enzima extraído de hojas en iluminación

Tabla 13. Inactivación por oscuridad e inhibición por Mg^{2+} de la NR de hojas de las especies agrupadas en el Tipo II ó Tipo Espinaca

Especies	Actividad NR			
	% Inactivación por oscuridad		% Inhibición in vitro por Mg^{2+}	
	Medio estándar (*)	Medio magnesio	Luz	Oscuridad
Espinaca	18	75	76	93
Pepino	7	63	50	80
Acelga	22	80	55	89
Soja	20	76	58	88
Calabacín	7	81	47	89
Calabaza	14	67	29	73
Melón	20	70	65	87
Tabaco	0	44	68	84

Los porcentajes de inactivación por oscuridad e inhibición por Mg^{2+} se han obtenido a partir de las medias representadas en las Figs. 14C, y 26C a 32C. (*) Diferencias estadísticamente no significativas ($p > 0,05$).

Fig. 33 *Respuesta a la transición luz-oscuridad y sensibilidad a Mg^{2+} de la actividad NR de hojas de haba*



Condiciones como en la Fig. 23.

(alta actividad) era significativamente menor que sobre el enzima procedente de hojas en oscuridad (baja actividad). Por otro parte, aunque la NR de hojas de espinaca es mucho más sensible a la inhibición in vitro por Mg^{2+} que la de cebada, el resto de especies del *Tipo II* (Tab. 13) presentaba porcentajes similares de inhibición in vitro por Mg^{2+} a los de las especies del *Tipo I* (Tab. 12). El criterio diferencial que emerge de este estudio para los dos tipos de especies es, pues, el requerimiento o no por Mg^{2+} para que se manifieste la inactivación in vivo del enzima (Tab. 14). Las cuatro especies agrupadas como pertenecientes al *Tipo I* ó *Tipo Cebada* comparten una característica fundamental: la inactivación por oscuridad de su NR foliar se manifiesta tanto en presencia como en ausencia de magnesio (medio magnesio y medio estándar, respectivamente). Además, en todas ellas el enzima de luz u oscuridad es sensible a la inhibición por Mg^{2+} . Los datos ponen de manifiesto la existencia de dos inhibiciones aditivas: una inactivación por oscuridad in vivo, independiente de Mg^{2+} , y una inhibición in vitro por Mg^{2+} que se superpone a la anterior. En las ocho especies agrupadas en el *Tipo II* ó *Tipo Espinaca* la inactivación por oscuridad sólo se manifiesta inequívocamente en medio magnesio pero no en medio estándar, por lo que la inactivación in vivo por oscuridad de la NR de todas estas especies es dependiente de Mg^{2+} . A un posible tercer grupo pertenecería el haba (*Tipo III*), en la que no es posible detectar la inactivación por oscuridad ni en medio estándar ni en medio magnesio. Por último, hay que hacer notar que la presencia de magnesio en los medios de extracción y ensayo tiene efectos comunes en los tres tipos de especies, por una parte da lugar a la manifestación de actividades más bajas tanto en luz como en oscuridad, y por otra, parece actuar estabilizando a la forma inactiva del enzima (Tab. 14).

Finalmente, se ha ensayado la capacidad de la glucosa 6-fosfato para proteger a la NR foliar contra la inhibición por Mg^{2+} en especies de los *Tipos I* y *II*. La *Tabla 15* muestra los porcentajes de activación por glucosa 6-fosfato de la

Tabla 14. Requerimiento diferencial por Mg^{2+} para la inactivación in vivo de la NR en diversas especies

Tipo I (Cebada): La inactivación por oscuridad de la NR se observa tanto en ausencia como en presencia de Mg^{2+} (Tab. 12):

Cebada	(<i>Hordeum vulgare</i> L. var. Hassan)	(Fig. 13)
Maíz	(<i>Zea mays</i> L. var. Bianca)	(Fig. 23)
Remolacha	(<i>Beta vulgaris</i> L. subsp. vulgaris L.)	(Fig. 24)
Guisante	(<i>Pisum sativum</i> L. var Lincoln)	(Fig. 25)

Tipo II (Espinaca): La inactivación por oscuridad de la NR sólo se observa inequívocamente en presencia de Mg^{2+} (Tab. 13)

Espinaca	(<i>Espinacia oleracea</i> L. var. Resistoflay)	(Fig. 14)
Pepino	(<i>Cucumis sativus</i> L.)	(Fig. 26)
Acelga	(<i>Beta vulgaris</i> L. var. cicla L.)	(Fig. 27)
Soja	(<i>Glycine max</i> L.)	(Fig. 28)
Calabacín	(<i>Cucurbita pepo</i> L.)	(Fig. 29)
Calabaza	(<i>Cucurbita maxima</i> L.)	(Fig. 30)
Melón	(<i>Cucumis melo</i> L.)	(Fig. 31)
Tabaco	(<i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. K4-14)	(Fig. 32)

Tipo III: No se observa inactivación por oscuridad de la NR ni en presencia ni ausencia de Mg^{2+} :

Haba	(<i>Vicia faba</i> L.)	(Fig. 33)
------	-------------------------	-----------

Tabla 15. Activación in vitro por glucosa 6-fosfato de la NR extraída de hojas de diversas especies en iluminación y en oscuridad en medio magnesio

Especies	Actividad NR (% del control)			
	Luz		Oscuridad	
	Control	+G6P	Control	+G6P
<u>Tipo I:</u>				
Remolacha	100 (7,4)	175	100 (0,8)	158
Guisante	100 (0,2)	180	100 (0,2)	150
<u>Tipo II:</u>				
Pepino	100 (13)	142	100 (4,8)	365
Acelga	100 (6,6)	225	100 (1,3)	316
Soja	100 (10,4)	129	100 (2,5)	345
Calabacín	100 (16,7)	120	100 (3,2)	200
Calabaza	100 (25,5)	141	100 (8,4)	271

Se utilizaron plantas iluminadas durante 2 h en condiciones de cultivo y, en su caso, sometidas a continuación a 30 min de oscuridad. Tras el tratamiento, las hojas se congelaron en N₂ líquido. Los extractos crudos se prepararon en medio magnesio (M. y M. apartado 2.3). La actividad NR se determinó en el mismo medio en ausencia o presencia de G6P 25 mM, añadida a tiempo cero. Se presenta datos representativos para cada especie. Entre paréntesis se detalla el valor de actividad NR expresado en $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$.

NR de extractos procedentes de hojas en iluminación y oscuridad, obtenidos y ensayados en medio magnesio. Como puede observarse, en presencia de glucosa 6-fosfato 25 mM la actividad NR de extractos de hojas en iluminación aumentaba en todos los casos, aunque el grado de activación varió desde un 20% en el caso del calabacín hasta más del doble en el caso de la acelga. En estas mismas condiciones, la actividad NR de extractos de hojas en oscuridad registró un aumento de un 50% en las especies del *Tipo I*, mientras que en las del *Tipo II*, la activación in vitro fue más acusada, desde dos veces los valores de actividad NR en el caso del calabacín, hasta aumentarlos más de tres veces en los casos del pepino, acelga y soja. De forma análoga a la observada en cebada y espinaca (*Tabls. 8 y 11*), la NR foliar de especies del *Tipo II* muestra mayores grados de activación in vitro por glucosa 6-fosfato en los extractos de hojas en oscuridad que la de las especies del *Tipo I*.

Los datos ponen de manifiesto que la protección por glucosa 6-fosfato frente a la inhibición por Mg^{2+} de la NR foliar está ampliamente distribuido entre especies herbáceas, y es también evidente que esta protección se manifiesta en mayor grado sobre las formas de NR que son más sensibles a la inhibición por iones Mg^{2+} , es decir, la de especies del *Tipo II* extraída de hojas en oscuridad.

IV. DISCUSIÓN

En los tejidos fotosintéticos de la planta, la regulación de la asimilación de nitrato es un aspecto clave para equilibrar la asimilación de los dos bioelementos primordiales, carbono y nitrógeno. La biosíntesis de aminoácidos, precursores para la síntesis de proteínas, nucleótidos, ácidos nucleicos, etc, requiere esqueletos carbonados, procedentes de la fijación de CO₂, y nitrógeno amínico, procedente de la asimilación de nitrato.

En microalgas existe una amplia evidencia experimental que indica el control por carbono de la asimilación de nitrato (Losada et al., 1981; Lara, 1992), aunque en estos organismos, dicho control se ejerce a nivel del transporte de nitrato al interior de la célula (Lara et al., 1993). En plantas superiores no existe por el momento evidencia de que el transporte de nitrato esté sometido a control metabólico. El trabajo pionero de Kaiser y Föster (1989) presenta, por el contrario, evidencia de que en plantas de espinaca sometidas a estrés hídrico, que provoca cierre estomático y la consiguiente inhibición de la fijación de CO₂, la reducción de nitrato en la hoja está drásticamente inhibida por inactivación de la NR y las hojas siguen acumulando activamente nitrato. Probablemente, la capacidad de almacenar nitrato transitoriamente en la vacuola haya determinado que el principal punto de control de la ruta en plantas sea el primer enzima de la misma, esto es, la NR.

Como se ha expuesto en la Introducción (Apartado 1.2), existe ya amplia evidencia de que la NR foliar de plantas superiores se inactiva de forma reversible al inhibir la fijación de CO₂ o al someter las hojas a cortos períodos de oscuridad. Estos cambios en la actividad NR foliar en respuesta a las condiciones de iluminación y/o suministro de CO₂ son estables en extractos desalados (Kaiser y

Spill, 1991; *Fig. 4*), indicando la implicación de un mecanismo de modificación covalente reversible del enzima, que en el caso de espinaca (Huber et al., 1992), maíz (Huber et al., 1994), *Arabidopsis* (LaBrie y Crawford, 1994) y *Brassica campestris* (Kojima et al., 1994) podría implicar la fosforilación (inactivación)/defosforilación (activación) del enzima, junto con la unión de la forma fosforilada a un factor proteico inactivante al que se ha denominado NIP (Mackintosh et al., 1995), según el modelo que se resume en el *Esquema 3* (pag. 24).

Hasta la fecha, la naturaleza de la señal o señales que están implicadas en la regulación por luz y CO₂ de la NR de plantas superiores no se ha podido establecer con claridad. Inicialmente se propuso que los niveles citosólicos de ATP y AMP podrían determinar el estado de activación de la NR de hojas de espinaca (Kaiser y Spill, 1991; Kaiser et al., 1992). Tal proposición ha sido discutida y finalmente descartada (Riens y Heldt, 1992, Kaiser y Huber, 1994a), y se ha propuesto que otro tipo de señal, como cambios del pH o de los niveles de Ca²⁺ del citosol (Kaiser y Brendle-Behnisch, 1995; Bachmann et al., 1995), debe coordinar el estado de activación de la NR con la fotosíntesis. Los estudios sobre la modulación in vivo de la NR de hojas de cebada (Apartado 3.1) que se presentan en este trabajo, indican que los niveles de ciertos productos de la fijación de CO₂, concretamente de hexosas 6-fosfato, podrían ser la señal reguladora implicada en la respuesta de la actividad NR a las condiciones de iluminación y de fijación de CO₂ de la hoja. Las principales evidencias que sustentan esta propuesta son:

- 1.- La NR inactivada in vivo tras someter las hojas a un período corto de oscuridad, se reactiva tras iluminar en aire (*Figs. 1 y 2*), pero permanece inactiva si la reiluminación se realiza en una atmósfera carente de CO₂ (*Fig. 5*). Estos resultados indican que la luz es condición necesaria pero no suficiente para producir la reactivación de la NR.

- 2.- En hojas incubadas a distintas intensidades de luz, en aire o en N₂ conteniendo 1000 ppm de CO₂, la actividad NR es más alta a cualquier intensidad de luz, en la segunda fase gaseosa, en la que, al no existir fotorrespiración ni respiración, la fijación neta de CO₂ es más alta (*Fig. 9*). Esto indica que la activación de la NR responde más a condiciones que favorecen la fijación neta de CO₂ que a la iluminación en sí.
- 3.- Medidas simultáneas de fijación de CO₂ y actividad NR de la hoja muestran una correlación hiperbólica entre la actividad NR y la velocidad de fijación neta de CO₂ in vivo (*Fig. 10*). Esto sugiere que el sistema de activación de la NR se satura por productos de la fijación de CO₂ y que, en consecuencia, la fotomodulación de la NR es simplemente un reflejo de su dependencia respecto de la fijación de CO₂.
- 4.- La NR resulta inactivada en condiciones de iluminación al inhibir la fijación de CO₂ a nivel de la fase de regeneración del ciclo de Calvin con glicolaldehído (*Fig. 11; Tab. 4*).
- 5.- El suministro de hexosas, hexosas-fosfato o triosas-fosfato a la hoja por la corriente de transpiración, protege a la NR de la inactivación por oscuridad y aumenta la actividad NR de hojas en iluminación (*Tab. 3; Fig. 11*). Este efecto es particularmente significativo en el caso de la glucosa 6-fosfato. Estos resultados indican que, aumentando artificialmente los niveles de azúcares y azúcares-fosfato de la hoja, se incrementa el estado de activación de la NR en luz y, especialmente, se protege al enzima contra la inactivación en oscuridad. En este sentido, el suministro de P_i a la hoja, que produce un incremento en los niveles de hexosas-fosfato y triosas-fosfato (Leegood, 1989), también aumenta la actividad NR de hojas en iluminación u oscuridad.

- 6.- El suministro a la hoja de manosa, un inhibidor parcial de la fijación de CO₂ (*Tab. 4*), que actúa como agente secuestrador de P_i en el citoplasma al fosforilarse a manosa 6-fosfato (Herold et al., 1976, 1977; Sivak y Walker, 1986; Leegood, 1989), protege a la NR contra la inactivación por oscuridad (*Fig. 11*). Este comportamiento se ha observado también en la NR foliar de espinaca y se ha interpretado que la deficiencia en P_i citoplasmático, creada por la manosa, que redundaría en bajos niveles de ATP, limitaría la inactivación de la NR por fosforilación (Kaiser y Spill, 1991; Kaiser et al., 1992). Sin embargo, nuestros resultados muestran que cuando se suministran conjuntamente manosa y P_i, y se mantienen niveles de P_i en el citoplasma que permiten velocidades de fijación de CO₂ iguales a las de hojas control (*Tab. 4*), la NR sigue estando protegida contra la inactivación por oscuridad. Por tanto, el efecto protector de la manosa no se debe a la deficiencia en P_i, e interpretamos que es consecuencia de la acumulación de manosa 6-fosfato, un análogo estructural, escasamente metabolizable, de la glucosa 6-fosfato. En este caso, los resultados indican que la acumulación de una hexosa 6-fosfato es condición necesaria y suficiente para prevenir la inactivación de la NR por oscuridad o por inhibición de la fijación de CO₂.
- 7.- En hojas de plantas cultivadas con más de un 90% del nitrógeno total en forma de amonio y una pequeña proporción de nitrato, suficiente para inducir niveles de actividad NR similares a las plantas cultivadas con nitrato como única fuente de nitrógeno, la actividad NR foliar en condiciones de iluminación y fijación de CO₂ es similar a la de plantas control en oscuridad (*Tab. 6; Fig. 12*). Esto indica que el déficit en los niveles de carbohidratos de la hoja, producido como consecuencia del aumento de su translocación a la raíz para sustentar la asimilación predominante de amonio en este órgano (Lewis et al., 1986, 1987), da lugar a la inactivación reversible de la NR foliar aún en condiciones de fotosíntesis.

En conjunto, los resultados indican que la regulación postraduccional de la NR por luz y CO₂ está mediada por los niveles citoplasmáticos de productos de la fijación de CO₂, concretamente, por los niveles de hexosas 6-fosfato. La propuesta más simple es que la glucosa 6-fosfato actúe como señal reguladora. En iluminación, y en condiciones de fijación de CO₂, altos niveles de glucosa 6-fosfato en el citosol (Gerhardt et al., 1987) asegurarían la operatividad del sistema de activación de la NR. En la oscuridad el cese de la fijación de CO₂ y el aumento en la respiración, resulta en bajos niveles de glucosa 6-fosfato (Gerhardt et al., 1987), lo cual permitiría que la NR sea inactivada. Una situación similar se daría en hojas en iluminación incubadas en atmósfera sin CO₂ o tratadas con glicolaldehído. Si los niveles de glucosa 6-fosfato se incrementan artificialmente mediante el suministro de carbohidratos a la hoja (in vivo cualquier azúcar o azúcar-fosfato puede transformarse en glucosa 6-fosfato) la NR se mantendría activa en la oscuridad. Esta situación se puede simular mediante el suministro de manosa, que daría lugar a la acumulación del análogo estructural manosa 6-fosfato, la cual prevendría la inactivación de la NR por oscuridad o inhibición de la fijación de CO₂. Es interesante señalar que la sacarosa o la glucosa pueden reemplazar a la luz en la inducción de la síntesis de RNAm-NR en *Arabidopsis*, lo cual indica que los productos de la asimilación de carbono están también implicados en la activación por luz de la síntesis de la NR (Cheng et al., 1992; Lillo, 1994).

Así pues, proponemos que los niveles citoplasmáticos de glucosa 6-fosfato serían la señal reguladora que coordina la actividad NR foliar con la capacidad de fijación de CO₂ de la hoja. Sin embargo, el mecanismo molecular a través del cual pudiera ejercer este papel permanece sin dilucidar.

Los estudios realizados por otros autores en hojas de espinaca muestran que, tras el suministro de (³²P)P_i a la hoja, la NR se fosforila en residuos de Ser y el marcaje es más alto en condiciones experimentales que producen inactivación de la

NR que en condiciones en las que la actividad NR es alta (Huber et al., 1992). Sin embargo, en sistemas reconstituidos in vitro se ha observado que la NR de espinaca, fosforilada con ATP y proteína kinasa, es activa y se requiere la adición de NIP y Mg^{2+} para conseguir su inactivación (Mackintosh et al., 1995; Glaab y Kaiser, 1995; Bachmann et al., 1995), según el modelo resumido en el *Esquema 3* (pag. 24).

El hecho de que la microcistina, un inhibidor de PP2A, bloquee la reactivación de la NR de hojas de espinaca previamente inactivada tras un período de oscuridad, ha sido interpretado como evidencia de que es necesaria la defosforilación del enzima in vivo para que se produzca su reactivación (Mackintosh, 1992; Huber et al., 1992). En cebada, la microcistina también bloquea la reactivación de la NR por CO_2 tras un período de incubación en aire carente de CO_2 (*Fig. 7*), lo cual indica que el mecanismo de reactivación en ambos casos podría ser similar. Sin embargo, nuestros controles paralelos sobre la capacidad fotosintética de hojas de cebada muestran que el suministro de microcistina produce también una drástica y permanente inhibición de la fijación de CO_2 (*Fig. 8*), lo cual modifica el argumento anterior: independientemente de que las proteína fosfatasas estén inhibidas, también lo está la fijación de CO_2 , por lo que la sensibilidad a microcistina podría deberse a una suma de efectos, y de nuevo aparece una situación experimental en la que la inhibición de la fijación de CO_2 conlleva la inactivación de la NR.

Por otra parte, la NR extraída inactiva de hojas de espinaca en oscuridad se reactiva lentamente in vitro, y esta reactivación no ocurre en presencia de inhibidores de PP2A (Mackintosh, 1992), lo cual sugiere que la reactivación in vitro de la NR implica su defosforilación mediante proteína fosfatasas presentes en los extractos. La NR extraída de hojas de cebada en oscuridad se reactiva rápidamente en condiciones de ensayo (*Fig. 1*) pero, contrariamente a lo descrito en espinaca, dicha reactivación no es sensible a microcistina ni a ácido okadaico

(datos no mostrados). Por tanto, en cebada la reactivación in vitro de la NR no parece implicar defosforilación por proteína fosfatasa, aunque sería posible que se produjera por disociación de una proteína inactivadora similar al NIP. Otra evidencia en favor del mecanismo de fosforilación de la NR de espinaca es la inhibición in vitro por ATP en extractos crudos desalados pero no en el enzima purificado, que se ha interpretado sería una consecuencia de la fosforilación in vitro por proteína kinasa presentes en los extractos (Kaiser y Spill, 1991). Aunque nosotros hemos reproducido la inhibición in vitro de la NR de espinaca por ATP a baja concentración (*Figs. 17 y 18*), no hemos observado este efecto en la NR de cebada ensayada en las mismas condiciones (*Figs. 20 y 21*).

Por el momento, pues, no podemos extrapolar el mecanismo de modificación covalente reversible propuesto para la NR de espinaca a la NR de cebada. No obstante, los datos pueden interpretarse también dentro de la hipótesis del modelo de regulación de la NR de hojas de espinaca por fosforilación reversible (Kaiser y Spill, 1991; Kaiser et al., 1992; Huber et al., 1992). En este sentido, los niveles de azúcares-fosfato, y más concretamente, de glucosa 6-fosfato, podrían actuar como efectores positivos de la proteína fosfatasa implicada en la activación de la NR, o efectores negativos de la proteína kinasa implicada en su inactivación. Esta última posibilidad parece más consistente con los resultados obtenidos, ya que todas las condiciones experimentales que producen un aumento en los niveles de azúcares-fosfato en la hoja (*e. g.* suministro de manosa, P_i , glucosa o DHAP), dan lugar a protección de la NR contra la inactivación in vivo por oscuridad más que a una sobreactivación del enzima en iluminación. Además, en hojas de espinaca se han descrito proteína kinasa dependiente de Ca^{2+} , que fosforilan in vitro a la NR y que se inhiben por azúcares-fosfato (Bachman et al., 1995; McMichael et al., 1995). No obstante, hay una tercera posibilidad: la interacción directa de la glucosa 6-fosfato con la NR, que resultaría en una forma del enzima menos sensible al mecanismo de inactivación, sea por fosforilación o por interacción con una

proteína inactivadora. En condiciones de bajos niveles de glucosa 6-fosfato (oscuridad o inhibición de la fijación de CO₂) la NR sería susceptible de inactivación, mientras que en condiciones de altos niveles de glucosa 6-fosfato (fijación de CO₂ activa o suministro de carbohidratos a la hoja) ésta podría unirse a la NR produciendo una conformación del enzima menos sensible al mecanismo de inactivación.

Los estudios sobre modulación in vitro de la NR de cebada y espinaca descritos en el Apartado 3.2 aportan información relevante a este respecto. Aunque la NR foliar de ambos orígenes responde de forma similar a la luz y al CO₂, existen diferencias, como hemos visto, de sensibilidad in vitro a inhibidores de proteína fosfatasas y al ATP. Una de las diferencias más evidentes entre los dos enzimas es su sensibilidad a Mg²⁺. La NR extraída de hojas de cebada en oscuridad se detecta parcialmente inactivada en medios carentes de cationes divalentes e incluso en presencia de agentes quelantes (EDTA y/o P_i; *Figs. 3, 4 y 13; Tab. 7*). En cambio, la NR de hojas de espinaca en oscuridad sólo manifiesta inequívocamente su inactivación en presencia de Mg²⁺ o Ca²⁺, pero no en ausencia de cationes divalentes o en presencia de agentes quelantes, en cuyo caso la actividad NR es similar en extractos de hojas en iluminación o en oscuridad (*Fig. 14; Tab. 7*; Kaiser y Spill, 1991; Kaiser y Brendle-Behnisch, 1991; Kaiser et al., 1992; Huber et al., 1992). Es evidente, pues, que el mecanismo de inactivación in vivo que actúa sobre la NR de cebada no requiere Mg²⁺ para ser efectivo, mientras que el que actúa sobre la NR de espinaca requiere Mg²⁺ o Ca²⁺. No obstante, tanto la NR de cebada como la de espinaca se inhiben in vitro por iones Mg²⁺ (*Figs. 3, 13 y 14; Tab. 7*) o Ca²⁺ (*Fig. 3*; Kaiser y Brendle-Behnisch, 1991; Kaiser y Huber, 1994b) siendo más sensible a esta inhibición el enzima extraído de hojas en oscuridad. Por tanto, en la NR de hojas de cebada podemos distinguir dos inhibiciones aditivas: una inactivación por oscuridad in vivo, independiente de Mg²⁺, y una inhibición in vitro por iones Mg²⁺ que se superpone a la anterior. En

cambio, en la NR de hojas de espinaca, la inactivación in vivo es dependiente de Mg^{2+} y además en el enzima in vitro es más sensible que el de cebada a la inhibición por Mg^{2+} (*Tab. 7*).

El requerimiento por Mg^{2+} para que se manifieste la inactivación in vivo de la NR de espinaca se ha interpretado que derivaría de la necesidad del Mg^{2+} para la unión estable del NIP a la forma fosforilada de la NR (*Esquema 3*; pag. 24). Este complejo se disociaría espontáneamente en medios sin Mg^{2+} , produciéndose la reactivación del enzima (Mackintosh et al., 1995; Glaab y Kaiser, 1995). En el caso de la NR de cebada, cualquiera que sea el mecanismo de inactivación in vivo, no requiere la presencia de Mg^{2+} para manifestarse in vitro.

Por otra parte, independientemente de la inactivación in vivo por modificación covalente o unión estable a una proteína inactivante, ambos enzimas extraídos de hojas en iluminación o en oscuridad son además sensibles a inhibición por iones Mg^{2+} in vitro. Esta inhibición por Mg^{2+} podría tener significado fisiológico, ya que las concentraciones de Mg^{2+} en el citoplasma de la célula vegetal se encuentran en el orden de mM (Lillo, 1993) y pueden variar dependiendo de las condiciones fisiológicas. Significativamente, la adición de azúcares-fosfato o P_i al medio de ensayo de la NR protege al enzima contra la inhibición por Mg^{2+} (*Tabs. 8 - 11*). Esto es aplicable tanto a la NR de cebada como a la de espinaca, y la protección es relativamente más fuerte precisamente sobre la forma más sensible a la inhibición in vitro por Mg^{2+} , esto es, el enzima extraído de hojas en oscuridad.

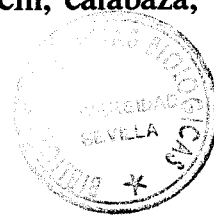
Así como in vivo, la glucosa protege a la NR contra la inactivación por oscuridad (*Tab. 3*), in vitro las hexosas o las triosas carecen de este efecto protector contra la inhibición por Mg^{2+} , requiriéndose la presencia de un grupo fosfato en la molécula de azúcar. Aunque una variedad de azúcares-fosfato

producen protección frente a la inhibición in vitro por Mg^{2+} de la NR, la glucosa 6-fosfato es significativamente más efectiva que otros azúcares-fosfato ensayados.

Para analizar si la protección por glucosa 6-fosfato contra la inhibición por Mg^{2+} de la NR se debe a una interacción con el enzima o a una interacción con el Mg^{2+} libre, quelándolo, se han comparado los efectos de la glucosa 6-fosfato y el P_i sobre el enzima en función de las concentraciones libres de Mg^{2+} calculadas a partir de las constantes de estabilidad de los respectivos complejos, $[Mg^{2+}$ -glucosa 6-fosfato] y $[Mg^{2+}$ - P_i] (Figs. 15 y 16). Nuestros resultados ponen de manifiesto que la protección del P_i frente a la inhibición in vitro por Mg^{2+} de la NR se podría ejercer, mayoritariamente, a través de su efecto quelante sobre el Mg^{2+} , mientras que en el caso de la glucosa 6-fosfato, su efecto activador, que para una misma concentración de Mg^{2+} libre es mucho más fuerte que el ejercido por el P_i , se puede deber a una interacción directa con el enzima, produciendo una conformación con menor sensibilidad a la inhibición por Mg^{2+} . Una propuesta similar se ha sugerido para la PEPC purificada de hojas de sorgo, en la que la presencia de glucosa 6-fosfato disminuye la sensibilidad del enzima a la inhibición por L-malato (Echevarría et al., 1994).

El estudio comparado de la modulación de la NR foliar de diversos orígenes (Apartado 3.3), nos ha permitido corroborar las similitudes y diferencias ya establecidas entre la modulación de la NR de hojas de cebada y de espinaca in vivo e in vitro.

Los datos permiten agrupar a las especies estudiadas en dos tipos bien definidos, que se diferencian claramente en la dependencia por Mg^{2+} de la inactivación in vivo de la NR y en la sensibilidad del enzima a la inhibición por Mg^{2+} in vitro. Al primer grupo pertenecen la NR de maíz, remolacha y guisante, que tiene un comportamiento similar al enzima de cebada. En el segundo grupo se clasifican las NR extraídas de hojas de pepino, acelga, soja, calabacín, calabaza,



melón y tabaco, que se comportan como el enzima de espinaca, puesto que la manifestación de su inactivación in vivo en oscuridad depende esencialmente de la presencia de Mg^{2+} y, una vez extraídos, muestran una alta sensibilidad a la inhibición por Mg^{2+} in vitro.

Estos datos indican que en el marco de un patrón general de modulación de la actividad NR por modificación covalente del enzima, existen diferencias interespecíficas en el mecanismo concreto de regulación del mismo.

Por otro lado, el hecho de que en todas las especies estudiadas se manifieste la protección por glucosa 6-fosfato frente a la inhibición por Mg^{2+} de la NR, reafirma nuestra propuesta sobre la acción de la misma como efector positivo de la NR foliar, con un papel esencial en la regulación postraduccional del enzima.

La acción positiva de los azúcares-fosfato, concretamente de la glucosa 6-fosfato, sobre la NR se manifiesta pues a dos niveles: in vivo protegiendo al enzima contra la inactivación en situaciones de limitación de la capacidad de fijación de CO_2 , e in vitro, protegiendo al enzima frente a la inhibición por iones Mg^{2+} . Esta doble acción podría ser el reflejo de un mecanismo fisiológico de control en el que la glucosa 6-fosfato interaccionaría con la NR produciendo una conformación del enzima resistente al mecanismo de inactivación por modificación covalente o por unión estable a una proteína inactivadora, al mismo tiempo que haciéndola menos sensible a la inhibición por iones Mg^{2+} . En condiciones de altas velocidades de fijación de CO_2 y altos niveles de hexosas 6-fosfato, la NR estaría en su forma más activa; tasas menores de fotosíntesis, que producirían niveles más bajos de glucosa 6-fosfato, harían a la NR más susceptible de inactivación e inhibición por Mg^{2+} , adecuando de esta forma la velocidad de asimilación de nitrato a la de fijación de CO_2 , y durante los períodos de oscuridad, sin fijación de CO_2 y con una respiración activa, los niveles de hexosas 6-fosfato serían aún más

bajos, y el enzima estaría en una forma más sensible a la inactivación e inhibición por el Mg^{2+} citoplasmático.

El control por carbono de la actividad NR foliar proporcionaría una conexión regulatoria entre los procesos asimilatorios mayoritarios del metabolismo fotosintético, que aseguraría la asimilación equilibrada de ambos bioelementos.

V. CONCLUSIONES

- 1.- Los estudios de modulación in vivo de la NR foliar de cebada indican que la dependencia por luz y por CO₂ de la actividad NR se debe a la operación de un sistema de control que determina el grado de actividad del enzima en función de la capacidad de fijación de CO₂ de la hoja.

- 2.- Los resultados obtenidos indican que la regulación postraducciona de la NR por luz y CO₂ está mediada por los niveles citoplasmáticos de hexosafosfato, concretamente de glucosa 6-fosfato, que actuaría como señal reguladora en la coordinación entre actividad NR y capacidad fotosintética de la hoja.

- 3.- El mecanismo de inactivación in vivo por limitación de la fijación de CO₂ de la NR foliar de cebada (y de especies agrupadas en este trabajo en el Tipo I) es independiente de Mg²⁺, mientras que el que opera sobre la NR de espinaca (y especies agrupadas en el Tipo II) requiere Mg²⁺ para ser efectivo. Adicionalmente, la NR foliar de todas las especies ensayadas se inhibe in vitro por iones Mg²⁺, siendo más sensible a esta inhibición el enzima extraído de hojas en oscuridad. Esta inhibición podría tener significado fisiológico puesto que se observa a concentraciones del ion similares a las que existen en el citoplasma.

- 4.- Los azúcares-fosfato, especialmente la glucosa 6-fosfato, protegen a la NR de la inactivación in vivo, por limitación de la fijación de CO₂, y de la inhibición in vitro por iones Mg²⁺.

5.- En conjunto, los resultados permiten proponer un modelo de control por carbono de la asimilación de nitrato. En condiciones de fijación activa de CO_2 , con altos niveles de hexosas-fosfato, la glucosa 6-fosfato interaccionaría con la NR produciendo una conformación resistente tanto al sistema de inactivación por modificación covalente y/o unión estable a una proteína inactivadora, como a la inhibición por iones Mg^{2+} . En condiciones de oscuridad o carencia de CO_2 , la NR pasaría a una forma más sensible a la inactivación y a la inhibición por Mg^{2+} .

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Andrews M** (1986) The partitioning of nitrate assimilation between roots and shoots of higher plants. *Plant Cell Environ.* 9: 511-519
- Aparicio PJ, Baladin T, Mauriño SG, Maldonado JM** (1985) Photoregulation of nitrate utilization in green algae and higher plants. *Photochem. Photobiol.* 42: 765-770
- Aparicio PJ, Quiñones MA** (1991) Blue light, a positive switch signal for nitrate and nitrite uptake by green algae *Monoraphidium braunii*. *Plant Physiol.* 95: 374-378
- Aparicio PJ, Roldan JM, Calero F** (1976) Blue light photoreactivation of nitrate reductase from algae and higher plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 70: 1071-1077
- Aryan AP, Batt RG, Wallace W** (1983) Reversible inactivation of nitrate reductase by NADH and the occurrence of partially inactive enzyme in wheat leaf. *Plant Physiol.* 71: 582-587
- Aslam M, Travis RL, Huffaker RC** (1992) Comparative kinetics and reciprocal inhibition of nitrate and nitrite uptake in roots of uninduced and induced barley seedling. *Plant Physiol.* 99: 1124-1133
- Bachmann M, McMichael RJr, Huber JL, Kaiser WM, Huber SC** (1995) Partial purification of a calcium-depend protein kinase and inhibitor protein required for inactivation of spinach leaf nitrate reductase. *Plant Physiol.* 108: 1083-1091
- Bachmann M, Shiraishi N, Campbell WH, Yoo B-C, Harmon AC, Huber SC** (1996) Identification of Ser-543 as the major regulatory phosphorylation site in spinach leaf nitrate reductase. *Plant Cell* 8: 505-517
- Becker TW, Foyer C, Caboche M** (1992) Light-regulated expression of nitrate reductase and nitrite reductase genes in tomato and in the phytochrome-deficient aurea mutant of tomato. *Planta* 188: 39-47
- Beevers L, Hageman RH** (1980) Nitrate and nitrite reduction. En: *The Biochemistry of Plants*, vol. 5, (B. J. Mifflin, ed.), Academic Press, New York, pp. 115-168

- Bergareche C, Ayuso R, Masgrau C, Simón E (1994)** Nitrate reductase in cotyledons of cucumber seedlings as affected by nitrate, phytochrome and calcium. *Physiol. Plant.* 91: 257-262
- Bowsher CG, Emes MJ, Cammack R, Hucklesby DP (1988)** Purification and properties of nitrite reductase from maize roots of pea (*Pisum sativum* cv. Meteor). *Planta* 175: 334-340
- Bowen HJM (1966)** Trace Elements in Biochemistry. Academic Press, London
- Bradford MM (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
- Burns RC, Hardy RWF (1975)** Nitrogen Fixation in Bacteria and Higher Plants. Springer, Berlín
- Caboche M, Rouzé P (1990)** Nitrate reductase: a target for molecular and cellular studies in higher plants. *Trends Genet.* 6: 187-192
- Callaci JJ, Smarrelli J (1991)** Regulation of inducible nitrate reductase isoform from soybean. *Biochem. Biophys. Acta* 1088: 127-130
- Campbell WH, Kinghorn JR (1990)** Functional domains of assimilatory nitrate reductases and nitrite reductases. *Trends Biochem. Sci.* 15: 315-319
- Campbell WH (1988)** Nitrate reductase and its role in nitrate assimilation in higher plants. *Physiol Plant.* 74: 214-219
- Champigny ML (1995)** Integration of photosynthetic carbon and nitrogen metabolism in higher plants. *Photosynthesis Research* 46: 117-127
- Cheng CL, Acedo GN, Cristinsin M, Conkling MA (1992)** Sucrose mimics the light induction of *Arabidopsis* nitrate reductase gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1861-1864
- Crawford NM (1995)** Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell* 7: 859-868
- Crawford NM, Smith M, Bellissimo D, Davis RW (1988)** Sequence and nitrate regulation of the *Arabidopsis thaliana* mRNA encoding nitrate reductase, a

metalloflavoprotein with three functional domains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5006-5010

Dailey MJ, Kuo T, Warner RL (1982a) Piridin nucleotide specificity of barley nitrate reductase. Plant Physiol. 69: 1196-1199

Dailey MJ, Warner RL, Somers DA, Kleinhofs A (1982b) Characteristic of a nitrate reductase in a mutant deficient in NADH nitrate reductase. Plant Physiol. 62: 1200-1204

Daniel-Vedèle F, Dorbe MF, Caboche M, Rouzé P (1989) Cloning and analysis of nitrate reductase gene from tomato: a comparison of nitrate reductase protein sequence in higher plants. Gene 85: 371-380

Dawson RMC, Elliot DC, Elliot WH, Jones KM (1969) Data for Biochemical Research. Oxford University Press, Oxford

de Cires A, de la Torre A, Delgado B, Lara C (1993) Role of light and CO₂ fixation in the control of nitrate reductase activity in barley leaves. Planta 190: 277-283

de Cires A, de la Torre A, Lara C (1993) Involvement of CO₂ fixation products in the light-dark modulation of nitrate reductase activity in barley leaves. Physiol. Plant. 89: 577-581

De La Torre, Delgado B, Lara C (1991) Nitrate-dependent O₂ evolution in intact leaves. Plant Physiol. 96: 898-901

Delgado B (1995) Influencia de la Asimilación de Nitrógeno y el Estrés Salino sobre la Capacidad Fotosintética en Cebada. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, Sevilla

Delieu TJ, Walker DA (1983) Simultaneous measurements of oxygen evolution and chlorophyll fluorescence from leaf pieces. Plant Physiol. 73: 534-541

Deng MD, Moreaux T, Cherel I, Boutin JP, Caboche M (1991) Effects of nitrogen metabolites on the regulation of circadian expression of tobacco nitrate reductase. Plant Physiol. Biochem. 29: 239-249

Deng MD, Moreaux T, Leydecker M, Caboche M (1990) Nitrate reductase expression is under the control of circadian rhythm and is light inducible in *Nicotiana tabacum* leaves. Planta 180: 257-261

- Deng MD, Faure JD, Caboche M (1993)** The molecular aspects of nitrate and nitrite reductase expression in higher plants. En: Control of Plant Gene Expression, (D. P. S. Verma, ed.), CRC Press Inc., Salem, pp. 425-439
- Duggleby RG, Dennis DT (1970)** Nicotinamide adenine dinucleotide-specific isocitrate dehydrogenase from a higher plant. *J. Biol. Chem.* 245: 3745-3750
- Ebbighausen H, Chen J, Heldt HW (1985)** Oxalacetate translocator in plant mitochondria. *Biochem. Biophys. Acta* 810: 184-199
- Echevarría C, Mauriño SG, Maldonado JM (1984)** Reversible inactivation of maize leaf nitrate reductase. *Phytochemistry* 23: 2155-2158
- Echevarría C, Pacquit V, Bakrim N, Osuna L, Delgado B, Arrio-Dupont M, Vidal J (1994)** The effect of pH on the covalent metabolic control of C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase from *Sorghum* leaf. *Arch. Biochem. Biophys.* 315: 425-430
- Evans HJ, Nason A (1953)** Pyridine nucleotide nitrate reductase from extract of higher plants. *Plant Physiol.* 28: 233-254
- Gabard J, Pelsy F, Marion-Poll AM, Saalbach I, Grafe R, Müller AJ (1988)** Genetic analysis of nitrate reductase deficient mutants *N. Plumbaginifolia*: evidence for six complementation groups among 70 classified molybdenum cofactor deficient mutants. *Mol. Gen. Genet.* 213: 206-217
- Gabard J, Marion-Poll AM, Cherel I, Mayer C, Müller AJ, Caboche M (1987)** Isolation and characterization of *N. Plumbaginifolia* nitrate reductase deficient mutants: genetic and biochemical analysis of the *nia* complementation groups. *Mol. Gen. Genet.* 209: 596-605
- Galangua F, Daniel-Vedele F, Maureaux T, Dorbe MF, Leydeker MT, Caboche M (1988)** Expression of nitrate reductase genes from tomato and tobacco in relation to dark-light regimes and nitrate supply. *Plant Physiol.* 88: 383-388
- Gerhardt R, Stitt M, Heldt H (1987)** Subcellular metabolite levels in spinach leaves. *Plant Physiol.* 83: 399-407

- Glaab J, Kaiser WM (1995)** Inactivation of nitrate reductase involves NR-protein phosphorylation and subsequent "binding" of an inhibitor protein. *Planta* 195: 514-518.
- Glass ADM, Sidiqi MY (1995)** Nitrogen absorption by plants. En: Nitrogen Nutrition in Higher plants, (H. S. Srivastava, R. P. Singh, eds.), Associated Publishing Co., New Delhi, pp. 21-56
- Gowri G, Campbell WH (1989)** cDNA clones for corn leaf NADH:Nitrate reductase and Chloroplast NAD(P)⁺: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *Plant Physiol.* 90: 792-798
- Gowri, G, Kenis JD, Ingemarsson B, Redinbaugh MG, Campbell WH (1992)** Nitrate reductase transcript is expressed in the primary response of maize to environmental nitrate. *Plant Mol. Biol.* 18: 55-64
- Guerrero MG, Vega JM, Losada M (1981)** The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 32: 168-202
- Hamat HB, Kleinhofs A, Warner RL (1989)** Nitrate reductase induction and molecular characterization in rice (*Oriza sativa* L.). *Mol. Gen. Genet.* 218: 93-98
- Heat OVS (1977)** La Estadística en la Investigación Experimental. Ediciones Omega S. A., Barcelona
- Heineke D, Riens B, Grosse H, Hoferichter P, Peter U, Flüge UI, Heldt HW (1991)** Redox transfer across the inner chloroplast envelope membrane. *Plant Physiol.* 95: 1131-1137
- Herold A, Lewis DH (1977)** Mannose and green plants: occurrence, physiology and metabolism, and use as a tool to study the role of orthophosphate. *New Phytol.* 79: 1-40
- Herold A, Lewis DH, Walker DA (1976)** Sequestration of cytoplasmic orthophosphate by mannose and its differential effect on photosynthetic starch synthesis in C₃ and C₄ species. *New Phytol.* 76: 397-407
- Hewitt, EJ (1966)** Sand and Water Culture Methods Used in the Study of Plant Nutrition. (2nd ed.), Tech. Commun. No. 22, Commonwealth Agricultural Bureaux of Hort., Farnham Royal, Maidstone

- Huber SC, Bickett M (1984)** Evidence of control of carbon partitioning by fructose 2,6-bisphosphate in spinach leaves. *Plant Physiol.* 74: 445-447
- Huber JL, Huber SC, Campbell WH, Redinbaugh MG (1992)** Reversible light/dark modulation of spinach leaf nitrate reductase activity involves protein phosphorylation. *Arch. Biochem. Biophys.* 296: 58-65
- Huber JL, Redinbaugh MG, Huber SC, Campbell H (1994)** Regulation of maize leaf nitrate reductase activity involves both gene expression and protein phosphorylation. *Plant Physiol.* 106: 1667-1674
- Ip SM, Kerr J, IngledeW WJ, Wray JL (1990)** Purification and characterization of barley leaf nitrite reductase. *Plant Sci.* 66: 155-65
- Jackson WA, Volk JR, Israel DW (1980)** Energy supply and nitrate assimilation in root systems. En: *Carbon-Nitrogen Interactions in Crop Production*, (A. Tanaka, ed.), The Japan Society for Promotion of Science, Tokyo, pp. 25-40
- Kaiser WM, Brendle-Behnisch E (1991)** Rapid modulation of spinach leaf nitrate reductase by photosynthesis. I. Modulation in vivo by CO₂ availability. *Plant Physiol.* 96: 363-367
- Kaiser WM, Brendle-Behnisch E (1995)** Acid-base modulation of nitrate reductase in leaf tissues. *Planta* 196: 1-6
- Kaiser WM, Föster J (1989)** Low CO₂ prevents nitrate reduction in leaves. *Plant Physiol.* 91: 970-974
- Kaiser WM, Huber CH (1994a)** Posttranslational regulation of nitrate reductase in higher plants. *Plant Physiol.* 106: 817-821
- Kaiser WM, Huber SC (1994b)** Modulation of nitrate reductase in vivo: Effects of phosphoprotein phosphatase inhibitors, free Mg²⁺ and 5'-AMP. *Planta* 193: 358-364
- Kaiser WM, Spill D (1991)** Rapid modulation of spinach leaf nitrate reductase by photosynthesis. II. In vitro modulation by ATP and AMP. *Plant Physiol.* 96: 368-375

- Kaiser WM, Spill D, Brendle-Behnisch E (1992)** Adenine nucleotides are apparently involved in the light-dark modulation of spinach-leaf nitrate reductase. *Planta* 186: 236-240
- Kaiser WM, Spill D, Glaab J (1993)** Rapid modulation of nitrate reductase in leaves and roots: Indirect evidence for the involvement of protein phosphorylation/dephosphorylation. *Physiol. Plant.* 89: 557-562
- Kamachi K, Amemiya Y, Ogura N, Nakagawa H (1987)** Immuno-gold localization of nitrate reductase in spinach (*Spinacia oleracea*) leaves. *Plant Cell Physiol.* 28: 333-338
- Kende H, Hahn H, Kays SE (1971)** Enhancement of nitrate reductase activity by benzyladenine in *Agrostema githago*. *Plant Physiol.* 48: 702-706
- Kleinhofs A, Warner RL (1992)** Molecular analysis of nitrate metabolism. En: Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology, (P. R. Shewry, ed.), Commonwealth Agricultural Bureaux-International, Wallingford, pp. 209-229
- Kojima M, Wu SJ, Sugimoto T, Nanmori T, Oji Y (1994)** Phosphorylation/dephosphorylation of komatsuna (*Brassica campestris*) leaf nitrate reductase in vivo and in vitro in response to environmental light conditions: Effects of protein kinase and protein phosphatase inhibitors. *Physiol. Plant.* 93: 139-145
- Krause GH (1977)** Light-induced movement of magnesium ions in intact chloroplasts. Spectronic determination with eriochrome blue SE. *Biochem. Biophys. Acta* 460: 500-510
- Kuo T, Kleinhofs A, Warner RL (1980)** Purification and partial characterization of nitrate reductase from barley leaves. *Plant Sci. Lett.* 17: 371-381
- Kuo T, Kleinhofs A, Somers D, Warner RL (1981)** Antigenicity of nitrate reductase from barley leaves in *Hordeum vulgare* L. *Mol. Gen. Genet.* 181: 20-23
- LaBrie ST, Crawford NM (1994)** A glycine to aspartic acid change in the MoCo domain of nitrate reductase reduces both activity and phosphorylation levels in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 269: 14497-14501

- Legendorfer RL, Watters MT, Smarrelli J Jr (1988)** Metabolic control of squash nitrate reductase. *Plant Sci.* 57: 119-125
- Lara C (1992)** Photosynthetic Nitrate assimilation: Interaction with CO₂ fixation. En: *Trends in Photosynthesis Research*, (J. Barber, M. G. Guerrero, H. Medrano, eds.), Intercept Ltd., Hampshire, pp. 195-208
- Lara C, Rodríguez R, Guerrero MG (1993)** Nitrate transport in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Physiol. Plant.* 89: 582-587
- Lea PJ, Blackwell RD, Joy KW (1992)** Ammonia assimilation in higher plants. En: *Nitrogen Metabolism of Plants*, (K. Mengel, D.J. Pilbeam, eds.), Oxford Science Publications, Oxford, pp. 153-186
- Lea PJ, Mifflin BJ (1974)** An alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature* 256: 614-616
- Leegood CR (1989)** Biochemical studies of photosynthesis: from CO₂ to sucrose. En: *Plant Biology*, vol. 8, Photosynthesis, (W. R. Briggs, ed.), Alan R. Liss Inc., New York, pp. 457-473
- Lewis, OAM, Fulton, B, Zelewski, AAA (1987)** Differential distribution of carbon in response to nitrate, ammonium and nitrate+ammonium nutrition in wheat. En: *Inorganic Nitrogen Metabolism*, (P. J. Syrett, W. R. Ullrich, P. J. Aparicio, F. Castillo, eds.), Spring-Verlang, New York, pp. 240-246
- Lewis OAM, Soares MIN, Lips SH (1986)** A photosynthetic and ¹⁵N investigation of the differential growth response of barley to nitrate, ammonium and nitrate+ammonium nutrition. En: *Fundamental, Ecological and Agricultural Aspects of Nitrogen Metabolism in Higher Plants*, (H. Lambers, J. J. Neeteson, I. Stulen, eds.), M. Nijhoff Publ., Dordrecht, pp. 295-300
- Li XZ, Oaks A (1993)** Induction and turnover of nitrate reductase in *Zea mays*. *Plant Physiol.* 106: 1145-1149
- Lillo C (1991)** Diurnal variations of corn leaf nitrate reductase: an experimental distinction between transcriptional and post-translational control. *Plant Sci.* 73: 149-154

- Lillo C** (1993) Magnesium and calcium inhibition of squash NADH nitrate reductase. *Plant Cell Physiol.* 34: 1181-1185
- Lillo C** (1994) Light regulation of nitrate reductase in green leaves of higher plants. *Physiol. Plant.* 90: 616-620
- Lorimer GA, Gewitz HS, Völker W, Solomonson LP, Vennesland B** (1974) The presence of bound cyanide in the naturally inactivated form of nitrate reductase of *Chlorella vulgaris*. *J. Biol. Chem.* 246: 6074-6076
- Losada M, Guerrero MG, Vega JM** (1981) The assimilatory reduction of nitrate. En: *Biology of Inorganic Nitrogen and Sulfur*, (H. Bothe, A. Trebst eds.) Springer, Berlin, pp. 30-36
- Lu J-L, Ertl JR, Chen Ch-M** (1992) Transcriptional regulation of nitrate reductase mRNA levels by cytokinin-abscisic acid interactions in etiolated barley leaves. *Plant Physiol.* 98: 1255-1260
- MacKintosh C** (1992) Regulation of spinach-leaf nitrate reductase by reversible phosphorylation. *Biochem. Biophys. Acta* 1137: 121-126
- MacKintosh C, Douglas P, Lillo C** (1995) Identification of a protein that inhibits the phosphorylated form of nitrate reductase from spinach (*Spinacea oleracea*) leaves. *Plant Physiol.* 107: 451-457
- Maldonado JM, Notton BA, Hewitt EJ** (1980) The reactivation of nitrate reductase of spinach (*Spinacea oleracea* L.) inactivated by NADH and cyanide, using trivalent manganese either generated by illuminated chloroplasts or as manganipyrophosphate. *Planta* 150: 242-248
- Mauriño SG, Vargas MA, Aparicio PJ, Maldonado JM** (1983) Blue-light reactivation of spinach nitrate reductase inactivated by acetylene or cyanide. Effects of flavins and oxygen. *Physiol. Plant.* 57: 411-416
- McClure PR, Kochian LV, Spanswick RM, Saff JE** (1990) Evidence for cotransport of nitrate and protons in maize roots. I. Effects of nitrate on the membrane potential. *Plant Physiol.* 93: 281-289
- McMichael RW Jr, Bacmann M, Huber SC** (1995) Spinach leaf sucrose-phosphate synthase and nitrate reductase are phosphorylated/inactivated by multiple protein kinase in vitro. *Plant Physiol.* 108: 1077-1082

- Melzer JM, Kleinhofs A, Warner RL (1989)** Nitrate reductase regulation: effects of nitrate and light on nitrate reductase mRNA accumulation. *Mol. Gen. Genet.* 217: 341-346
- Merlo L, Ferretti M, Passera C, Ghisi R (1995)** Light-modulation of nitrate reductase activity in leaves and roots of maize. *Physiol. Plant.* 94: 305-311
- Meyerhoff PA, Fox TC, Travis RL, Huffaker RC (1994)** Characterization of the association of nitrate reductase with barley (*Hordeum vulgare* L.) root membranes. *Physiol. Plant.* 104: 925-936
- Miller AG, Canvin DT (1989)** Glycolaldehyde inhibits CO₂ fixation in the cyanobacterium *Synechococcus* UTEX 625 without inhibiting the accumulation of inorganic carbon or associated quenching of chlorophyll *a* fluorescence. *Plant Physiol.* 91: 1044-1049
- Morrison JF (1979)** Approaches to kinetic studies on metal-activated enzymes. *Methods Enzymol.* 69: 257-294
- Nussaume L, Vicentz M, Meyer C, Boutin JP, Caboche M (1995)** Post-transcriptional regulation of nitrate reductase by light is abolished by a N-terminal deletion. *Plant Cell* 7: 611-621
- Oaks A (1992)** A re-evaluation of nitrogen assimilation in roots. *Bioscience* 42: 103-111
- Oaks A, Hirel B (1985)** Nitrogen metabolism in roots. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36: 345-365
- Oaks A, Poulle M, Goodfellow VJ, Class A, Deising H (1988)** The role of nitrate and ammonium and light on the induction of nitrate reductase in maize leaves. *Plant Physiol.* 88: 1067-1072
- Oelmüller R, Schuster C, Mohr H (1988)** Physiological characterization of a plastidic factor for nitrate-induced appearance of nitrate and nitrite reductase. *Planta* 174: 75-83
- Oelmüller R, Briggs WR (1990)** Intact plastids are required for nitrate- and light-induced accumulation of nitrate reductase activity and mRNA in squash cotyledons. *Plant Physiol.* 92: 434-439



- Oji Y, Hamano T, Ryoma Y, Miki Y, Wakiuchi N, Okamoto S (1985)** Purification and characterization of NADH-nitrate reductase from leaves of 2-row barley, and its activity as affected by some metabolites. *J. Plant Physiol.* 119: 247-256
- O'Sullivan WJ, Smithers WG (1979)** Stability constants for biologically important metal-ligand complexes. *Methods Enzymol.* 63: 294-336
- Pace GM, Volk RJ, Jackson WA (1990)** Nitrate reduction in response to CO₂ limited photosynthesis. *Plant Physiol.* 92: 286-292
- Palacian E, De La Rosa F, Castillo F, Gómez-Moreno C (1974)** Nitrate reductase from *Spinacea oleracea*. Reversible inactivation by NAD(P)H and by thiols. *Arch. Biochem. Biophys.* 161: 441-447
- Parker RE (1981)** Estadística para Biólogos. Ediciones Omega S. A., Barcelona
- Pistorius EK, Gewitz HS, Voss H, Vennesland B (1976)** Reversible inactivation of nitrate reductase in *Chlorella vulgaris* in vivo. *Planta* 128: 73-80
- Portis AR, Heldt HW (1976)** Light-dependent changes of Mg²⁺ concentration in the stroma in relation to the Mg²⁺-dependency of CO₂ fixation in intact chloroplasts. *Biochem. Biophys. Acta* 449: 434-446
- Pouteau S, ChereI I, Vaucheret H, Caboche M (1989)** Nitrate reductase mRNA regulation in *N. plumbaginifolia* nitrate reductase deficient mutants. *Plant Cell* 1: 1110-1115
- Rajasekhar VK, Gowri G, Campbell WH (1988)** Phytochrome-mediated light regulation of nitrate reductase expresion in squash cotyledons. *Plant Physiol.* 88:240-244
- Redinbaugh MG, Campbell WH (1981)** Purification and characterization of NAD(P)H:nitrate reductase and NADH:nitrate reductase from corn roots. *Plant Physiol.* 68: 115-120
- Remmler JL, Campbell WH (1986)** Regulation of corn leaf nitrate reductase. II. Synthesis and turnover of the enzyme's activity and protein. *Plant Physiol.* 80: 442-447

- Riens B, Held HW (1992)** Decrease in nitrate reductase activity in spinach leaves during a light-dark transient. *Plant Physiol.* 98: 573-577
- Rodríguez-Sotes R, Muñoz-Clares RA (1990)** Kinetic evidence of the existence of a regulatory phosphoenolpyruvate binding site in maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *Arch. Biochem. Biophys.* 279: 180-190
- Roldán JM, Romero F, López-Ruiz A, Díez J, Verleben JP (1987)** Immunological approaches to inorganic nitrogen metabolism. En: *Inorganic Nitrogen Metabolism*, (W. R. Ullrich, P. J. Aparicio, P. J. Syrett, F. Castillo, eds.), Spring-Verlag, Berlín, pp. 94-98
- Schmerder B, Borris H (1986)** Induction of nitrate reductase by cytokinin and ethylene in *Agrostema githago* L. embryos. *Planta* 169: 589-593
- Seeman JR, Berry JA, Freas SM, Krump MA (1985)** Regulation of ribulose biphosphate carboxylase activity in vivo by a light-modulated inhibitor of catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 8024-8028
- Sicher RC (1984)** Glycolaldehyde inhibition of photosynthetic carbon assimilation by isolated chloroplasts and protoplasts. En: *Advances in Photosynthesis Research*, vol. 3, (C. Sybesma, ed.), M. Nijhoff/Dr W. Junk Publ., The Hage, pp. 413-416
- Siddiqi MY, Glass DM, Ruth TJ, Rufty TW (1990)** Studies of the uptake of nitrate in barley. I. Kinetics of $^{13}\text{NO}_3^-$ influx. *Plant Physiol.* 93: 1426-1432
- Sivak MN, Walker DA (1986)** Photosynthesis in vivo can be limited by phosphate supply. *New Phytol.* 102: 499-512
- Smarrelli J, Malone MJ, Watters MT, Curtis LT (1987)** Transcriptional control of the inducible nitrate reductase isoform of soybean. *Biochem. Biophys. Res. Common.* 146: 1160-1165
- Snell FD, Snell CT (1949)** *Colorimetric Methods of Analysis*. (3rd ed.), vol. 2, D Van Nostrand Company Inc., New Jersey, pp. 802-807
- Solomonson LP (1974)** Regulation of nitrate reductase activity by NADH and cyanide. *Biochem. Biophys. Acta* 334: 297-308

- Solomonson LP, Barber MJ (1990)** Assimilatory nitrate reductase: Functional properties and regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 225-253
- Solomonson LP, Barber MJ, Howard WD, Jhonson JL, Rajagopalan KV (1984)** Electron paramagnetic resonance studies of the molybdenum center of assimilatory NADH:nitrate reductase from *Chlorella vulgaris*. *J. Biol. Chem.* 259: 849-853
- Solomonson LP, Vennesland B (1972)** Properties of nitrate reductase of *Chlorella*. *Biochem. Biophys. Acta* 75: 276-278
- Somers DA, Kuo TM, Kleinhofs A, Warner RL, Oaks A (1983)** Synthesis and degradation of barley nitrate reductase. *Plant Physiol.* 72: 949-952
- Spill D, Kaiser WM (1994)** Partial purification of two proteins (100 KDa and 67 KDa) cooperating in the ATP-dependent inactivation of spinach leaf nitrate reductase. *Planta* 192: 183-188
- Storer AC, Cornish-Bowden A (1976)** Concentration of $MgATP^{2-}$ and other ions in solutions. Calculation of the true concentrations of species present in mixtures of associating ions. *Biochem J.* 159: 1-5
- Suzuky A, Oaks A, Jacquot JP, Vidal J, Gadal P (1985)** An electron transport system in maize roots for reactions of glutamine synthase and nitrite reductase. *Plant Physiol.* 78: 374-378
- Ullrich WR (1992)** Transport of nitrate and ammonium through plant membrane. In: *Nitrogen Metabolism in Plants*, (K. Mengel, D. J. Mengel, eds.), Oxford University Press, New York, pp. 121-138
- Vargas MA, Mauriño SG, Maldonado JM (1987)** Flavin-mediated photoinactivation of spinach leaf nitrate reductase involving superoxide radical and activating effect of hydrogen peroxide. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol* 1: 195-201
- Vaughn KC, Campbell WH (1988)** Immunogold localization of nitrate reductase in maize leaves. *Plant Physiol.* 88: 1354-1357
- Vennesland B, Jetschman K (1971)** The nitrate reductase of *Chlorella vulgaris*. *Biochem. Biophys. Acta* 227: 544-577

- Vicentz M, Caboche M (1991)** Constitutive expression of nitrate reductase allows normal growth and development of *Nicotiana plumbaginifolia* plants. EMBO J. 10: 1027-1035
- Vincentz M, Moreaux T, Leydeke M, Vaucheret H, Caboche M (1993)** Regulation of nitrate reductase and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* by nitrogen and carbon metabolites. Plant J. 3: 315-324
- von Caemmerer S, Farquhar GD (1981)** Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. Planta 153: 376-387
- Walker D (1988)** The Use of Oxygen Electrode and Fluorescence Probes in Simple Measurements of Photosynthesis. University of Sheffield, Oxgraphics Ltd., Sheffield
- Walker DA, Osmond CB (1986)** Measurements of photosynthesis in vivo with a leaf disc electrode: correlations between light dependence of steady-state photosynthesis O₂ evolution and chlorophyll a fluorescence transients. Proc. R. Soc. London B. 227: 267-280
- Wallsgrave RM, Lea PJ, Miflin BJ (1979)** Distribution of the enzymes of nitrogen assimilation within pea leaf cell. Plant Physiol. 63: 232-236
- Wallsgrave RM, Lea PJ, Miflin BJ (1982)** The development of NAD(P)H-dependent and ferredoxin-dependent glutamate synthase in greening barley and pea leaves. Planta 154: 473-476
- Ward MR, Grimes HD, Huffaker RC (1989)** Latent nitrate reductase activity is associated with the plasma membrane of corn root. Planta 177: 470-485
- Ward MR, Tischner R, Huffaker RC (1988)** Inhibition of nitrate transport by anti-nitrate reductase IgG fragments and the identification of plasma membrane associated nitrate reductase in roots of barley seedling. Plant Physiol. 88: 1141-1145
- Warner RL, Narayanan KR, Kleinhofs A (1987)** Inheritance and expression of NAD(P)H nitrate reductase in barley. Theor. Appl. Genet. 74: 714-725

- Wray J (1989)** Molecular and genetic aspects of nitrate reduction in higher plants. En: *Molecular and Genetic Aspects of Nitrate Assimilation*, (J Wray, J Kinghorn, eds.), Oxford Publications, Oxford, pp. 244-262
- Wirtz W, Stitt M, Heldt HW (1982)** Light activation of Calvin enzymes as measured in pea leaves. *FEBS Lett.* 142: 223-226
- Yamagishi K, Tarahide S, Ogura N, Hakugama H (1988)** Isolation of some properties of a 115 KDa nitrate reductase-inactivator protein from *Spinacea oleracea*. *Plant Cell Physiol.* 29: 371-376
- Yoshimura T, Sekino N, Okura K, Sato T, Ogura N, Nakagawa H (1992)** A nitrate reductase inactivator protein from spinach: purification, molecular weight and subunit composition. *Plant Cell Physiol.* 33: 363-369

Alfaro de Aires Secuze
Modulaciã de R Nitro reductor
de hojas de cebad-

APTO CUM LAUDE
POR UNANIMIDAD

5

Julio

Fernando

Villalón

96
Margarita
El Doctorado.

Mirada

Antonio Eduard

Alfonso de C...



500769639

FBI ETD / 345