

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE BIOLOGÍA

Estudios sobre las actividades reductoras de nitratos en
Bradyrhizobium spp. Relaciones con la fijación simbiótica de N₂.
Caracterización bioquímica y efectos de nitrógeno combinado.

Trabajo presentado para optar al grado de Doctora en
Ciencias Biológicas por la Licenciada

MARÍA CAMACHO MARTÍNEZ-VARA DE REY



Sevilla, Septiembre de 1994

Director de Tesis

Tutora



Dr. D. Manuel Chamber Pérez

Prof. Dra. D^a Maria Tortolero

R. 12597

7D-269

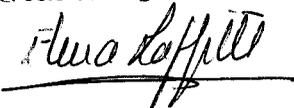


UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 44 número 182 del libro
correspondiente.

Sevilla, 4-oct-94

El Jefe del Negociado de Tesis,



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Depositado en DPTO. MICROBIOLOGIA
de la FACULTAD BIOLÓGICA
de esta Universidad desde el día 6-10-94
hasta el día 26-10-94

Sevilla 26 de OCTUBRE de 1994
EL DIRECTOR DE DEPARTAMENTO



A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Al termino de esta memoria quisiera expresar mi agradecimiento a las siguientes entidades y personas:

Al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, que mediante la financiación de una beca hizo posible la realización de esta Tesis.

A la Dirección General de Investigación Agraria, de la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía, en cuyo Centro de Investigación y Desarrollo Agrario "Las Torres-Tomejil", (Sevilla) se realizaron los trabajos aquí presentados.

Al Dr. D. Manuel Angel Chamber Pérez, Director de esta Tesis, por su inestimable ayuda, estímulo y orientación.

A la Dra. María Tortolero, Profesora Titular del Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología de Sevilla, por facilitar la presentación de esta Tesis.

Al personal laboral del laboratorio de Fijación de Nitrógeno del C.I.D.A., Antonio C. y Luis, sin cuya ayuda no habría podido realizar muchos de los ensayos de esta memoria.

Tanto a mis compañeros actuales, Juanjo, Dulce, Carmen, como a los que han pasado por este laboratorio: Alejandro (q.e.p.d.) que me inició en mi carrera investigadora y cuyos buenos consejos no supe entender a tiempo, Helio, de quien siempre guardaré un grato recuerdo, y Antonio D. A todos por su constante apoyo y estímulo, sin los que nunca hubiera terminado este trabajo. Por su inestimable ayuda a la hora de discutir numerosos temas científicos.

A Javier Camacho, por su ayuda a la hora de componer y fotocopiar.

A mis hijos, María y Eduardo, por todos los buenos ratos que hemos dejado de compartir.

¡GRACIAS!

INDICE

| | |
|---|----|
| ABREVIATURAS | 1 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 1.1. GENERALIDADES | 4 |
| 1.2. CICLO DEL NITRÓGENO | 7 |
| 1.3. COSTES DE LA FIJACIÓN | 8 |
| 1.4. LA REDUCCIÓN DEL NITRATO | 11 |
| 1.5. RESPIRACIÓN DE NITRATO Y DESNITRIFICACIÓN | 13 |
| 1.6. ASIMILACIÓN DE NITRATO | 15 |
| 1.6.1. Nitrato reductasas asimilatorias | 16 |
| 1.6.2. El cofactor de molibdeno | 18 |
| 1.7. NITRATO REDUCTASA DE <i>Bradyrhizobium</i> spp | 18 |
| 1.8. ASIMILACIÓN DE NITRATO vs FIJACIÓN DE N ₂ EN <i>Rhizobium</i> | 21 |
| 2. MATERIALES Y MÉTODOS | 27 |
| 2.1. MATERIAL BIOLÓGICO | 28 |
| 2.1.1. Microorganismos | 28 |
| 2.1.2. Especies vegetales | 28 |
| 2.2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO PARA MICROORGANISMOS | 29 |
| 2.2.1. Medio Ty | 29 |
| 2.2.2. Medio M-79 | 29 |
| 2.2.3. Condiciones de cultivo | 30 |
| 2.2.3.1. En medio sólido | 30 |
| 2.2.3.2. En medio líquido | 30 |

| | |
|--|----|
| 2.3. TAMPONES Y SOLUCIONES | 30 |
| 2.3.1. Solución de crecimiento para plantas | 30 |
| 2.3.1.1. Solución nº1 | 30 |
| 2.3.1.2. Solución nº2 | 31 |
| 2.3.1.3. Solución nº3 | 31 |
| 2.3.1.4. Solución nº4 | 31 |
| 2.3.2. Solución para homogeneización de nódulos | 31 |
| 2.3.2.1. Tampón fosfato | 31 |
| 2.3.2.2. Solución homogeneizadora | 32 |
| 2.3.3. Soluciones para elución por columna | 32 |
| 2.3.3.1. Tampón A | 32 |
| 2.3.3.2. Tampón B | 32 |
| 2.3.4. Soluciones para electroforesis de proteínas | 32 |
| 2.3.4.1. Primera dimensión (IEF) | 32 |
| 2.3.4.2. Segunda dimensión | 34 |
| 2.3.5. Soluciones para cuantificar proteínas en geles | 35 |
| 2.3.5.1. Tinción de Coomassie blue | 35 |
| 2.3.5.2. Tinción de plata | 36 |
| 2.3.6. Soluciones para cuantificar proteínas en medio líquido | 36 |
| 2.3.6.1. Reactivo de Benedict | 36 |
| 2.3.6.2. Solución de Coomassie blue | 37 |
| 2.4. FUENTES DE NITRÓGENO | 37 |
| 2.5. PREPARACIÓN DE INOCULANTE | 37 |
| 2.6. CULTIVO DE PLANTAS EN INVERNADERO | 37 |
| 2.7. HOMOGENEIZACIÓN DE NÓDULOS | 39 |

| | |
|--|----|
| 2.8. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS EN ENSAYOS DE | |
| INVERNADERO | 39 |
| 2.8.1. Actividad nitrogenasa | 39 |
| 2.8.2. Liberación de H ₂ por las raíces noduladas . | 40 |
| 2.8.3. Actividad nitrato reductasa | 41 |
| 2.8.3.1. En nódulos | 41 |
| 2.8.3.2. En bacteroides | 41 |
| 2.8.4. Determinación de proteínas | 42 |
| 2.8.4.1. Solubles | 42 |
| 2.8.4.2. Totales | 42 |
| 2.8.5. Determinación de carbohidratos solubles . | 43 |
| 2.8.6. Peso fresco y nº de nódulos | 43 |
| 2.8.7. Peso seco y contenido en N de la parte | |
| aérea de las plantas | 44 |
| 2.9. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR CROMATOGRAFÍA . . . | 44 |
| 2.9.1. Solubilización y concentración | 44 |
| 2.9.2. Separación por columna | 45 |
| 2.9.3. Elución de la muestra | 46 |
| 2.9.3.1. En columna de Sephadex G-200 | 46 |
| 2.9.3.2. En columna DOWEX | 46 |
| 2.9.3.3. En columna de Hydroxiapatita | 47 |
| 2.10. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS MEDIANTE GELES DE ACRILAMIDA | 47 |
| 2.10.1. Electroforesis bidimensional | 47 |
| 2.10.2. Electroforesis SDS-PAGE | 48 |
| 2.10.3. Detección de proteínas mediante tinción . | 48 |
| 2.10.4. Secado de los geles en papel celofán . . . | 49 |
| 2.10.5. Análisis de los geles | 50 |

| | |
|---|----|
| 2.11. DETERMINACIÓN DE pH ÓPTIMOS | 50 |
| 2.12. CURVAS DE K_M | 50 |
| 2.13. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS | 51 |
| 3. RESULTADOS | 52 |
| 3.1. ESTUDIOS SOBRE LAS INTERACCIONES PLANTA-RIZOBIO | |
| BAJO LOS EFECTOS DEL NITRATO | 53 |
| 3.1.1. Relación entre la fijación simbiótica de N_2 | |
| y la actividad nitrato-reductásica en los | |
| bacteroides de <i>Bradyrhizobium sp. (Lupinus)</i> . | 53 |
| 3.1.2. Efecto de la leguminosa hospedadora sobre | |
| la nodulación y las actividades fijadoras | |
| de N_2 y NR del nódulo | 60 |
| 3.1.3. Efecto de distintos compuestos nitrogenados | |
| en el medio nutritivo sobre las ARA y ANR | |
| de los bacteroides en los nódulos | 65 |
| 3.2. DETERMINACIÓN DE LAS CINÉTICAS DE REACCIÓN DE LOS | |
| DISTINTOS TIPOS DE NR EN <i>Bradyrhizobium spp.</i> | 70 |
| 3.2.1. Estudio comparativo de MV y NADH como | |
| donadores de electrones | 70 |
| 3.2.2. Determinación del pH óptimo | 71 |
| 3.2.3. Determinación de K_M | 75 |
| 3.3. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS DISTINTOS TIPOS | |
| DE NR EN <i>Bradyrhizobium spp.</i> | 78 |
| 3.3.1. Determinación de los PM de las NR de las | |
| bacterias | 79 |
| 3.3.1.1. En bacterias crecidas con/sin nitrato | 79 |

| | |
|--|-----|
| 3.3.1.2. En bacterias en distintas fases de crecimiento | 81 |
| 3.3.1.3. En bacterias crecidas en micro-aerobiosis con nitrato | 82 |
| 3.3.2. Determinación de los PM de las NR de los bacteroides | 84 |
| 3.3.3. Determinación de los pI | 86 |
| 3.4. ESTUDIO DE LOS PATRONES ELECTROFORÉTICOS DE PROTEINAS TOTALES DE <i>Bradyrhizobium</i> spp Y CITOSOLES NODULARES | 88 |
| 3.4.1. Efecto de diversas fuentes de N combinado sobre el patrón proteico de bacterias en vida libre de <i>Bradyrhizobium</i> sp. (<i>Lupinus</i>) . . . | 90 |
| 3.4.2. Comparación de los patrones proteicos de bacteroides de <i>Bradyrhizobium</i> sp. (<i>Lupinus</i>) | 92 |
| 3.4.3. Estudio de los patrones electroforéticos de las proteínas solubles del citosol nodular | 96 |
| 3.4.3.1. Efecto del N combinado sobre las proteínas solubles de nódulos de <i>L.albus</i> y <i>L.luteus</i> | 96 |
| 3.4.3.2. Efecto especie de <i>Lupinus</i> sobre las proteínas solubles del citosol nodular | 99 |
| 4. DISCUSIÓN | 100 |
| 4.1. INFLUENCIA DE LA ESPECIE DE LEGUMINOSA Y DE LA FUENTE NITROGENADA EN EL MEDIO SOBRE LAS ACTIVIDADES NITROGENASA Y NR; POSIBLE RELACIÓN ENTRE AMBAS | 101 |

| | |
|---|-----|
| 4.2. CONSTANTES CINÉTICAS Y BIOQUÍMICAS DE LA ENZIMA NR DE <i>Bradyrhizobium</i> spp. | 107 |
| 4.3. ISOENZIMAS DE LAS NR EN <i>Bradyrhizobium</i> spp. . . . | 112 |
| 4.4. INFLUENCIA DEL N COMBINADO SOBRE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES EN <i>Bradyrhizobium</i> sp. (<i>Lupinus</i>) Y CITOSOLES NODULARES | 116 |
| 5. CONCLUSIONES | 121 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA | 124 |

ABREVIATURAS

aa = Aminoácido

AAT = Aspartato aminotransferasa

ANR = Actividad nitrato reductasa

ANR_c = Actividad nitrato reductasa constitutiva

ANR_i = Actividad nitrato reductasa inducida

APS = Amonio persulfato

ARA = Actividad reductora de acetileno

ATP = Adenosin trifosfato

Bisacrilamida = N,N'- metilenbisacrilamida

DEAE = Resina de intercambio aniónico fuerte

DNA = Acido desoxiribonucleico

DTT = Ditiotreitól

e⁻ = Electrón

EDTA = Acido etilen-diamino-tetraacético

ER = Eficiencia relativa de la nitrogenasa

FAD = Flavin adenin-dinucleótido

GDH = Glutamato deshidrogenasa

GOGAT = Glutamato sintasa

GS = Glutamina sintetasa

Hup⁺ = Fenotipo hidrogenasa positivo

Hup⁻ = Fenotipo hidrogenasa negativo

IEF = Isoelectroenfoque

K_M = Constante de Michaelis-Menten

MM = Michaelis-Menten

MV = Metil viológeno

NADH = Forma reducida de nicotinamida adenindinucleótido

N₂asa = Nitrogenasa
NEDA = N-(1-Naftil)-etilendiamindihidrocloruro de sodio
NN = Nitrato amónico
NR = Nitrato reductasa
NiR = Nitrito reductasa
PAGE = Electroforesis en geles de poliacrilamida
PEPC = Piruvato descarboxilasa
pI = Punto isoeléctrico
PM = Peso molecular
PMSF = Fenilmetilsulfonil fluoruro
PVP = Polivinil pirrolidona
SARA = Actividad reductora de acetileno específica
SE = Desviación típica
SDS = Dodecil sulfato sódico
sp = Especie
SULFA = Sulfanilamida
TARA = Actividad reductora de acetileno total
TCA = Acido tricloroacético
TEMED = N,N,N,N'-tetrametil-etilendiamina
Tris = Tris(hidroximetil)aminometano

1. INTRODUCCION

1.1. GENERALIDADES

El Nitrógeno es un elemento esencial para los seres vivos, pues forma parte de biomoléculas fundamentales como los ácidos nucleicos y las proteínas. Sin embargo, a pesar de ser extraordinariamente abundante en la atmósfera en su forma molecular, es prácticamente inaccesible para los seres vivos a causa de su estabilidad; no en vano fue llamada "diazó" (sin vida) por Lavoisier, debido a la cantidad de energía externa que hay que suministrarle para que reaccione. Así mismo, desde un punto de vista agronómico es, al igual que el agua, uno de los factores más importantes que limitan la productividad de los cultivos (Heichel, 1987). De este modo, los incrementos espectaculares de productividad obtenidos durante la llamada "revolución verde" de los años 60 y 70 se debieron en buena medida a la utilización masiva de fertilizantes nitrogenados, obtenidos por fijación industrial del Nitrógeno atmosférico (N_2). Proceso energéticamente muy costoso, destinándose anualmente en torno a los $3 \cdot 10^8$ barriles de petróleo a la producción de gas natural para la síntesis de NH_3 anhidro por el método de Häber-Bosh (Schubert, 1982).

Como alternativa, la fijación biológica del N_2 fue tomando gran interés, habida cuenta de la escasez del petróleo, materias primas y fuentes de energía necesarias para la producción de amoníaco. Sin olvidar las implicaciones ecológicas que se derivan del uso intensivo de los componentes nitrogenados. Por otra parte, el crecimiento de la población humana determina una mayor

demanda de alimentos, a la vez que el aumento del nivel de rentas conlleva un contenido más alto de proteínas en la dieta. Todos estos factores en conjunto hacen que se muestre un interés especial por el cultivo de las leguminosas-grano, no solo en virtud de su alto contenido en proteína sino también por su relativa independencia de la fertilización nitrogenada, al poder fijar N_2 en simbiosis con especies de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (Bedmar y Olivares, 1988).

La fijación simbiótica y la reducción de nitratos (reducción asimilatoria por parte de la nitrato-reductasa) son los procesos a través de los cuales las leguminosas incorporan N orgánico a formas reducidas para el desarrollo y crecimiento de la planta (Ligero et al., 1987). En los nódulos de la leguminosa, la conversión del N_2 a NH_3 está catalizada por el complejo enzimático de la nitrogenasa (Hageman y Burris, 1978; Bergersen, 1982), el cual hasta ahora sólo se ha detectado en organismos procariotas. La mayoría de estos organismos (Tabla 1.1) son capaces de fijar N_2 en vida libre (*Azotobacter*, *Klebsiella* y bacterias fotosintéticas); por su parte, las bacterias pertenecientes a la familia *RHIZOBIACEAE* llevan a cabo la fijación de N_2 en el interior de los nódulos de las leguminosas y de algunas otras especies como *Trema* y *Parasponia*, donde se transforman en bacteroides (Sandeman y Gresshoff, 1985; Trinick, 1980), los cuales dependen de la planta hospedadora para el suministro de complejos carbonados y aportan a la planta nitrógeno fijado en

forma asimilable por la misma. Otros microorganismos (*Frankia*) establecen simbiosis fijadoras de N₂ con plantas no-leguminosas, en especial Gimnospermas y Angiospermas (Azcon G-Aguilar et al, 1988).

A) Agentes simbióticos fijadores de N₂

1. *Rhizobium* o *Bradyrhizobium* asociados a diferentes leguminosas (guisante, judía, trébol, soja, altramuza, etc.)
2. *Frankia* asociada a plantas no leguminosas (aliso, *Ceanothus*, *Myrica*, *Purshia*, etc.)

B) Agentes no simbióticos fijadores de N₂

1. Algas verde-azules (*Nostoc*, *Anabaena*, *Calothrix*, *Mastigocladus*, etc.)
 2. Levaduras (*Rhodotorula* sp.)
 3. Bacterias
 - a) Aerobias (*Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derxia*, etc.)
 - b) Facultativas (*Bacillus*, *Klebsiella*, etc.)
 - c) Anaerobias
 - No fotosintetizadoras (*Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Methanobacterium*, etc.)
 - Fotosintetizadoras (*Rhodospirillum*, *Chromatium*, *Chlorobium*, *Rhodomicrobium*)
-

Tabla 1.1. Agentes biológicos fijadores de Nitrógeno.

El proceso simbiótico de la fijación de N₂ resulta energéticamente costoso para la planta. Por ello el estudio de mecanismos que mejoren la eficiencia energética de la fijación (sistema Hup⁺, NR desasimilatoria, etc.) presenta interés para incrementar la cantidad de N₂ fijado por los cultivos (Ligero et al, 1987).

1.2. CICLO DEL NITRÓGENO

La cantidad de N_2 existente en el planeta se cifra en unos 60 mil billones de toneladas, de las cuales sólo 13 mil forman parte de la biomasa terrestre (Brock y Madigan, 1988). Las bacterias fijadoras de N_2 reducen el Nitrógeno atmosférico y aumentan de este modo la cantidad disponible de nitrógeno combinado. Dicho nitrógeno se recicla continuamente (Fig.1.1). Las plantas obtienen del suelo la mayor parte del mismo en forma de nitrato que reducen para formar amoníaco, aminoácidos y otros productos, los cuales son transformados por los animales, siendo devueltos posteriormente al suelo aún en forma reducida. Ciertos microorganismos del suelo pueden reoxidar el amoníaco para formar nitritos y nitratos, susceptibles de ser utilizados por las plantas, completándose así el ciclo (Barceló et al, 1987).

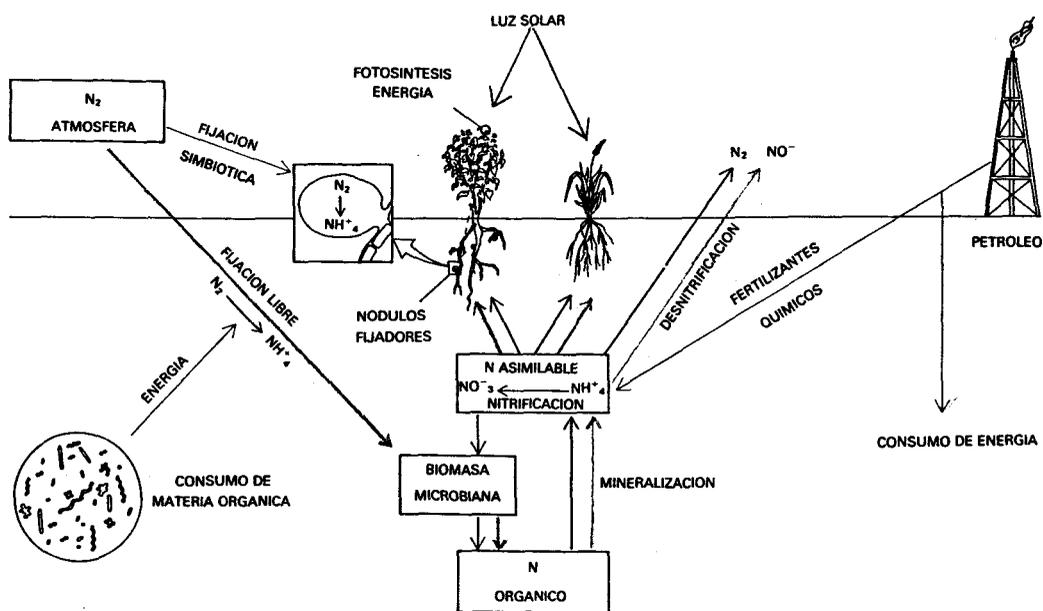


Fig.1.1. CICLO DEL NITRÓGENO en el que se hace evidente la influencia del hombre.

En la mayoría de los hábitats del planeta la productividad biológica está limitada por la disponibilidad de una fuente nitrogenada, de modo que un aumento en la fijación contribuiría indirectamente a incrementar la biomasa del ecosistema. Sin embargo, este ciclo está siendo alterado por el hombre, a través del uso continuado de fertilizantes químicos y ciertas actividades industriales, que suponen el desprendimiento de óxidos de nitrógeno a la atmósfera, con el consiguiente daño en la capa de ozono (Azcon G-Aguilar *et al.*, 1988).

1.3. COSTES DE LA FIJACIÓN

La fijación total de N₂ en la biosfera se cifra en 275 millones de toneladas anuales, de las que 175·10⁶ corresponden a fijación biológica, 70·10⁶ a fijación industrial y 30·10⁶ a espontánea (Postgate, 1982).

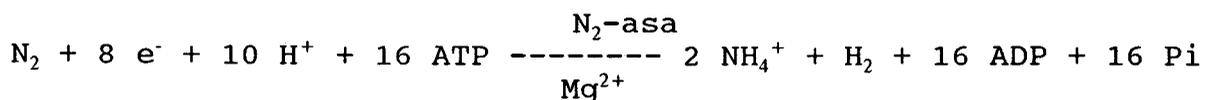
A fines del siglo XIX se empiezan a utilizar abonos químicos nitrogenados. La principal fuente de nitrógeno era el nitrato de Chile. Hacia 1914 Frist Haber y Karl Bosch consiguen un proceso catalítico de fijación de N₂, mediante el cual el N₂ reacciona con H₂ para dar amoníaco. La fuente de H₂ es el metano del gas natural. Para que el H₂ reaccione con el N₂ se requieren altas temperaturas (500 °C) y altas presiones (200 atm.), según la reacción:



Se consumen 1'5 Kg de fuel-oil por Kg de N₂ fijado.

El papel predominante en términos globales en la fijación simbiótica, corresponde a las bacterias *Rhizobium* spp. y *Bradyrhizobium* spp., que nodulan a las leguminosas. Se estima que son responsables de niveles de fijación del orden de $80 \cdot 10^6$ de toneladas de N_2 por año (Hardy 1976, Hardy et al., 1977).

En la Naturaleza, la fijación biológica del N_2 también requiere energía. Sólo se diferencia de la fijación industrial en las condiciones y mecanismos moleculares desarrollados para llevar a cabo el proceso de reducción. La nitrogenasa (N_2 asa) requiere de 12-15 moles de ATP/mol de N_2 reducido, según la reacción:



La nitrogenasa, es un complejo enzimático muy conservado en la Naturaleza (Burns y Hardy, 1975; Orme-Johnson, 1985). Dicho complejo está constituido por dos componentes denominados "nitrogenasa" o "proteína MoFe", al que se une el N_2 hasta su conversión en NH_3 y la "nitrogenasa reductasa" o "proteína Fe" que aporta los electrones a la nitrogenasa (Fig.1.2).

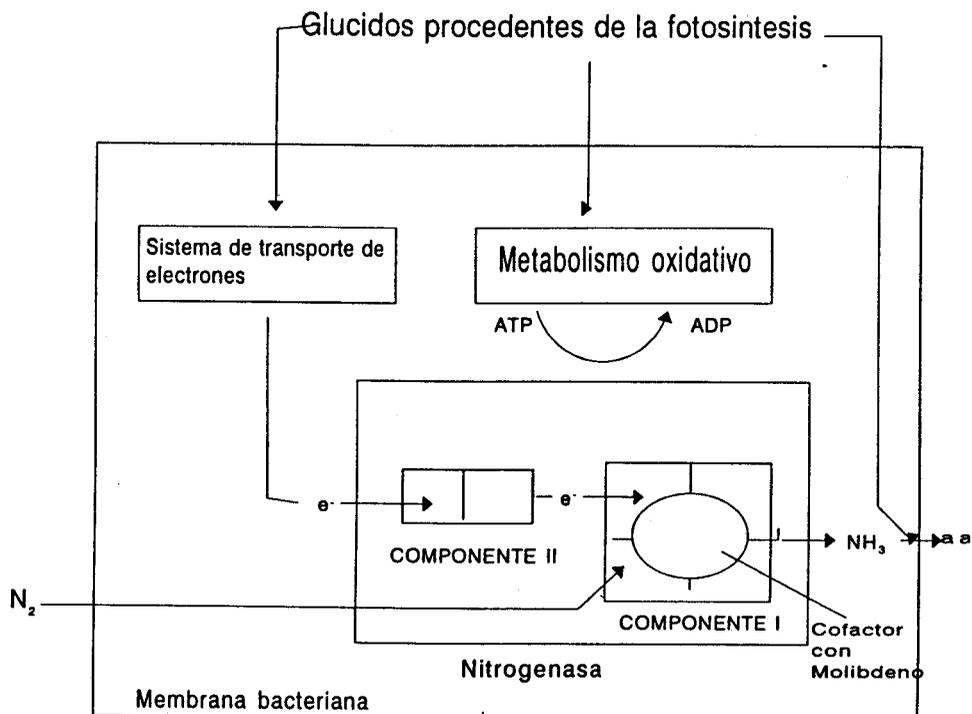


Fig.2. Mecanismo de la reducción de N_2 a NH_3 por la nitrogenasa.

No parece que existan diferencias significativas entre las distintas especies de organismos fijadores. En general, según Postgate et al. (1981), la nitrogenasa necesita un sistema transportador de electrones con flavodoxina y/o ferredoxina como donadores de los mismos, 2-2'5 moléculas de ATP por electrón transferido e incorporación de Fe y S a varias de las proteínas del sistema, además de Mo en la proteína terminal (Fig.3). Aunque en la pasada década, se han descrito algunos microorganismos, como *Azotobacter vinelandii* o *A. chroococum*, que poseen un sistema alternativo de fijación de N_2 basado en una nitrogenasa que contiene Va y no Mo (Bishop et al., 1980; Haler et al., 1986; Robson et al., 1986; Bishop et al., 1986; Yakunin et al., 1990).

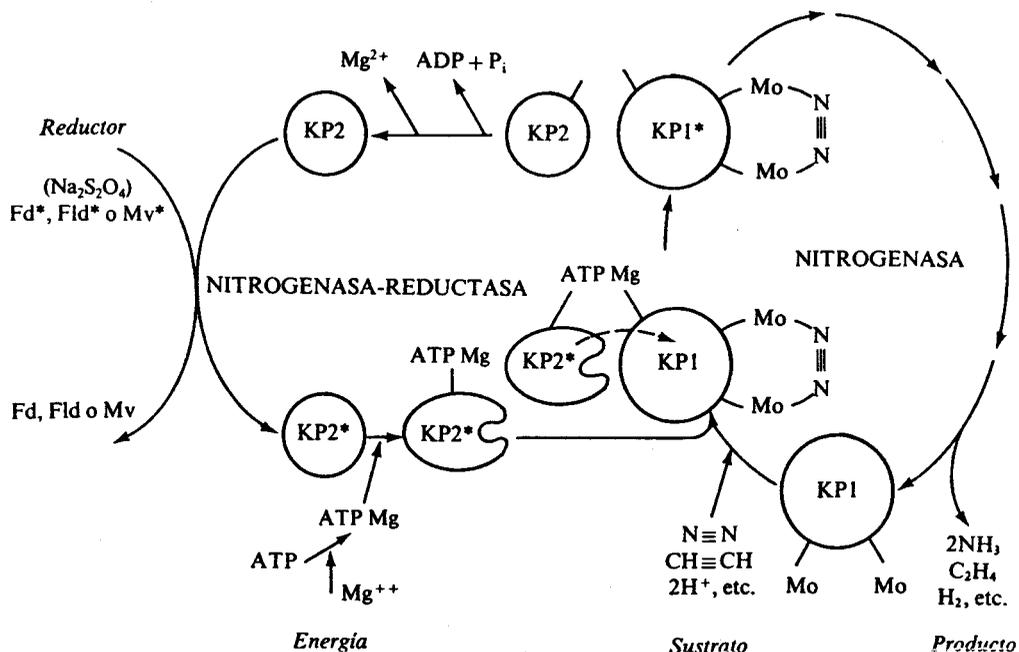


Fig.1.3. Sistema Nitrogenasa, según Postgate *et al.* (1981)

La nitrogenasa es altamente sensible al O_2 y desprende H_2 en la fijación. Existen cepas de *Rhizobium* spp. y *Bradyrhizobium* spp. capaces de reciclar este H_2 (cepas Hup^+) generando ATP de forma que el proceso de reducción del N_2 resulta más eficiente (Murillo *et al.*, 1989).

1.4. LA REDUCCIÓN DEL NITRATO

El proceso de reducción del nitrato cumple varias funciones fisiológicas en la Naturaleza. Caben distinguir dos procesos de reducción de nitratos: la reducción asimiladora y la reducción no asimiladora. En el primer caso, que es característico de la nutrición de las plantas, la reducción se corresponde con un proceso anabólico en el cual se aprovecha el poder reductor para la biosíntesis de compuestos orgánicos. En cambio, la reducción

no asimiladora, más bien es una vía catabólica o desasimilatoria, mediante la cual el nitrato en condiciones anaeróbicas, sustituye al O_2 como aceptor final de electrones en una cadena de transporte (nitrato reductasa respiratoria). Este tipo de respiración por nitratos, es más típica de las bacterias, y juega un papel importante en el proceso de desnitrificación (NO_3^- a N_2O , NO y N_2) en el Ciclo del Nitrógeno. Sin embargo, no siempre está clara la distinción entre nitrato reductasa (NR) asimilatoria y respiratoria, porque en ciertos casos una misma enzima cumple las dos funciones; las dos vías metabólicas, se comparan en la Fig. 1.4 (Brock y Madigan, 1988).

Se ha demostrado en ciertas especies de *Rhizobium* (todas las que forman simbiosis con leguminosas de interés agrícola, excepto *Rh. phaseoli*) y en algunas de *Bradyrhizobium* spp. la presencia de NR de tipo respiratorio, tanto en vida libre (Zablotowick et al., 1978; Daniel et al., 1980a) como en bacteroides (Zablotowick y Focht, 1989). La nitrogenasa de estas especies es capaz de reutilizar el óxido nitroso y el N_2 desprendidos por la vía respiratoria (Bhandari y Nicholas, 1984; O'Hara y Daniel, 1985).

VÍA ASIMILATORIA
Plantas, Hongos, bacterias.

VÍA RESPIRATORIA
Solo bacterias.

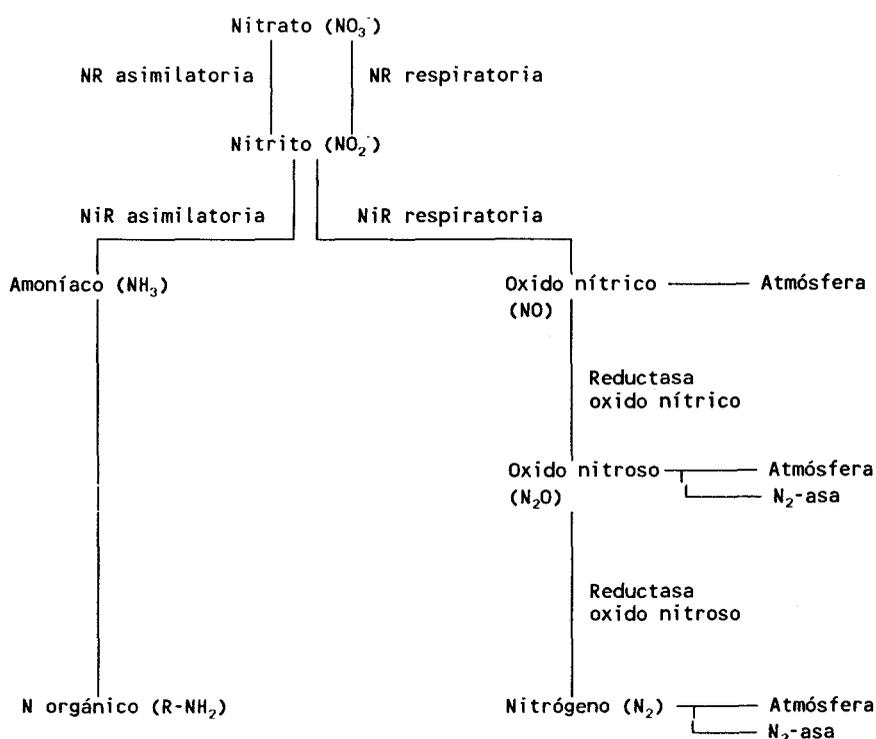


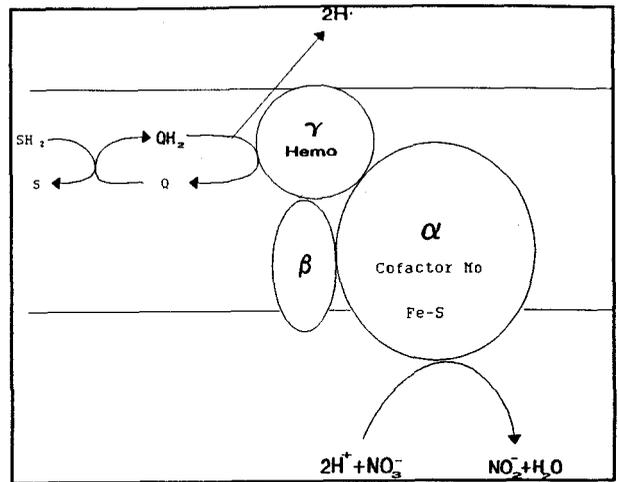
Fig. 1.4. Reducción asimilatoria y respiratoria del Nitrato.

1.5. RESPIRACIÓN DE NITRATO Y DESNITRIFICACIÓN

La respiración del nitrato, ha sido estudiada mayoritariamente en las enterobacterias (Steward y Parales, 1988). En este grupo bacteriano, la NR se encuentra unida a membranas y el ATP producido se utiliza para transportar solutos y para otros procesos celulares. En *E. coli*, se compone de tres subunidades α , β y γ , y contiene Fe, S y Mo. Su estructura aparece en la Fig 1.5.

Existe además una segunda NR en *E. coli* denominada Z (Iobbi-Nivol et al., 1987; Iobbi-Nivol et al., 1990) que tiene una

estructura similar a la anterior y sus subunidades son en parte intercambiables (Blasco *et al.*, 1992), aunque los genes estructurales se organizan en operones distintos.



La desnitrificación, es un modo de obtener energía,

Fig.5. Representación esquemática de la NR de *E.coli*

propio de numerosas eubacterias y algunas archeobacterias (Hochstein y Tomlinson, 1988). Se han descrito dos tipos de NR desnitrificantes: unas contienen Cu y varían mucho en peso y número de subunidades, otras contienen grupos hemo y son bastante similares con un peso en torno a 120 kD y con dos subunidades idénticas. Las primeras aparecen en especies como *Alcaligenes faecalis* o *Rhodopseudomonas sphaeroides* y el segundo tipo se ha descrito en varios géneros como *Alcaligenes*, *Azospirillum* o *Thiobacillus*. Algunos organismos desnitrificantes, poseen además reductasas del óxido nítrico y del óxido nitroso, que dan como producto final dinitrógeno, en reacciones acopladas a la síntesis de ATP.

Algunas estirpes de *Rhizobium* podrían utilizar este N_2 y la energía liberada en forma de ATP, para producir amonio que directamente pasa al citosol de la célula vegetal donde, por medio de la glutamina sintetasa y de la glutamato-oxo-glutarato-amino-transferasa (GS-GOGAT) se convierte en glutamato y es

transferido al resto de la planta por el xilema. En este caso no existe liberación de compuestos nitrogenados al ambiente, por lo que se trata de una simple respiración de nitrato y no de una desnitrificación (Rigaud et al., 1973).

1.6. ASIMILACIÓN DE NITRATO

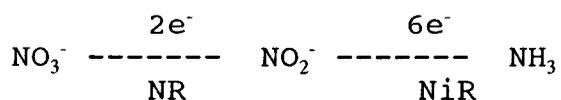
La asimilación de nitrato es un proceso autótrofo por el cual a partir de la forma inorgánica oxidada de nitrato, se sintetiza el nitrógeno reducido de los diferentes compuestos orgánicos (aminoácidos, ácidos nucleicos, alcaloides,..etc.). La reducción asimilatoria del nitrato ocurre en plantas superiores, algas, algunas bacterias, hongos y levaduras. El proceso de reducción de los nitratos está acoplado al aporte de poder reductor que puede enlazar directamente con la fotosíntesis en los tejidos verdes de la planta o bien estar acoplado al suministro energético de la mitocondria en los tejidos donde aquélla no es operativa (ej. raíz).

El proceso reductor de los nitratos requiere 8 electrones. En principio, Meyer y Schultze, en 1894, propusieron una hipótesis en la que establecían cuatro pasos parciales, con la participación de dos electrones en cada uno de ellos:



Posteriormente la secuencia de pasos se redujo a dos: una primera etapa que requiere dos e⁻ y cataliza la reducción del NO₃⁻

a NO_2^- mediante la NR y un segundo proceso de reducción directa del NO_2^- a NH_3 , catalizado por la NiR y que requiere de seis e^- :



Ambas proteínas son metaloenzimas que requieren un cofactor: una molibdopterina (MoCo) para la NR y una hidroclorina conteniendo Fe (sirohemo) para la NiR.

1.6.1. Nitrato reductasas asimilatorias

Las NR pueden agruparse en dos grandes familias en base a su secuencia de aminoácidos, una primera que agruparía a las NR eucariotas y otra que comprendería a las NR procariotas.

Las NR eucariotas son proteínas solubles, multiméricas, con tres grupos prostéticos por subunidad: FAD, citocromo b_{557} y molibdopterina (Campbell, 1988; Solomonson y Barber, 1990). Analizando clones de ADN se ha observado homología entre tres partes de la secuencia de aminoácidos de la NR con tres proteínas de mamíferos bien caracterizadas: NADH-cit b_5 reductasa, citocromo b_5 y sulfito oxidasa (Crawford *et al.*, 1988; Caboche y Rouze, 1990). Cada una de estas regiones de homología parece ser un "dominio funcional" independiente que se une a un grupo prostético o cofactor. Así, pérdidas de un dominio no significarían la pérdida total de actividad (Solomonson y Barber, 1990).

La NR utiliza el poder reductor de los piridín nucleótidos reducidos NADH/NADPH:



En levaduras, la NR es más específica de NADPH, mientras que en células eucariotas que estén fotosintetizando dependen principalmente de NADH, aunque puede ser efectivo el NADPH si está presente una NADPH fosfatasa. Se ha calculado el PM de distintas NR purificadas (*Thalassiosira*, *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Zea*) que oscila entre 90 (*Chlorella*) y 500 kD (*Chlamydomonas*).

In vitro, el enzima puede realizar dos actividades distintas:

- actividad diaforasa, en la que por medio de los piridín nucleótidos reduce a compuestos aceptores de 1 o 2 e⁻, como citocromo c, ferricianuro o diclorofenolindofenol y
- actividad nitrato reductasa terminal, en la que reduce el nitrato por medio de los flavín nucleótidos reducidos o metil viológeno, independientemente de la actividad de los piridín nucleótidos.

Las NR procariotas están presentes en organismos fotosintetizadores como algas verde-azuladas (cianobacterias) y bacterias fotosintéticas. Tienen un PM de, aproximadamente 75 kD, y contienen Mo, pero no flavina o grupo hemo. Son dependientes de ferredoxina y aparecen unidas a las membranas de los

tilacoides. Ambas familias de NR tienen un número de recambio elevado y son inducibles por nitrato y reprimibles por amonio.

1.6.2 El cofactor de molibdeno

La existencia de un cofactor necesario para la actividad de los distintos tipos de NR (tanto respiratorias, como asimilatorias) fue descrito por primera vez por Pateman *et al.*, hace treinta años. El cofactor de molibdeno está formado por una molibdopterina unida por enlaces tiol al molibdeno (Rajagopalan, 1989). Se han descrito dos formas de molibdopterina: la "original" llamada MPT, aparece en todas las molibdoenzimas eucarióticas estudiadas, como la sulfito oxidasa, la xantina deshidrogenasa y la nitrato reductasa de *Chlorella* y de las hojas de maíz; la segunda forma aparece en procariotas y se compone de una molibdopterina unida a una molécula de GMP constituyendo una molibdopterina guanina dinucleótido (GMD) que se encuentra en las nitrato y formiato reductasas de *E. coli* y en la dimetil sulfóxido reductasa de *Rhodobacter sphaeroides* (Johnson *et al.*, 1990).

1.7. NITRATO REDUCTASA DE BRADYRHIZOBIUM

Las NR de *B. japonicum* fueron estudiadas por primera vez por Evans y Cheniae en 1959, quienes propusieron la existencia de una NR constitutiva en bacteroides y unida a membrana (particulada), que podía utilizar como donador de e⁻ varios compuestos, entre ellos NADH, viológenos o succinato y que más tarde sería

clasificada por Taniguchi e Itagaki (1960) como similar a la NR de *E.coli*. Posteriormente Lowe y Evans (1964) encontraron una NR soluble en células crecidas en anaerobiosis, la cual, a diferencia de la anterior, sólo aceptaba e^- de viológenos y era altamente sensible al O_2 .

Kennedy *et al.* en 1975, fueron los primeros en purificar ambas proteínas (soluble y particulada), encontrando que tenían un PM similar de unos 70 kD, aunque diferían en la constante de Michaelis para el nitrato (K_M), dando valores de 330 μM para las células crecidas en aerobiosis y 16 μM para los bacteroides.

Un año más tarde (1976), Daniel y Gray purifican la NR de células crecidas en anaerobiosis con NO_3^- (NR respiratoria), cuya actividad específica era cinco veces mayor que la de aquellas crecidas en aire (Daniel y Appleby, 1972). Como previamente se había descrito, en condiciones aeróbicas (Lowe y Evans, 1964; Kennedy *et al.*, 1975), Daniel y Gray (1976) encuentran actividad NR en las dos fracciones (particulada y soluble) de células anaeróbicas. En contra de lo propuesto por Kennedy *et al.*, señalan PM distintos para las NR anaeróbicas y del bacteroide (70 kD) a las NR de células crecidas en aerobiosis sin nitrato (170 kD); sin embargo, proponen unos valores de la constante de Michaelis similares: 106 μM para células anaeróbicas y 91 μM para células aeróbicas. Ambos grupos (Kennedy *et al.* y Daniel y Gray) coinciden en afirmar que la única fuente donadora de e^- para las enzimas purificadas son los viológenos, siendo totalmente ineficientes los piridín nucleótidos o el succinato.

Intentos posteriores de purificación de la enzima fueron hechos por Bedmar *et al.* (1990) en células de *B.japonicum*, crecidas en microaerobiosis (1% O₂) con nitrato (10 mM), encontrando dos NR de PM distintos (300 y 80 kD) para bacterias y bacteroides, respectivamente.

La actividad NR puede ser afectada por el O₂, pero no cuando la enzima está purificada (Kennedy *et al.*, 1975). La concentración de O₂ afecta de forma diferente a los distintos tipos de NR. Así, una exposición al aire de 5 minutos disminuye en un 52% la actividad NR de células anaeróbicas y en un 14% la actividad de células aeróbicas (Daniel y Gray, 1976).

En estudios con células de *B. japonicum* y *Bradyrhizobium sp.* (*Lupinus*), se observa una inhibición total en actividad NR por el O₂ en cultivos crecidos al aire, en los que se ha inducido actividad NR respiratoria tras un período en anaerobiosis. Sin embargo, la actividad NR aumenta con una atmósfera del 5% de O₂ y se inhibe a concentraciones de O₂ superiores al 10% en cultivos aeróbicos (O'Hara *et al.*, 1983). Esto se contradice con los trabajos anteriores (Kondorosi *et al.*, 1973), en los que se postulaba que la NR de *R.meliloti* era de tipo asimilatorio e insensible al O₂.

1.8. ASIMILACIÓN DE NITRATO vs FIJACIÓN DE N₂ EN *Rhizobium*

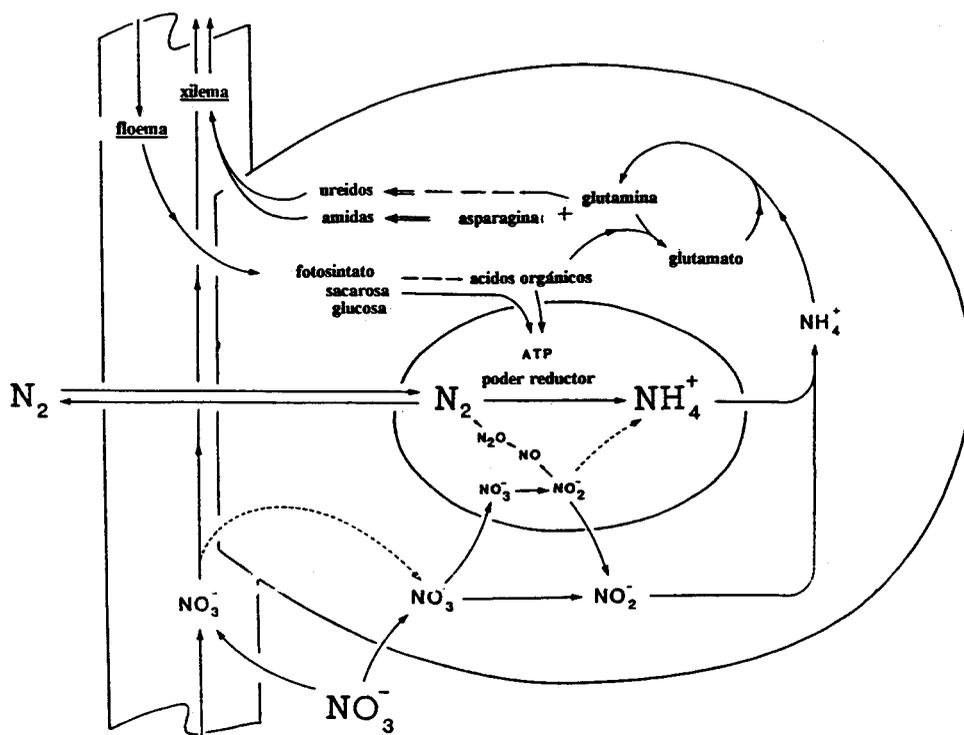
Otro tema en controversia es la relación existente entre la nitrogenasa y la NR. Algunos autores (Kondorosi et al., 1973) defienden la idea de que ambas enzimas comparten la subunidad proteica MoFe, ya que dicha subunidad de la NR asimilatoria de *Neurospora crassa* puede ser sustituida o complementada por aquélla de la nitrogenasa de bacteroides de soja. Otros grupos (Daniel y Appleby 1972; Kennedy et al., 1975) son contrarios a esta idea y encuentran improbable una relación entre ambas enzimas.

La asimilación del nitrato del suelo por las leguminosas depende de varios factores, como la especie y la concentración de NO₃⁻ (Andrews, 1986). Así, las leguminosas de zonas templadas (*Lupinus*, *Pisum*, *Vicia*) llevan a cabo la mayoría de la asimilación por las raíces, pero la asimilación en las partes verdes empieza a aumentar a medida que la concentración de NO₃⁻ aumenta. Sin embargo, las leguminosas tropicales (*Cajanus*, *Glycine*, *Phaseolus*) asimilan gran parte del NO₃⁻ por las partes aéreas y la proporción de NO₃⁻ asimilada por tallos/raíces permanece constante.

Invariablemente la fijación de N₂ ocurre en zonas donde la disponibilidad de NO₃⁻ es baja. Esto debe explicarse en términos de conservación de Energía, ya que en general, es más costoso fijar N₂ que reducir NO₃⁻. En la Fig.1.6 se representan las interacciones entre fijación y reducción de NO₃⁻ y NO₂⁻ en el

nódulo (Aparicio-Tejo y Sánchez Díaz, 1982). El NO_3^- a bajas concentraciones puede ser beneficioso para la fijación, estimulando la formación y el crecimiento de los nódulos especialmente en plántulas que hayan consumido las reservas de los cotiledones. Sin embargo, a moderadas y altas concentraciones (2-3 mM) el NO_3^- induce la senescencia del nódulo, lo que se traduce en una disminución de la fijación.

Fig.1.6. Representación gráfica de las interacciones entre fijación de N_2 y reducción de NO_3^- y NO_2^- en el nódulo de la leguminosa



La forma en que el NO_3^- inhibe a la fijación ha sido ampliamente estudiada y se barajan varias hipótesis. 1ª) El nódulo necesita fotosintato para mantener la fijación, y la asimilación del nitrato también requiere sustratos carbonados para incorporar el NH_4^+ , así pues, habría una competencia por los carbohidratos, lo cual conllevaría una senescencia del nódulo (Caroll y Gresshoff, 1983; Noel et al., 1982). En algunas especies, como soja, no existen cambios en el contenido de carbohidratos aunque disponga de concentraciones de nitrato de hasta 10-15 mM (Streeter, 1985) y en otras especies (trébol blanco) dicho contenido disminuye más tarde que la actividad nitrogenasa (Minchin et al., 1986).

2ª) Otra teoría supone que no es el NO_3^- el responsable de inhibir la actividad de la nitrogenasa, sino la acumulación de otros productos derivados del metabolismo del NH_4^+ como el NO_2^- . Se ha visto que éste disminuye la actividad de la nitrogenasa purificada (Trinchant y Rigaud, 1980), tanto en extractos crudos de bacteroides (Kennedy et al., 1975) como en bacteroides aislados (Rigaud et al., 1973) o en nódulos intactos (Kambergen, 1977), debido a la capacidad de unirse reversiblemente al componente MoFe compitiendo así con el N_2 . El NO_2^- también puede unirse a la leghemoglobina (LHb^{2+}) y oxidarla formando una molécula no funcional (Lhb^{3+}) incapaz de transportar O_2 (Becana y Klucas, 1992).

Sin embargo, parece ser que en los nódulos existen dos etapas de respuesta a la adición de nitrato (Becana et al., 1989): una primera etapa (hasta tres días) en la que el nitrato

no tiene acceso al bacteroide sino sólo al cortex del nódulo, y en la que la disminución de la actividad nitrogenasa, no puede ser explicada por la inhibición del NO_2^- , y una segunda etapa en exposiciones más prolongadas a NO_3^- , en la que éste entraría en la zona infectada y sería activamente reducido por los enzimas del bacteroide y del citosol, produciendo cantidades elevadas de NO_2^- , que podrían afectar a la nitrogenasa y a la leghemoglobina, dañando irreversiblemente al nódulo y acelerando su senescencia.

Algunos autores, proponen una tercera hipótesis en la que el NO_3^- podría interferir con la disponibilidad de O_2 en los bacteroides al incrementar la resistencia de una barrera de difusión de O_2 existente en el cortex nodular (Minchin *et al.*, 1986; Carroll *et al.*, 1987; Schuller *et al.*, 1988; Vessey *et al.*, 1988). Dicha barrera sería la encargada de mantener una determinada presión de oxígeno en el interior del nódulo (O_i). La forma en que el nitrato actuaría, sería alterando la permeabilidad de la membrana y disminuyendo así la O_i , con lo que la actividad de la nitrogenasa (N_2asa) se vería disminuida. Así, Layzell *et al.* (1990) encontraron que en nódulos de soja la O_i disminuía de 20-30 a valores de 7 nM, tras aplicarle durante 48 horas una concentración 10 mM de nitrato.

La idea anterior de que no es el nitrato directamente el responsable de la disminución de la actividad de la N_2asa , también es compartida por estos autores; proponen, por ejemplo, que la disminución del aporte de carbohidratos solubles al nódulo conlleva un reajuste osmótico en la barrera de difusión del O_2 ,

que da como resultado una disminución de la permeabilidad, y por tanto de la O_i . Estimaciones teóricas (Minchin *et al.*, 1989; Vessey *et al.*, 1988) han demostrado que tal disminución ocurre durante la fertilización nitrogenada. Asimismo, la presencia de NO_3^- en el interior celular, conllevaría la producción de NO_2^- . Dicho NO_2^- requiere una actividad NiR, la cual es altamente dependiente de la O_i , así una baja O_i conllevaría una baja actividad NiR, con la consiguiente acumulación de nitrito, el cual es un alto inhibidor de la N_2 asa. Por otra parte el NO_2^- puede combinarse con la LegHb ferrosa y formar nitrosol-leghemoglobina (LbNO), y así disminuir la cantidad de LegHb funcional que facilite la difusión de O_2 en los bacteroides. Según otros autores no se han tenido en cuenta varios factores como:

- a) Los niveles de NR de bacteroides aislados son regulados por el O_2 (Daniel y Gray, 1976; O'Hara *et al.*, 1983; Ohyama y Kumazawa, 1987).
- b) La NR bacteriana aumenta en plantas sometidas a estrés hídrico, situación que favorece la anerobiosis dentro del nódulo (Becana *et al.*, 1986; Aparicio-Tejo y Sánchez Díaz, 1982).
- c) La acumulación de NO_2^- en el nódulo es, parcialmente contrarrestada mediante el aumento de la concentración externa de O_2 (Heckman y Drevon, 1987).

Estudios más detallados hechos por Minchin *et al.* (1989), concluyen, que en la primera etapa citada anteriormente, en la

que el NO_3^- no penetra en la zona infectada del nódulo (Sprent et al., 1987; Giannakis et al., 1988) la resistencia a la difusión del O_2 aumenta, restringiendo el acceso de éste al bacteroide y disminuyendo la actividad nitrogenasa. Si en este estado, el NO_3^- es eliminado la fijación podría continuar, sin apenas costes para la planta.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1.MATERIAL BIOLÓGICO.

2.1.1.Microorganismos.

Las cepas de *Bradyrhizobium* sp (*Lupinus*) y *Bradyrhizobium japonicum* utilizadas en este trabajo se citan en la Tabla 2.2.

2.1.2.Especies vegetales.

En los ensayos de invernadero se han utilizado los siguientes cultivares de *Lupinus* y *Glycine*:

Lupinus albus cv. Multolupa

Lupinus albus cv. 1034

Lupinus mutabilis cv. 2055

Lupinus mutabilis cv. P-13

Lupinus luteus cv. Aurea

Lupinus angustifolius cv. Uniharvest

Glycine max cv. Williams

| Especie bacteriana | Origen |
|-----------------------------------|---------------------------|
| <i>B.sp (Lupinus)</i> L18/C2 | D.G.I.F.T.A.P., Sevilla |
| <i>B.sp (Lupinus)</i> L-750 | D.M.A.C., Uppsala, Suecia |
| <i>B.sp (Lupinus)</i> IM-43B | I.N.I.A., Madrid |
| <i>B.japonicum</i> 3I,1b USDA 110 | Beltsville, Maryland, USA |

Tabla 2.2. Cepas de *Bradyrhizobium* sp.(*Lupinus*) y *Bradyrhizobium japonicum* utilizadas en esta tesis.

2.2.MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO PARA MICROORGANISMOS.

2.2.1.Medio Ty

| | |
|----------------------|--------|
| Triptona | 5 g |
| Extracto de levadura | 1 g |
| Cl ₂ Ca | 0,65 g |
| Ajustar a pH 6,8 | |

2.2.2.Medio M-79 (Vincent, 1970)*

| | |
|---------------------------------------|----------|
| Manitol | 8 g |
| Glicerina | 6 g |
| PO ₄ K ₂ H | 2 g |
| PO ₄ KH ₂ | 1 g |
| NO ₃ NH ₄ | 0,17 g |
| SO ₄ Mg·7 H ₂ O | 0,20 g |
| ClNa | 0,20 g |
| Extracto de levadura | 0,50 g |
| Acido málico | 0,10 g |
| Sequestrene de hierro** | 0,10 ml |
| Agua destilada | hasta 1l |
| Ajustar a pH 6,5-7 | |
| Rojo congo (0,5%)* | 10 ml |
| Azul de bromotimol (0,5% en alcohol) | 1ml |

En estudios de K_M y pH, donde las bacterias se crecieron con NO₃K, éste se añadió a concentración final de 10 mM, y se sustituyeron las fuentes de N por glutamato 10 mM.

* Modificado por Chamber Pérez, M.A., 1979.

** Chamber Pérez, M.A. (1975).

*** Sólo se añadió en medio semisólido.

En ambos medios se añadieron 20 g/l de bacto agar para solidificarlo cuando fue necesario.

2.2.3. Condiciones de cultivo.

2.2.3.1. En medio sólido

Las bacterias se crecieron en tubos de agar inclinado en medio de cultivo M-79 modificado a una temperatura de 28°C. A veces, se usó rojo congo como indicador de crecimiento de contaminantes.

2.2.3.2. En medio líquido

Los cultivos en medio líquido se inocularon a partir de tubos de agar inclinado, resuspendiendo las células en 4 ml de tampón fosfato 0,1 M (pH 7,5) en matraces de 100 ó 250 ml, conteniendo 20 ó 50 ml de M-79 respectivamente.

Los matraces se incubaron a una temperatura de 28°C, durante 7-10 días en un agitador orbital a 400 rpm, hasta alcanzar una concentración $>10^9$ células/ml.

2.3. TAMPONES Y SOLUCIONES

2.3.1. Solución de crecimiento para plantas

Se relacionan las soluciones "stocks":

2.3.1.1. Solución nº1

| | |
|--------------------------------------|-----------|
| ClCa | 60 g |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 64 g |
| SO ₄ K ₂ | 82 g |
| Agua destilada | hasta 1 l |

2.3.1.2. Solución nº 2

| | |
|----------------|----------|
| K_2HPO_4 | 90,5 g |
| Agua destilada | hasta 1l |

2.3.1.3. Solución nº 3

| | |
|-----------------------------------|----------|
| Quelato de hierro (6% Fe^{+3}) | 20 g |
| Agua destilada | hasta 1l |

2.3.1.4. Solución nº 4

| | |
|-------------------------|----------|
| $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ | 7,24 g |
| $FeSO_4 \cdot 4H_2O$ | 30 g |
| H_3BO_3 | 5,72 g |
| $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ | 0,032 g |
| $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 1,76 g |
| $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ | 0,025 g |
| $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ | 0,025 g |
| $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ | 0,025 g |
| KI | 1 g |
| Agua destilada | hasta 1l |

SOLUCIÓN FINAL: 1 ml de cada solución por litro de agua destilada.

2.3.2. Soluciones para homogeneización de nódulos.

2.3.2.1. Tampón fosfato 0,1 M

| | |
|------------------|----------|
| PO_4HK_2 (1 M) | 83 ml |
| PO_4H_2K (1 M) | 17 ml |
| EDTA | 3,72 g |
| Agua destilada | hasta 1l |
| Ajustar a pH 7'5 | |

2.3.2.2. Solución homogenizadora. (Stephens y Neyra, 1983)

| | |
|-----------------------------|----------|
| Sacarosa | 137 g |
| β -Mercaptoetanol | 391 mg |
| PVP | 2 g |
| Tampón fosfato 0,1 M pH 7,5 | hasta 1l |

2.3.3. Soluciones para elución por columna.

2.3.3.1. Tampón A

| | |
|------------------------------|---------|
| Tampón fosfato pH 7'5, 50 mM | 1000 ml |
| DTT | 154 mg |
| EDTA | 1,86 g |
| Cisteina | 121 mg |

2.3.3.2. Tampón B

| | |
|------------------------------|---------|
| Tampón fosfato pH 7'5, 10 mM | 1000 ml |
| EDTA | 0,372 g |
| DTT | 15,4 mg |
| Cisteina | 121 mg |
| Estreptomicina | 500 mg |
| KCl | 7,46 g |
| Glicerina | 100 g |

2.3.4. Soluciones para electroforesis de proteínas.

2.3.4.1. Primera dimensión (IEF)

-Tampón de cubierta:

| | |
|--|------------|
| Urea | 4.8 g |
| Nonidet P-40 (10% en H ₂ O) | 5 ml |
| Anfolines 3-10 | 20 μ l |
| Anfolines 5-7 | 80 μ l |

| | |
|---------------------------------|-------------|
| β -Mercaptoetanol | 0,5 ml |
| Agua destilada | hasta 10 ml |
| Guardar a -70°C | |

-Tampón de lisis:

| | |
|---|------------------|
| Urea | 5.88 g |
| Nonidet P-40 (10% en H_2O) | 2 ml |
| Anfolines 3-10 | $40\mu\text{l}$ |
| Anfolines 5-7 | $160\mu\text{l}$ |
| β -Mercaptoetanol | 0,5 ml |
| Agua destilada | hasta 10 ml |
| Guardar a -70°C | |

-Tampón de equilibrio:

| | |
|-------------------------|--------------|
| Tris-ClH, 0,5 M, pH 6,8 | 12 ml |
| SDS | 2 g |
| β -Mercaptoetanol | 5 ml |
| Glicerol | 10 ml |
| Azul de bromofenol | 0,001 % |
| Agua destilada | hasta 100 ml |

Guardar a temperatura ambiente. Es la misma solución que la de lisis de proteínas para electroforesis unidimensionales.

-Solución de acrilamida IEF:

| | |
|----------------|-------------|
| Acrilamida | 2.84 g |
| Bisacrilamida | 162 mg |
| Agua destilada | hasta 10 ml |

Filtrar. Guardar en oscuridad 4°C máximo 1 mes.

-Solución de ortofosfórico:

2 ml de PO_4H_3 85 % en 3 l de agua destilada.

-Solución de sosa:

0,8 g de NaOH en 1 l de agua destilada.

-Solución de agarosa:

Agarosa al 1 % en tampón de equilibrio

-Gel 1ª dimensión:

| | |
|---|-------------|
| Urea | 5,5 g |
| Solución de acrilamida IEF | 1,3 ml |
| Nonidet P-40 (10% en H ₂ O) | 2 ml |
| Anfolines 3-10 | 0,24 ml |
| Anfolines 5-7 | 0,6 ml |
| TEMED | 7 µl |
| Persulfato amónico (10% en H ₂) | 10 µl |
| Agua destilada | hasta 10 ml |

2.3.4.2.Segunda dimensión.

-Solución de acrilamida:

| | |
|----------------|--------------|
| Acrilamida | 30 g |
| Bisacrilamida | 0,8 g |
| Agua destilada | hasta 100 ml |

Filtrar.Guardar en oscuridad 4⁰C máximo 1 mes.

-Tampón para el gel de resolución:

SDS 0,4 % en tampón Tris-ClH, 1,5 M, pH 8,8

-Tampón de apilamiento

SDS 0,4 % en tampón Tris-ClH, 0,5 M, pH 6,8

-Tampón de electrodos (x5):

| | |
|-------------|--------|
| Trizma base | 15,1 g |
| Glicina | 72 g |
| SDS | 5 g |

Agua destilada hasta 1 l.

Guardar a temperatura ambiente. Para usar diluir 5 veces.

-Gel de resolución*:

| | |
|--|------------|
| Solución de acrilamida | 6 ml |
| Tampón de resolución | 3,75 ml |
| Agua destilada | 5,25 ml |
| TEMED | 10 μ l |
| Persulfato amónico (10% en H ₂ O) | 50 μ l |

-Gel de apilamiento*:

| | |
|--|------------|
| Solución de acrilamida | 0,65 ml |
| Tampón de apilamiento | 1,25 ml |
| Agua destilada | 3,05 ml |
| TEMED | 5 μ l |
| Persulfato amónico (10% en H ₂ O) | 25 μ l |

**Las cantidades corresponden a un gel de 0,75 mm x 14cm x 14 cm, al 12% de acrilamida.*

2.3.5. Soluciones para cuantificar proteínas en geles.

2.3.5.1. Tinción de Coomassie blue.

-Solución fijadora:

| | |
|----------------|--------|
| Metanol | 400 ml |
| Acido acético | 100 ml |
| Agua destilada | 600 ml |

-Solución para teñir:

0,1% Coomassie blue R-250 en solución fijadora

-Solución para desteñir:

| | |
|----------------|--------|
| Metanol | 70 ml |
| Acido acético | 100 ml |
| Agua destilada | 830 ml |

2.3.5.2. Tinción de plata.

-Solución fijadora 1: Igual a la anterior

-Solución fijadora 2:

Glutardialdehido 25% 4 ml

Tampón tetraborato de Na
(19 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ en 960 ml de H_2O) 100 ml

-Solución para teñir:

NaOH 1M 9,2 ml

NH_4OH 9,8 ml

Nitrato de Ag 20% 20 ml

Completar hasta 500 ml con agua bidestilada.

-Solución reveladora:

Etanol absoluto 100 ml

Acido acético 1% 6 ml

Formaldehido 37% 25 μl

Completar hasta 1 l con agua bidestilada.

2.3.6. Soluciones para cuantificar proteínas en medio líquido

2.3.6.1. Reactivo de Benedict:

Se disuelven 17,2 g de citrato sódico y 10 g de carbonato sódico en 50 ml de agua destilada, calentando y agitando suavemente, sin llegar a hervir. Se filtra aun caliente. Por otra parte se disuelven 1,73 g de $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 10 ml de agua destilada, calentando despacio. Se mezclan las dos soluciones en un frasco de 100 ml, se enfría y se completa el volumen hasta 100 ml con agua destilada. Mantener en oscuridad.

2.3.6.2. Solución de Coomassie blue:

Se disuelven 100 mg de Coomassie blue G-250 en 50 ml de etanol al 95%. Se añaden 100 ml de ácido ortofosfórico al 85% y se completa el volumen hasta 1 l. Filtrar y conservar a 4°C.

2.4. FUENTES DE NITRÓGENO

Para ensayar la influencia de varias fuentes de nitrógeno, sobre la expresión de proteínas totales en las distintas razas bacterianas durante su crecimiento en medio sólido, se utilizó un medio base M-79 modificado (se sustituyó el extracto de levadura por glutamato a una concentración final de 10 mM, y se suprimió el NH_4NO_3) al que se añadieron como fuente de nitrógeno uno de los siguientes compuestos: NO_3K , NO_3NH_4 ó ClNH_4 , a una concentración final de 10 mM.

2.5. PREPARACIÓN DE INOCULANTE

Las cepas de *Bradyrhizobium* se crecieron como se ha mencionado. Como soporte se emplearon bolsas de polietileno conteniendo turba de Padul (Granada).

Los cultivos se mezclaron con el mismo volumen de turba (v/p), aproximadamente, hasta una humedad final del 40-45%. Los inoculantes se almacenaron en cámara fría a 4°C.

2.6. CULTIVO DE PLANTAS EN INVERNADERO

Los ensayos de invernadero se llevaron a cabo en jarros Leonard (Vincent, 1970) formados por una botella de vidrio color topacio de 1 l de capacidad con el fondo cortado, colocada

invertida, e introducida por el cuello en un tarro de vidrio de 2,5 l de capacidad. Las botellas contenían un substrato de perlita (Perlabon). Sobre la botella se colocó una placa de Petri para evitar contaminaciones durante su manipulación. Una mecha de algodón pendía desde el interior de la botella hasta tocar la solución nutritiva del jarro. Las unidades de Leonard se esterilizaron en estufa a 170°C durante 60 minutos y la solución nutritiva mediante ebullición a 100°C durante unos 30 minutos. Los jarros, una vez enfriados, se llenaron hasta 4/5 de su capacidad y se humedeció el substrato de la botella con solución nutritiva.

Las semillas, tras esterilizar su superficie durante 20 minutos en alcohol etílico del 70% y 3-4 lavados posteriores en agua estéril, se sembraban en los jarros correspondientes colocando 4-6 semillas en cada uno. A los 3-4 días de la siembra (cuando la semilla empezaba a emerger) se retiraban las placas de Petri y las unidades eran inoculadas, bien con 5 ml de cultivo bacteriano crecido ó bien con 10 ml de una suspensión del inoculante sólido. La perlita se cubrió con una capa de 1 cm de grava seca y estéril para evitar posibles contaminaciones. La solución nutritiva de los jarros se repuso periódicamente, según iba siendo agotada por las plantas. Tras una primera semana de crecimiento, se realizaban aclareos para dejar tres plantas por jarro.

El crecimiento de las plantas se llevó a cabo en invernadero, donde la temperatura oscilaba entre 15 y 29°C, y la humedad se mantenía entre el 60 y el 100%.

2.7.HOMOGENEIZACIÓN DE NÓDULOS

Los nódulos se homogeneizaban en atmósfera de nitrógeno a 4°C en la solución homogeneizadora. La mayoría de los restos nodulares quedaban retenidos en un filtro de tela. La solución obtenida se centrifugaba a 500 g durante 5 minutos. El sobrenadante obtenido se centrifugaba nuevamente a 5000 g durante 20 minutos a 4°C, en una centrífuga Beckman J2-21, para separar los bacteroides del citosol. Tras varios lavados en solución homogeneizadora sin PVP, se resuspendían finalmente en dicho tampón.

2.8.DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS EN ENSAYOS DE INVERNADERO

2.8.1.Actividad nitrogenasa

La actividad nitrogenasa en los nódulos se determinó mediante la técnica de reducción del acetileno a etileno, siguiendo esencialmente el modelo descrito por Turner y Gibson (1980).

Las raíces noduladas provenientes de las unidades de Leonard se introducían en frascos de vidrio de volumen conocido y se cerraban herméticamente con tapones de caucho (Suba-seal). Por medio de una jeringa se retiraba el 10% del volumen total de aire y se sustituía por un volumen igual de acetileno generado a partir de carburo cálcico. Se tomaban muestras de 500 μ l a los 15 y 30 minutos de incubación a 30°C. Las muestras se inyectaban en un cromatógrafo de gases Shimadzu modelo RIA, con columna de Porapak R malla 80-100 de 2 m de longitud, 0'3 cm de diámetro interno a 50°C y provisto de detector de ionización

de llama. El flujo del gas portador (nitrógeno) fue de 25 ml/min, el de aire 200 ml/min, y el de hidrógeno 20 ml/min.

Las señales de salida se recogían en un registrador e integrador Shimadzu RPR-G1. Las actividades se expresaron en μ moles de etileno por hora y peso fresco de nódulos o planta. Para la calibración del cromatógrafo GC se utilizaba una atmósfera de aire conteniendo un 10% de C_2H_2 y 0,1% de C_2H_4 purísimo (S.E.O.), preparada el mismo día.

2.8.2. Liberación de H_2 por las raíces noduladas

La evolución de H_2 en aire fue medida tras incubar las muestras durante 15-30 minutos a 30°C.

Se tomaban 500 μ l de muestra y se inyectaban en el cromatógrafo mencionado anteriormente empleando una columna de acero inoxidable de 0,3 cm de diámetro interno por 200 cm de longitud, conteniendo un relleno de Molecular Sieve 5 A y regulada a 50°C, usando argón como gas portador a un flujo de 25 ml/min. Se utiliza un detector de termoconductividad con un paso de corriente de -60 mA.

La eficiencia relativa de la fijación se calculó de acuerdo con Shubert et al. (1977) como:

$$ER = 1 - \frac{H_2}{C_2H_4}$$

donde: $H_2 = \mu$ moles H_2 / h x g nódulo
 $C_2H_4 = \mu$ moles C_2H_4 / h x g nódulo

2.8.3. Actividad nitrato reductasa

2.8.3.1. En nódulos

Se siguió principalmente el procedimiento de Streeter (1982). Se tomaban 0,1 g de nódulos, los cuales se troceaban e introducían en un tubo de vidrio con 10 ml de una mezcla de reacción, que contenía 0,1 M de NO_3K y 1% de propanol en tampón fosfato 0.1 M, gaseándose con N_2 y tras preincubación en baño María durante 10 minutos a 30°C, se tomaban muestras de 2 ml a los 0, 15 y 30 minutos.

La actividad NR se midió por determinación de nitritos en el medio (método de Nicholas & Nason, 1957), para lo cual se adicionaban volúmenes iguales de las soluciones de Sulfa (10 g de sulfanilamida en 1 l de solución 3M de ácido clorhídrico) y de Neda (200 mg de N:Naftil-estilandiamina-dicloro en 1 l de agua destilada) a un volumen equivalente de muestra. Se centrifugaba 10 minutos a 5000 g y se medía en el sobrenadante el color desarrollado a una $\lambda=540\text{nm}$. Los datos se referían a una curva patrón de nitritos entre 0 y 40 nmoles.

2.8.3.2. En bacteroides

- método del NADH :

Se toman 0,5 ml de la suspensión de bacteroides en tampón fosfato 100 mM (pH 7'5) y se le añaden 20 μl de una solución de nitrato 0,1 M y otros 20 μl de una solución de NADH 5 mM + FAD 10 μM . Se incuba 1 hora a 30°C y se miden los nitritos producidos por el procedimiento mencionado en el apartado anterior.

- método del Metil viológeno :

A 0'5 ml de tampón fosfato 100 mM (pH 7'5), se le añaden 0'2 ml de NO_3K 100 mM, 0'2 ml de metil viológeno 7'5 mM, 0'3 ml de cianato potásico 20 mM y 0'5 ml de muestra. Se gasea con N_2 . Preincubar 10 minutos a 30°C y añadir 0'3 ml de ditionita (50 mg de $\text{S}_2\text{O}_4\text{Na}_2$ + 50 mg de CO_3HNa en 5 ml de agua destilada). Incubar a 30°C durante 15 minutos. Detener la reacción por agitación vigorosa hasta que el color azul desaparezca. La actividad NR se determina igual que anteriormente.

2.8.4. Determinación de proteínas

2.8.4.1. Solubles

Se siguió el método de Bradford(1976). Se toman 5-100 μl de muestra y se llevan hasta un volumen de 100 μl con una solución 0,15 M de ClNa , se añade 1 ml de solución de Coomasie Blue G-250. Agitar, esperar 2 minutos y medir la absorbancia a $\lambda = 595 \text{ nm}$. Los datos se refieren a una curva patrón de sero-albúmina bovina entre 0 y 50 μg .

2.8.4.2. Totales

Se siguió el método de Goa (1953). Se toman 0,3-1 mg de proteína (0,2-0,5 ml de la suspensión bacteriana). Se centrifuga y resuspende el precipitado en 1 ml de agua destilada. Se añaden 4 ml de una solución al 11-26% (dependiendo de la cantidad de proteína) de ácido tricloroacético y se agita. Transcurridos 10 minutos se centrifuga y se descarta el sobrenadante. Repetir de nuevo con 2 ml de ácido. Se dispersa el precipitado en 4 ml de

NaOH al 3% y se calienta hasta que la solución está transparente. Se añaden 0,2 ml de reactivo Benedict y, transcurridos 15 minutos se lee la absorbancia a $\lambda=330$ nm, usando un blanco. Los valores se comparan con una curva standard hecha con sero-albúmina bovina. En caso de tratarse de bacteroides se hace cada muestra con un control sin reactivo Benedict.

2.8.5. Determinación de carbohidratos solubles

Se siguió el método descrito por Streeter (1979). A una muestra de 100 mg de nódulos se le añade 1 ml de etanol 95% y 5 ml de agua destilada. Se hierve durante 15-20 minutos hasta que los tejidos se hayan reblandecido. Se deja enfriar y se completa hasta 10 ml con agua destilada, se eliminan los nódulos y se divide en dos tubos (control y muestra). A cada muestra ya hidrolizada, se le añaden 2 ml de la solución reactiva (77,5 mg de $K_3Fe(CN)_6$ y 3,8 g de $Na_3PO_4 \cdot 12 H_2O$ disueltos en 100 ml de agua destilada). Se hierve 15 minutos, se centrifuga y se mide la absorbancia a $\lambda=422$ nm. Por cada tanda de muestras se prepara un blanco con 100 mg de glucosa. A la muestra control no se le añaden los colorantes.

2.8.6. Peso fresco y nº de nódulos

Tras medir la actividad nitrogenasa y la evolución de H_2 en las raíces noduladas, los nódulos se separaban, se contaban y se determinaba su peso fresco.

2.8.7. Peso seco y contenido en N de la parte aérea de las plantas

La parte aérea se desecaba durante 48 horas en una estufa a 70°C.

La determinación del contenido de N, en muestras secas, molidas y cribadas, se realizó en un InfraAlyzer Technicon-300B, previamente calibrado.

2.9. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR CROMATOGRAFÍA

2.9.1. Solubilización y concentración

Las bacterias se crecían como se indica en 2.2.3.2., hasta una densidad óptica >1. Se recogían células procedentes de 300 ml de cultivo por centrifugación a 5000 g durante 15 minutos. Se resuspendían en 10 ml de tampón fosfato 50 mM y se sonicaban durante 10 minutos en pulsos de 3 segundos de intervalo en un sonicador VIRTIS. Transcurrido este tiempo se solubilizaban con Triton X-100, en una proporción de 0,2 ml detergente/7 ml proteína y se centrifugaba a 15000 g durante 20 minutos. Al sobrenadante obtenido se le añadían 5 ml de una solución saturada al 80% de sulfato amónico a pH 7,5 y se centrifugaba a 20.000 g por 30 minutos. El precipitado se resuspendía en 1 ml de tampón B y se le añadía PMSF a razón de 10 µl/ml. En este punto, la proteína puede ser directamente eluida por la columna o bien congelada a -70°C durante un máximo de 7 días antes de su elución por columna.

Los nódulos se homogenizaban según se indica en 2.7., y se resuspendían los bacteroides en tampón fosfato 0,1 M.

Con las suspensiones obtenidas, libres de detritos celulares, se procedía de forma análoga al mecanismo anteriormente indicado para células en vida libre.

2.9.2. Separación por columna

Se utilizaron tres tipos de columnas: la primera fue de Sephadex G-200, que separa las proteínas por su peso molecular, la segunda fue una resina aniónica fuerte (DOWEX 20-50) que lo hace en razón de su punto isoeléctrico y la última de Hydroxiapatita, que nos permitió separar la NR de otras proteínas del mismo tamaño e igual pI que hubieran migrado con ellas. Para el Sephadex, se utilizó una columna XK 16 de Pharmacia de 45 cm de longitud. En un matraz kitasato se mezcló el Sephadex G-200 con tampón B y se dejó reposar el tiempo suficiente para permitir su hidratación. Por el extremo superior de la columna se añadió lentamente la solución preparada, ayudándonos con una varilla de vidrio para evitar la formación de burbujas, hasta aproximadamente 5 cm del extremo. Se dejó una pequeña capa de eluyente sobre el gel y se tapó la columna con un émbolo provisto de una placa porosa que canaliza la entrada de eluyente. Para equilibrar la columna se pasaron unos 500 ml de eluyente a un flujo de 2 ml/h.

Para la resina DOWEX de intercambio iónico se utilizó una columna KONTES de 55 cm de longitud, que se rellenó hasta una altura de 25 cm con la resina, equilibrándola mediante el paso de 500 ml de tampón B sin KCl, a un flujo de 40 ml/h.

Para la columna de Hydroxiapatita se utilizó una columna SIGMA de 30 cm de longitud y 1,5 cm de diámetro, que se rellenó hasta una altura de 5 cm, equilibrándola mediante el paso de 200 ml de tampón B.

2.9.3. Elución de la muestra

2.9.3.1. En columna de Sephadex G-200:

La muestra una vez preparada, se filtra por $0,45\mu$ ó se centrifuga a 4°C y se aplica en la parte superior de la columna. Se cargan unos 10-15 mg de proteína soluble. La columna se eluye en cámara fría con tampón B y se recogen fracciones de 2 ml mediante un colector Redifrac de Pharmacia.

La actividad NR se mide en una muestra de 0,5 ml a la que se adicionan 20 μl de nitrato potásico 0,1 M y 20 μl de una solución 2,5 mM de NADH en FAD 10 μM . Se incuba a 25°C durante 60 minutos, tras lo cual se añaden 0,25 ml de Sulfa y 0,25 ml de Neda.

Las fracciones activas de cada muestra se juntan y se concentran, bien en un microconcentrador MICROSEP, bien volviendo a precipitar con una solución de sulfato amónico al 80%, hasta un volumen final de 2 ml. Se adicionan 10 $\mu\text{l/ml}$ de PMSF 0,1 M y 2 ml de glicerina, pudiendo ser cargada directamente en la columna de intercambio iónico o congelada a -70°C .

2.9.3.2. En columna DOWEX:

Se sigue el mismo proceso que en la columna de

Sephadex, pero el eluyente es tampón B sin KCl. No fué necesaria una segunda elución con tampón B + 0,1 M KCl, al haberse comprobado que no había retención de proteínas por la resina tras la primera elución. Se recogen fracciones de 2 ml y se determinan aquellas que son activas (por el mismo procedimiento anterior), que posteriormente serán concentradas en tubos MICROSEP.

2.9.3.4. En columna de Hydroxiapatita:

Se sigue el mismo proceso anterior, pero el eluyente es tampón B.

2.10. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS MEDIANTE GELES DE ACRILAMIDA

Se hicieron electroforesis en geles de acrilamida, para averiguar el PM de las distintas NR así como su punto isoeléctrico. Para ello se siguieron los métodos de Laemmli (1970) y O'Farrell (1975), respectivamente.

2.10.1. Electroforesis bidimensional (O'Farrell, 1975).

Las muestras de proteínas purificadas se llevaron hasta la concentración adecuada de urea y anfolitos (indicada en el tampón de lisis), y se centrifugaron a 15000 g durante 10 minutos. El sobrenadante se guardó a -70°C hasta su utilización.

Las electroforesis se realizaron en una cubeta vertical Hoeffler, modelo SE-600. La primera dimensión se desarrolló durante 18 horas a 400 V y una hora a 800 V. Para la segunda se aplicaron 15-20 mA por gel durante 4-5 horas y se usaron geles de acrilamida del 12%. Los calculos

de pI se hicieron tomando como referencia un gel constituido por tres marcadores de pI, de 3'6, 6'6 y 9,3.

2.10.2. Electroforesis SDS-PAGE (Laemli, 1970).

Para la preparación de las muestras, se concentró 10 veces el cultivo celular y se resuspendieron las células en tampón de equilibrio, calentándose posteriormente a 100°C, durante 5 minutos.

Las electroforesis se desarrollaron en un gradiente de acrilamida del 10 al 15%. El voltaje aplicado fue el mismo que en la segunda dimensión de las bidimensionales. Cada gel estaba formado por 10 calles de corrida, una de las cuales correspondía a los marcadores de PM (β -galactosidasa =116kD, fosforilasa B=97'4kD, albúmina bovina=66kD, albúmina de huevo=45kD, anhidrasa carbónica=29kD, α -lacto-albúmina=14'2 kD), a partir de los cuales se determinaron los PM de las bandas que formaban cada una de las muestras.

2.10.3. Detección de proteínas mediante tinción:

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se teñían por medio de la tinción de Coomasie blue. Para ello, se introducía el gel durante 30 minutos en la solución fijadora. Posteriormente se mantenía por 60 minutos en la solución de tinción, tras lo que se lavaba varias veces con la solución de desteñir.

En la mayoría de los casos se usaba la tinción de plata, 100 veces más sensible que la anterior. Para ello el gel se introducía en la solución fijadora 1 durante 30

minutos, y se lavaba posteriormente 2 veces con agua desionizada, 20 minutos cada vez. A continuación se fijaba 15 minutos con glutaraldehído y se lavaba tres veces con agua desionizada (20 minutos cada lavado). Mientras, se prepara la solución de plata: a 95 ml de agua se le añadían 9,2 ml de NaOH y 9,8 ml de NH_4OH . Lentamente (es explosiva la mezcla de reacción) se añadían 20ml de nitrato de plata al 20% y se completaba hasta 500 ml con agua desionizada. Se sumergía el gel en esta solución por 20 minutos. Posteriormente se lavaba 5 minutos con agua desionizada y se introducía en la solución reveladora hasta que aparecían claramente las bandas. Si la tinción era demasiado intensa se podía desteñir con el reductor de Farmer (880 ml de agua + 10ml de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ al 20% + 10 ml de $\text{K}_3(\text{Fe}(\text{CN})_6)$ al 1%).

2.10.4. Secado de los geles en papel de celofán.

Después de la tinción, con el fin de conservar los geles para su posterior análisis, se secaban en papel de celofán. Para ello, se introducían durante 15 minutos en una solución al 70% etanol + 3% de glicerina y posteriormente se lavaban dos veces durante 15 y 45 minutos respectivamente, en una solución al 3% de glicerina. Con esta misma solución se empapaba el papel de celofán y se recubría un cristal de electroforesis. Se ponía el gel encima y, sobre él otra hoja de papel celofán previamente impregnada en la misma solución, teniendo cuidado de que no se formaran burbujas. Se dejaba dos ó tres días hasta que el gel estaba completamente seco.

2.10.5. Análisis de los geles.

Los geles se analizaron mediante un scanner Hewlett Packard y un programa de ordenador para cuantificación densitométrica de proteínas (QUANTISCAN de BIOSOFT).

2.11. DETERMINACIÓN DE pH ÓPTIMOS

A partir de alícuotas de 0,5 ml de cultivo celular o de suspensión de bacteroides se recogieron las células por centrifugación. Posteriormente se resuspendieron en tampón fosfato 0,1 M, en un rango de pH comprendido entre 6 y 8,6, y se añadieron 50 μ l de NO_3K 0,1 M y 20 μ l de NADH 5 mM más FAD 10 μ M. La mezcla de reacción se incubó durante 60 minutos a 30°C, añadiéndose 0,25 ml de Sulfa y 0,25 ml de Neda. La actividad se determina por colorimetría a $\lambda=540$ nm en el sobrenadante obtenido por centrifugación de la mezcla de reacción.

2.12. CURVAS DE K_M

Para averiguar la K_M de las enzimas se tomaron alícuotas de 0,5 ml de suspensión de bacterias o bacteroides. Las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 0,5 ml de tampón fosfato 0,1 M a pH óptimo. A esta suspensión se le añadieron 20 μ l de NADH 5 mM más FADH 10 μ M, y concentraciones crecientes de NO_3K (desde 0 a 500 μ M). Las mezclas de reacción se dejaron incubando a 30°C hasta que el nitrato se agotó, añadiéndose posteriormente 0,25 ml de Sulfa y 0,25 ml de Neda. Se centrifugó 10 minutos a 5000 rpm y se midió la actividad colorimétrica a una $\lambda=540$ nm.

2.13. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todos los análisis estadísticos se realizaron con programa MSTAT (Michigan State University, USA), empleándose diversos subprogramas, tales como ANOVA factorial, correlación, regresión lineal, etc.

3. RESULTADOS

3.1.- ESTUDIOS SOBRE LAS INTERACCIONES PLANTA-RIZOBIO BAJO LOS EFECTOS DEL NITRATO

Con el fin de evaluar la influencia de tres factores (especie vegetal, raza de *Bradyrhizobium* y fertilización nitrogenada) sobre la actividad nitrato reductasa en los nódulos, principalmente en el bacteroide, así como su relación con la fijación simbiótica de nitrógeno y sus respectivos efectos sobre la productividad de las plantas, se idearon ensayos de invernadero bajo condiciones físicas y bacteriológicas controladas, utilizando jarros Leonard (Vincent, 1970). Debido al volumen de material y espacio requeridos para estos estudios, se realizaron en tres experimentos diferentes. Todos los parámetros examinados se analizaron estadísticamente.

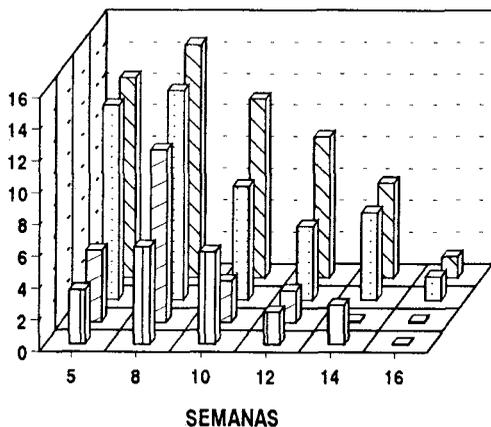
3.1.1. Relación entre la fijación simbiótica de Nitrógeno y la actividad nitrato reductásica (ANR) en los bacteroides de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*)

Se diseñó un primer ensayo para estudiar las relaciones entre las actividades de la nitrogenasa (medida como reducción de acetileno), y las ANR de dos cepas de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) (IM-43B y L-750), seleccionadas por poseer un elevado potencial fijador de N₂ en ausencia de fuentes combinadas de nitrógeno sobre *L.albus* (Serrano y Chamber, 1990). Se ensayaron dos concentraciones de nitrato (0 y 8 mM). Se llevó a cabo un seguimiento de las plantas a lo largo de 16 semanas, durante las cuales se hicieron 6 controles periódicos a partir de la quinta semana después de su siembra.

En la figura 3.1.1A, aparecen las actividades nitrogenásicas específicas (SARA) de dichas cepas en ausencia y en presencia de nitrato. La cepa L-750 mostraba valores ligeramente mayores que IM-43B cuando no había nitrato, sin embargo, la presencia de 8 mM-NO₃⁻ hacía que su actividad decayera de forma más rápida que la de IM-43B. Los valores de $\mu\text{M C}_2\text{H}_4\text{xh}^{-1}\text{xg}^{-1}$ nódulo para todos los tratamientos mantenían patrones similares, correspondientes a una curva de Gauss; aunque como era de esperar, la adición de nitrato provocó una drástica disminución en la reducción de acetileno, dando lugar a actividades inferiores a la mitad de las obtenidas sin N combinado. Las Eficiencias Relativas de la nitrogenasa (Fig.3.1.1B) seguían una trayectoria prácticamente constante durante todo el período estudiado, aunque la cepa L-750 al principio del ensayo daba valores significativamente menores a los de la otra raza. Las actividades hidrogenásicas (Fig.3.1.1C) siguieron patrones similares a las de las SARA; así, se vieron diferencias significativas entre cepas con una F de ANOVA muy alta (216 a $p < 0,001$) y entre tratamientos nitrogenados ($F=110$). Hay que señalar una mayor capacidad recicladora del H₂ en IM-43B que en la otra cepa, sobre todo en la fase más temprana de la simbiosis, lo que confirmaría los datos presentados en la Fig. 3.1.1B. Las ANR en los bacteroides aislados de los nódulos (Fig. 3.1.1D) disminuía durante la primera mitad del ensayo aumentando posteriormente, siguiendo una trayectoria de tipo gaussiano invertida, en oposición a la que se observaba en la Fig.3.1.1A para las actividades nitrogenásicas. Las ANR fueron significativamente mayores para la cepa L-750 que para la IM-43B en ausencia de nitrato, probablemente debido a que la primera raza posee ANR

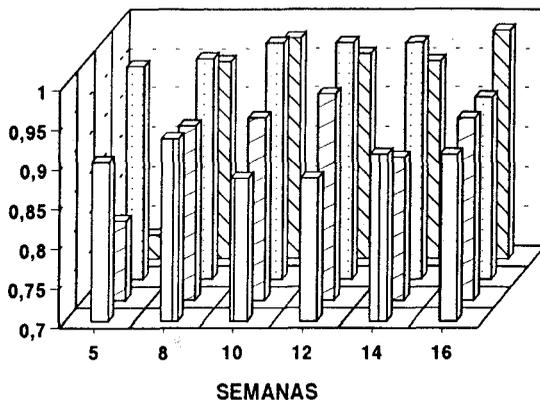
A - ACTIVIDAD NITROGENASICA

($\mu\text{M C}_2\text{H}_4/\text{h} \cdot \text{g nódulo}$)



LSD(.05)=2,7

B - EFICIENCIAS RELATIVAS DE LA NITROGENASA

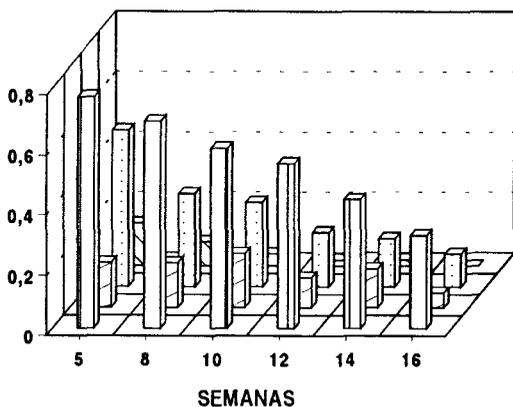


LSD(.05)=0,10

IM-43B(8mM N) **750(8mM N)** **IM-43B(0 N)** **750(0 N)**

C - ACTIVIDAD HIDROGENASA

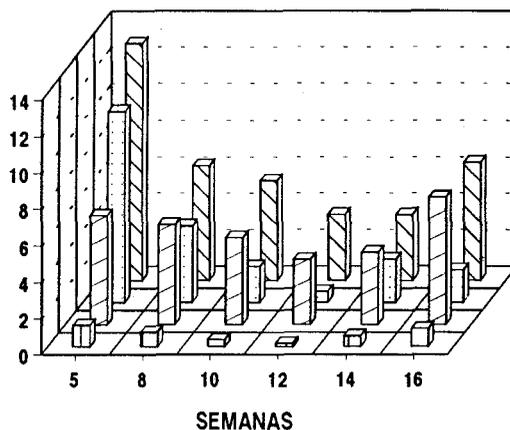
($\mu\text{M H}_2/\text{h} \cdot \text{mg proteína}$)



LSD(.05)=0,13

D - ACTIVIDAD NITRATO-REDUCTASICA

($\text{nM NO}_2/\text{h} \cdot \text{mg proteína}$)



LSD(.05)=1,82

IM-43B(0N) **750(0 N)** **IM-43B(8mM N)** **750(8 mM N)**

Fig.3.1.1: Actividades enzimáticas en el nódulo y en bacteroides, relacionadas con el metabolismo del N (fijación y reducción de nitrato)

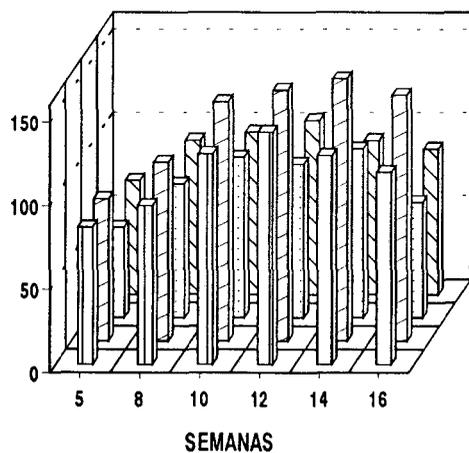
constitutiva e inducida, mientras que la segunda sólo manifiesta una ANR inducida (Serrano y Chamber, 1990).

Los carbohidratos solubles presentes en el citosol nodular aumentaban con el tiempo de crecimiento (Fig.3.1.2A), siendo los contenidos significativamente menores cuando se añadió nitrato, y observándose una bajada de los mismos al final del período estudiado, esto es, los hidratos de carbono describen también una curva tipo campana, en este caso del mismo signo que las de las SARA, aunque los valores máximos se obtuvieron en un control más tardío; cabe señalar que los nódulos producidos por la cepa L-750 obtuvieron más carbono de las plantas que los de IM-43B, cuando éstas se desarrollaron en ausencia de N combinado. En general, el contenido en proteínas disminuyó a lo largo del crecimiento de las plantas (Fig.3.1.2B), sin que se encontraran diferencias significativas debidas a los niveles de nitrato; por el contrario, la F de ANOVA para las diferencias entre cepas rizobianas fue significativo a $p < 0,01$, mostrando generalmente siempre la cepa L-750 contenidos superiores a las de la IM-43B. El análisis de las relaciones carbono/nitrógeno proteínico en los citosoles nodulares (Fig.3.1.2C) presentaba aumentos de tipo lineal durante todo el período de estudio en las plantas crecidas sin N combinado, siguiendo una curva de tipo exponencial en aquellas plantas crecidas con nitrato.

Se establecieron las correlaciones (R) entre los distintos parámetros estudiados, no encontrándose R estadísticamente significativa entre las ANR y la fijación de N_2 (SARA), por el contrario, $R = -0,49$ y altamente significativo entre las actividades absorbedoras de hidrógeno (Hup^+) y las ANR. De igual

A - CARBOHIDRATOS SOLUBLES

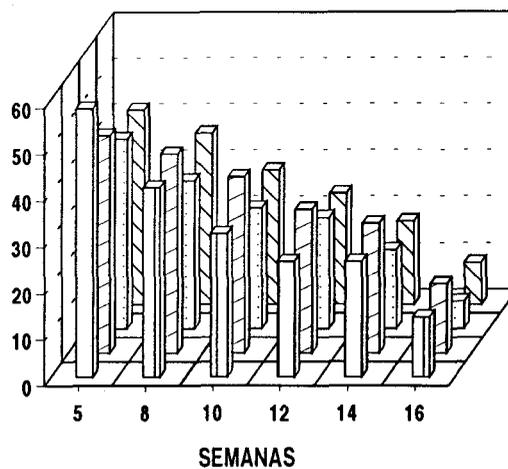
(mg glucosa/g nódulo)



LSD(.05)=19,5

B - PROTEINAS

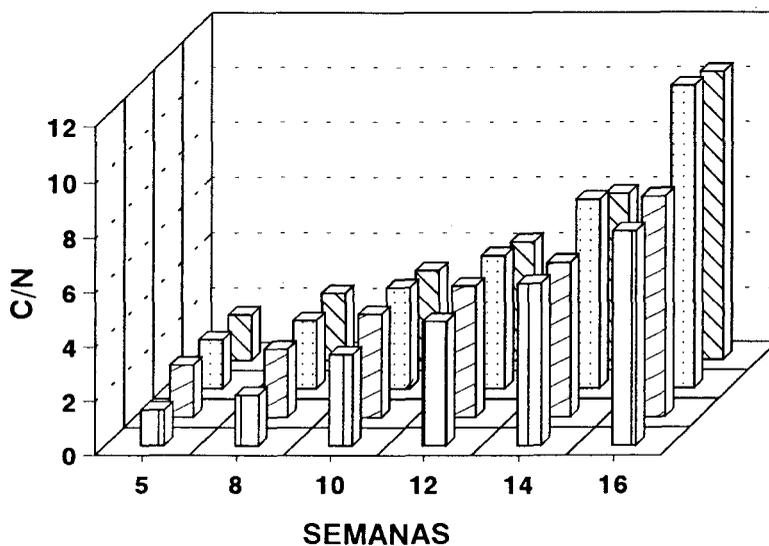
(mg BSA/g nódulo)



LSD(.05)=5,7

IM-43B(0N)
 750(0 N)
 IM-43B(8mM N)
 750(8 mM N)

C- Balance Carbono:Nitrógeno

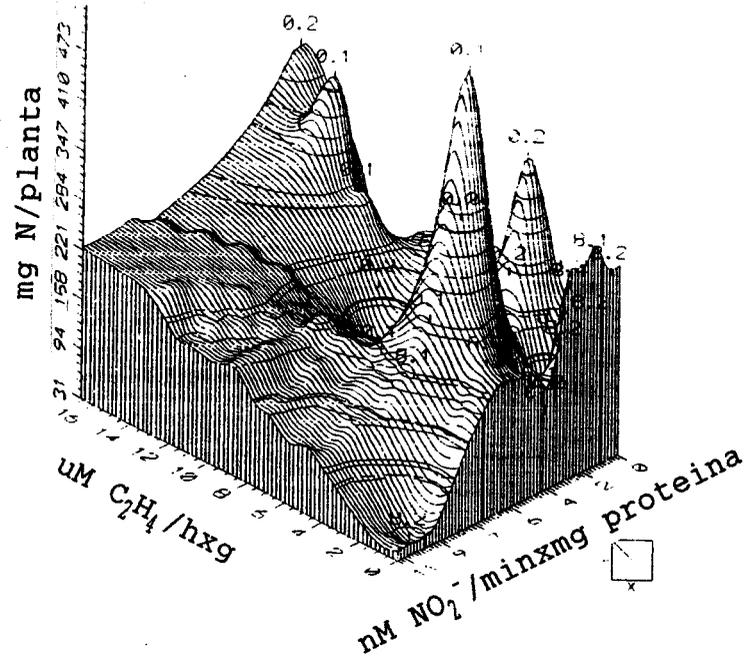


LSD(.05)=1,6

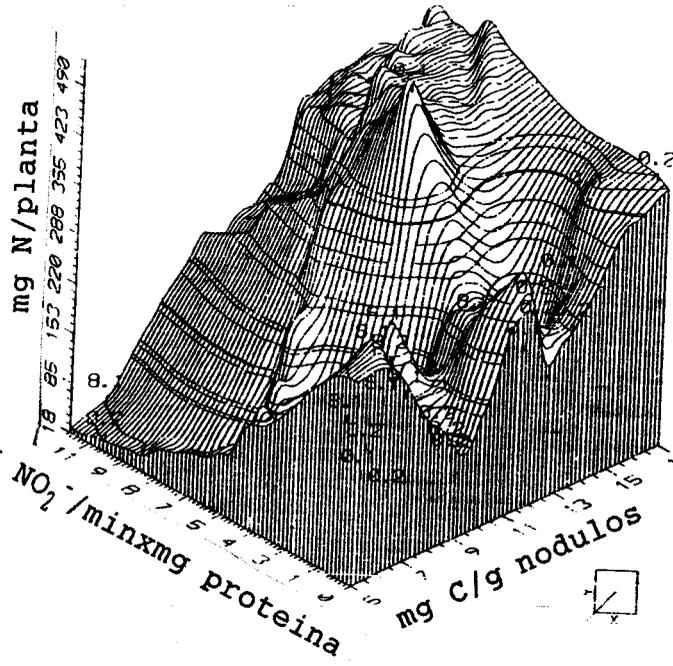
Fig.3.1.2: Contenidos en componentes carbonados y nitrogenados solubles en los citosoles nodulares.

modo, al correlacionar mediante un programa de ordenador (SURFER) dos cualesquiera de los parámetros estudiados con la productividad de las partes aéreas (mg N/planta) mediante un análisis tridimensional, encontramos con respecto a la ANR de los bacteroides y la SARA, que los rendimientos tendían a aumentar cuando las plantas crecían exclusivamente a expensas de la fijación de N_2 (Fig.3.1.3A), aunque hubo un grupo de tratamientos que produjeron los rendimientos más elevados a niveles bajos de SARA y medios de ANR, todos ellos correspondientes a la cepa poseedora de NR constitutivas. Por otro lado, se obtuvieron bajos rendimientos por planta cuando los contenidos de carbono en el nódulo decayeron por efecto del N combinado o de la edad de la planta, aun existiendo niveles altos de ANR en los bacteroides (Fig.3.1.3B); no obstante, cuando los contenidos en C mejoraban, los rendimientos en N por planta crecían proporcionalmente a las ANR, es decir, que a niveles normales de C en los citosoles, las productividades de las plantas eran directamente proporcionales a las de reducción de nitratos por los bacteroides. Por último, si relacionábamos los cocientes carbono:nitrógeno en citosoles, con las ANR en los bacteroides y sus influencias sobre los rendimientos nitrogenados de las plantas (Fig.3.1.3C), se observaba que estos últimos variaban en consonancia con las relaciones C/N en el nódulo; asimismo, cuando las C/N poseían valores elevados, la presencia de ANR mejoraba los rendimientos de las plantas; cabría pensar en un efecto complementario de las ANR bacteroidales sobre el suministro en N a la planta cuando las concentraciones de proteínas solubles son relativamente bajas en el nódulo.

A



B



C

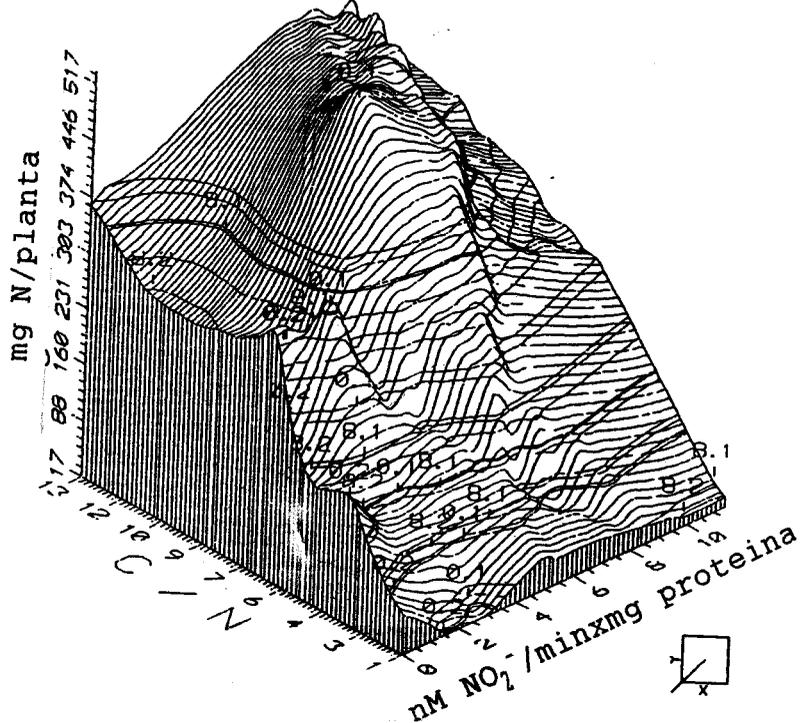


Fig.3.1.3: Interrelaciones entre la productividad (mg N/planta) y actividad NR con otros parámetros (sin N=0.1 ó 0.2, 8mM N=8.1 ó 8.2; cepa L-750=0.1 ó 8.1, IM-43B=0.2 ó 8.2)

3.1.2.- Efecto de la leguminosa hospedadora sobre la nodulación y las actividades fijadoras de N₂ y NR del nódulo

Para este tipo de estudios se seleccionaron cuatro especies de *Lupinus* en base a su interés agrícola: *L.albus*, *L.luteus*, *L.angustifolius* y *L.mutabilis*, haciéndolas crecer bajo dos niveles de nitrato (0 y 5 mM) e inoculándolas con dos cepas de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*): L-750 y L-18/C2, previamente caracterizadas como poseedoras de actividades NR (Serrano y Chamber, 1990). Las plantas se cosecharon 50 días después de su inoculación.

Cabe destacar las diferencias en cuanto al tamaño de los nódulos producidos por las distintas especies (Fig.3.1.4A). Las especies *L.luteus* y *L.angustifolius* desarrollaban escaso número de nódulos de gran tamaño, contrariamente a lo que ocurría en *L.albus* y *L.mutabilis*, donde los nódulos eran más numerosos pero pequeños. Como era de esperar, en todas las especies de altramuza y en ambas razas de rizobios, el peso de nódulos fue mayor cuando las plantas crecieron en ausencia de nitrato (Fig.3.1.4B). *L.luteus* y *L.angustifolius* fueron las especies que desarrollaron biomasa nodular mayor.

Con respecto a la actividad de la nitrogenasa en las raíces noduladas (Fig.3.1.5) aparecían diferencias significativas por los efectos de los tres factores estudiados (especie de *Lupinus*, raza de *Bradyrhizobium* y nivel de nitrato), tanto si se expresaba por gramo de nódulo (SARA) como por planta (TARA), siendo especialmente elevadas las diferencias debidas a la especie (F=18'0 a p<0,001), como consecuencia de que *L.luteus* alcanzaba valores de N₂ fijado muy superiores a los de las otras

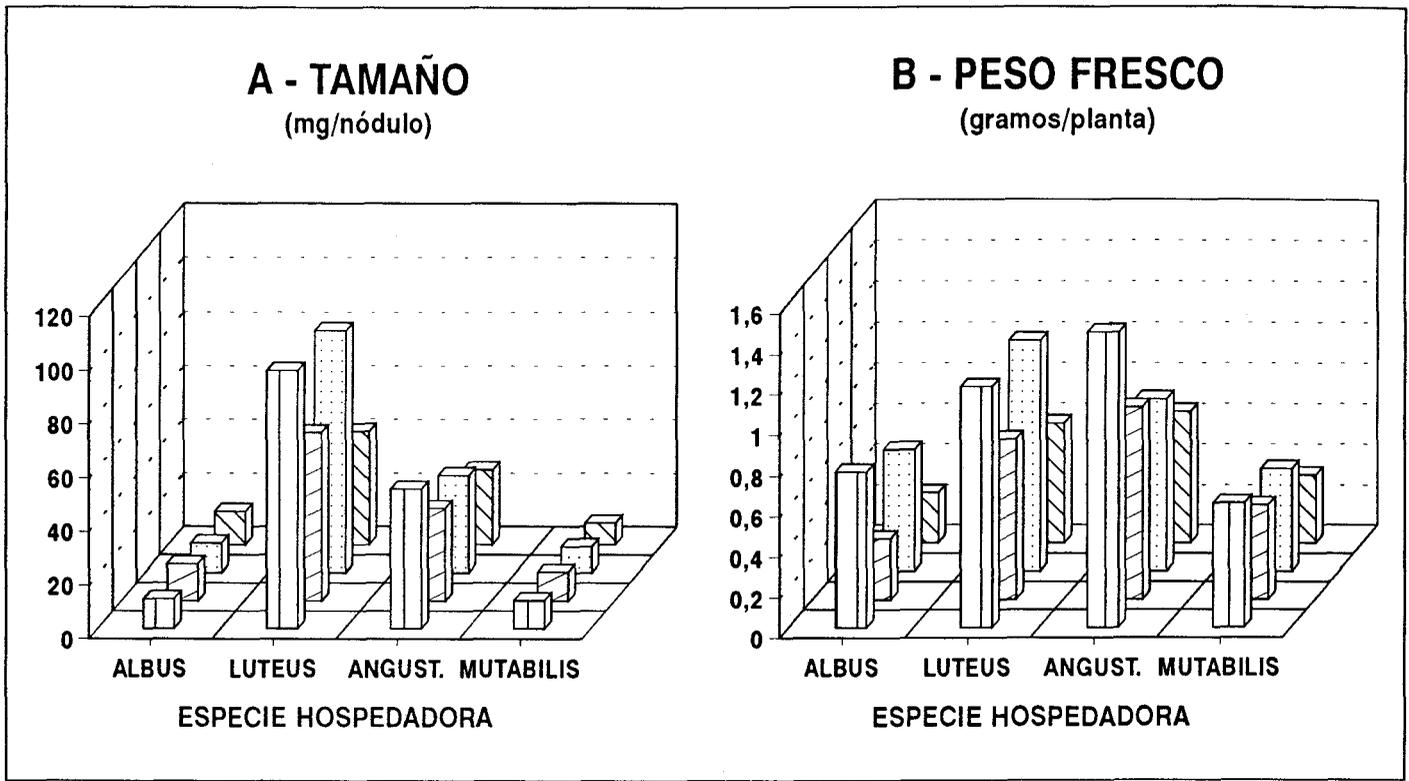


Fig.1.4: Nodulación radicular

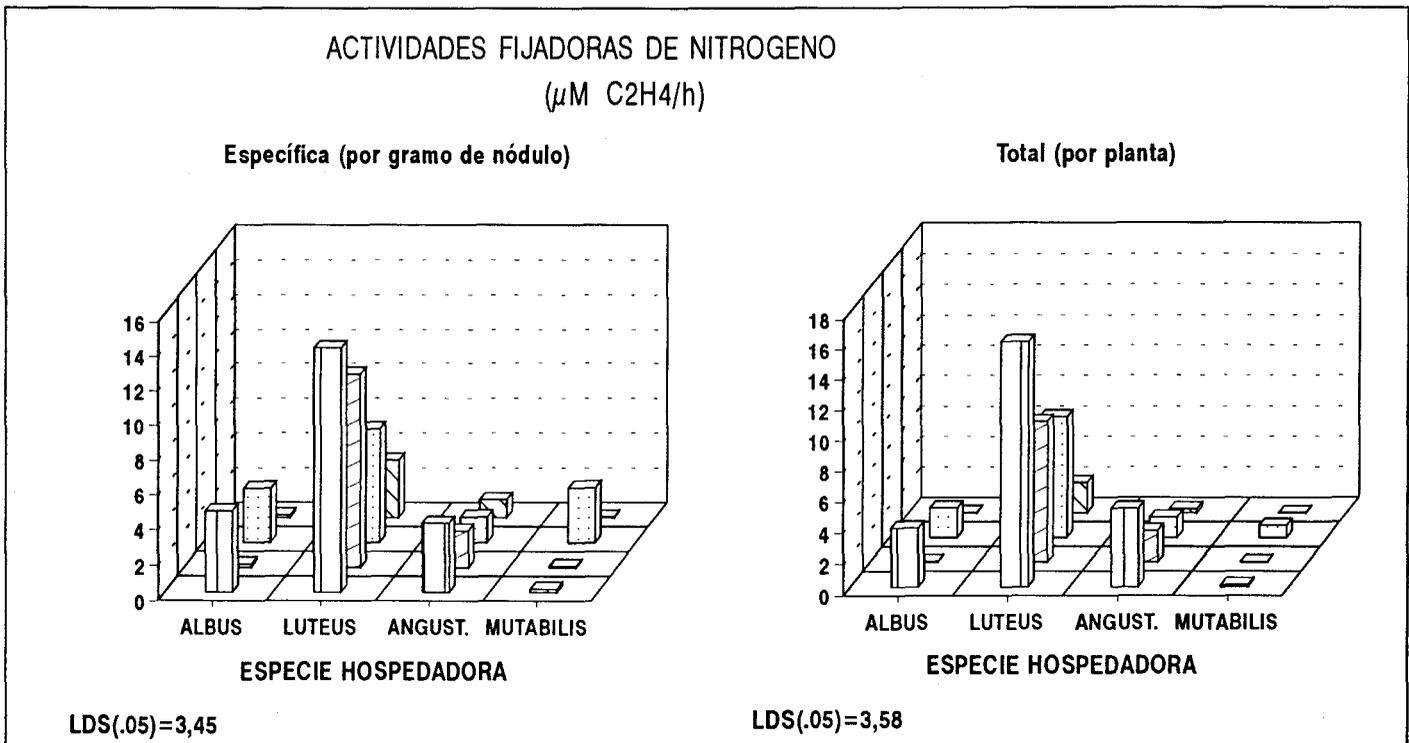
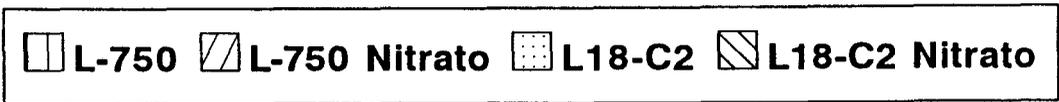


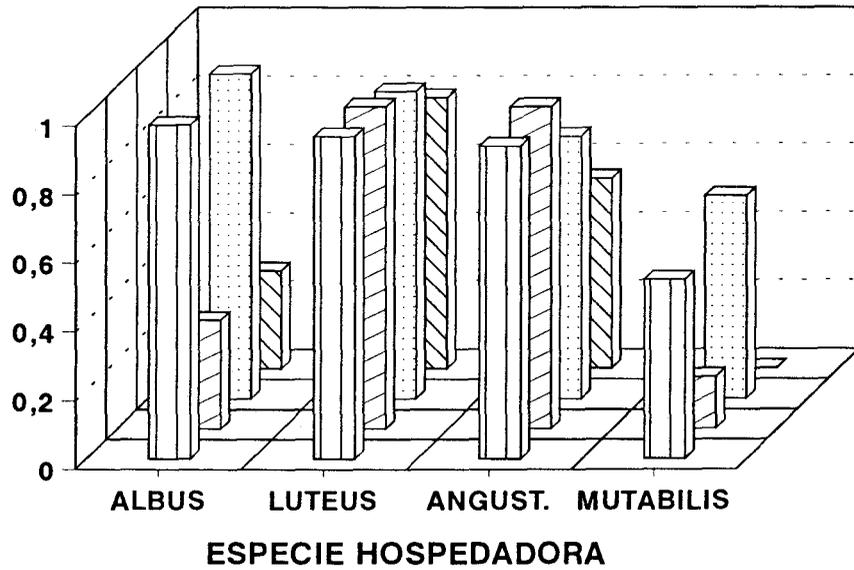
Fig.3.1.5: Actividades fijadoras de N_2 en nódulos de *Bradyrhizobium* sp (*Lupinus*).

especies, y en particular cuando crecía en medio carente de nitrato. Cabe destacar la fuerte disminución en la actividad fijadora en presencia de N combinado sobre *L.albus*. *L.mutabilis* presentó actividad fijadora apreciable sólo con la cepa L-18C2 en ausencia de nitratos.

Las Eficiencias Relativas (Fig.3.1.6A), también mostraban diferencias significativas para las especies de *Lupinus* ($F=18,6$; $p<0,01$), siendo *L.mutabilis* la menos eficiente, sobre todo en presencia de nitrato. El efecto depresor debido al nitrato también fue significativo sobre *L.albus* y *L.mutabilis*, por el contrario *L.luteus* y *L.angustifolius* obtuvieron los picos más altos en todas las combinaciones de los tres factores, e incluso en algún caso aumentaban la eficiencia en presencia de nitrato si la cepa nodulante era L-750, probablemente porque la cantidad de H_2 liberado aumentaba en menor proporción que en las otras especies, lo cual se traducía en un aumento de la ER. En la gráfica 3.1.6B, correspondiente a las ANR, quedan reflejadas las diferencias, que fueron significativas a $p<0,001$ con F de ANOVA muy altas para la especie vegetal y el nitrato. La adición de este último al medio producía un aumento de unas 5 veces en las ANR cuando la planta hospedadora era *L.luteus*, se duplicaba en *L.albus* y *L.angustifolius*, y no se vio afectada en *L.mutabilis*. En presencia de nitrato, *L.luteus* desarrolló unas actividades mucho más altas que las otras especies, mientras que en ausencia del mismo no hubo diferencias significativas de ANR entre las distintas especies de altramuz.

En cuanto a las producciones en N de la parte aérea (Fig.3.1.6C), las cuatro especies de *Lupinus* siguieron patrones

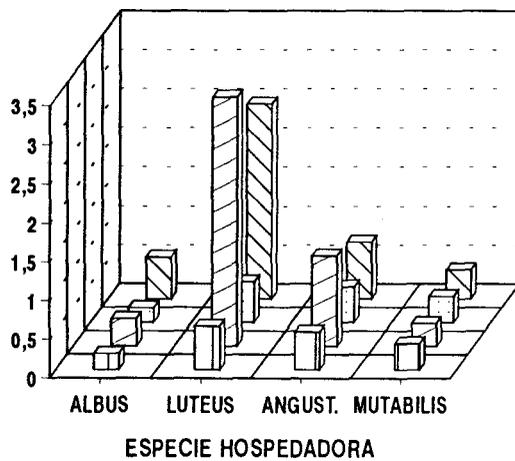
A - EFICIENCIA RELATIVA DE LA NITROGENASA



LDS > 0,2

L-750
 L-750 Nitrato
 L18-C2
 L18-C2 Nitrato

B - ACTIVIDAD NITRATO-REDUCTASICA ($\mu\text{M NO}_2\text{-h}^{-1}\text{g n\u00f3dulo}$)



LSD(.05)=0,92

C - CONTENIDO DE NITROGENO EN LA PARTE AEREA (mg N/planta)

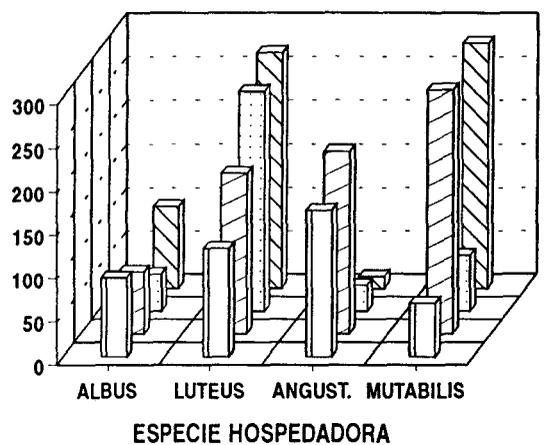


Fig.3.1.6: ER y ANR en n\u00f3dulos de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*). Productividad en N de la parte a\u00e9rea.

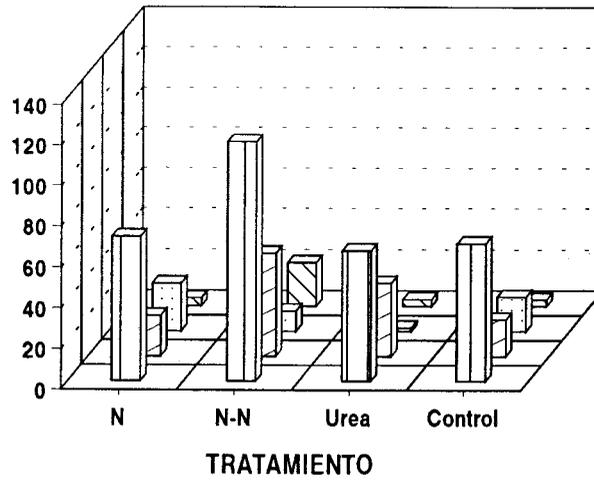
muy distintos: *L.mutabilis* aumentó considerablemente el contenido en N al añadir nitrato al medio igual que *L.luteus*, aunque en esta especie el efecto fue menos acusado; *L.angustifolius* mostró una cierta especificidad por la cepa L-750, disminuyendo los rendimientos de forma muy notable cuando la planta estaba nodulada por L18/C2. Por último, *L.albus* no varió significativamente el contenido en N bajo ningún tratamiento.

3.1.3. Efecto de distintos compuestos nitrogenados en el medio nutritivo sobre las ARA y ANR de los bacteroides en los nódulos

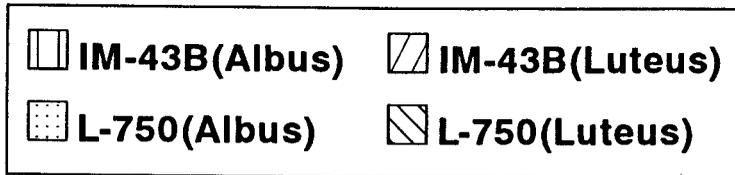
En este ensayo se determinó la influencia del tipo de N combinado (nitrato o amoniacal) en el medio nutritivo sobre el comportamiento de dos cepas de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*): IM-43B y L-750, ambas Hup⁺ (Murillo et al., 1989), y sobre dos especies de *Lupinus* diferentes, seleccionadas a partir de los resultados de los ensayos mencionados en los apartados anteriores: *L.luteus*, que mostró los valores más altos en todos los parámetros estudiados y *L.albus*, al ser de mayor valor agronómico por sus rendimientos en grano. La solución nutritiva para las plantas fue suplementada con uno de los tres siguientes compuestos: nitrato potásico, nitrato amónico o urea, cada uno a la concentración final de 5 mM N.

La determinación de las biomásas nodulares reveló que IM-43B produjo significativamente mayor número de nódulos que L-750 (Fig.3.1.7A), sobre todo cuando la leguminosa era *L.albus*; sólo el caso L-750 x urea mostró una disminución del número de nódulos en los tratamientos nitrogenados frente al tratamiento control; la adición de nitrato amónico no solo no inhibió la nodulación, sino que la aumentó en relación al resto de los tratamientos, incluyendo el control sin N combinado; la adición de nitrato potásico aumentó el número de nódulos cuando esta misma especie fue nodulada por la cepa L-750. En cuanto al peso fresco de nódulos por planta (Fig.3.1.7B), éstos disminuyeron en todos los tratamientos nitrogenados con la raza IM-43B, como cabía esperar; sin embargo, el NN no dañó la nodulación originada por L-750. En general, se apreciaron unos efectos inhibidores más acentuados

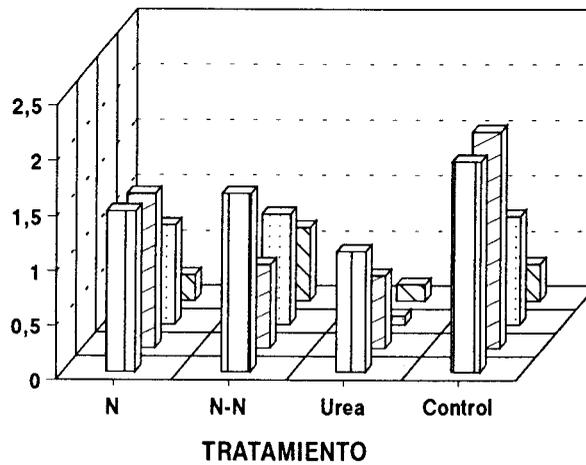
A - NUMERO
(nódulos/planta)



LSD(0,05)=16



B - PESO FRESCO
(gramos/planta)



LSD(.05)=0,62

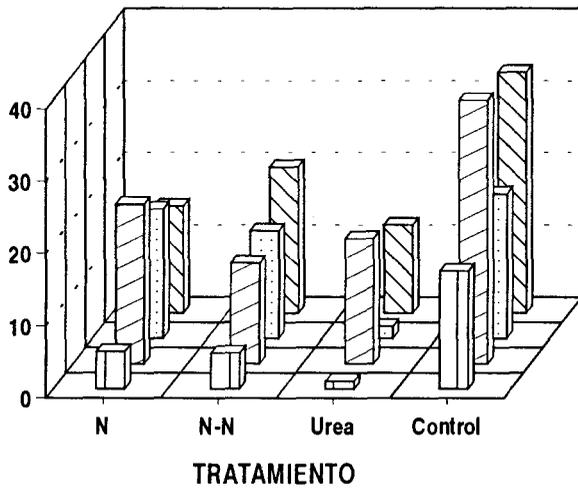
Fig.3.1.7: Nodulación radicular, nitrato potásico (N), nitrato amónico (N-N) y urea a 5 mM. Control=sin adición de fuente nitrogenada.

por la adición de compuestos nitrogenados sobre el desarrollo de la biomasa nodular que sobre el número de puntos de infección puestos a disposición de los rizobios por la planta.

En la figura 3.1.8A se muestran las actividades de la nitrogenasa por gramo de nódulo (SARA). Según el ANOVA realizado, existen diferencias significativas en cuanto a los tres factores (tratamiento nitrogenado, raza bacteriana y especie de *Lupinus*) todos ellos a una $p < 0,001$; siendo en *L.luteus* donde aparecían las F más significativas, tal vez porque esta especie se muestra con un potencial fijador de N_2 mucho mayor que *L.albus* en general; la adición de cualquier fuente nitrogenada hacía que la nitrogenasa se inhibiese parcialmente, siendo este efecto más acusado en la raza IM-43B en relación con los controles sin N. De igual modo, la actividad fijadora de N_2 es prácticamente indetectable en la combinación urea x *L.albus*, denotando una alta sensibilidad de esta especie hacia los compuestos amoniacales cuando éstos se encuentran a concentraciones similares al nitrato. Las Eficiencias Relativas (Fig.3.1.8B) no mostraron grandes diferencias por la presencia de compuestos nitrogenados en el medio, aunque *L.albus* x IM-43B disminuyó su ER a causa del amonio. El daño causado por la urea a la simbiosis L-750 x *L.albus* hizo que no fuera posible detectar su ER. En la figura 3.1.8C se presentan las ANR de los bacteroides, las cuales mostraban diferencias significativas con respecto a los tres factores estudiados; destacaba en todos los casos el valor de las ANR desarrolladas por los bacteroides *L.luteus*, ya que en ellos la adición de cualquier compuesto nitrogenado, en especial nitrato potásico suponía un aumento significativo de las mismas.

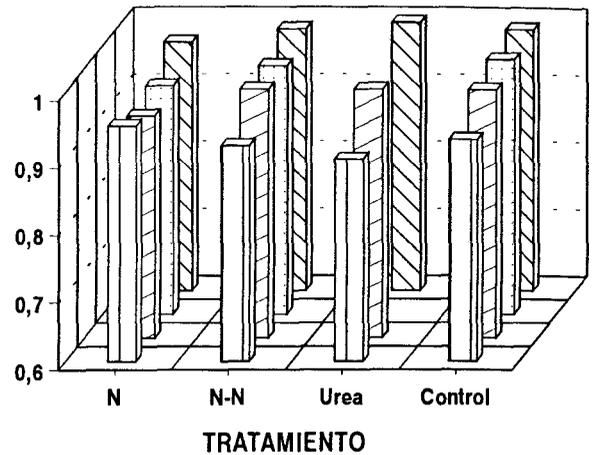
A - ACTIVIDAD FIJADORA DE NITROGENO

($\mu\text{M C}_2\text{H}_4/\text{h}\cdot\text{g n\acute{o}dulo}$)

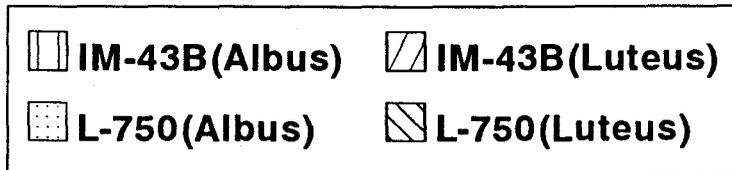


LSD(.05)=5,11

B - EFICIENCIAS RELATIVAS DE LA NITROGENASA

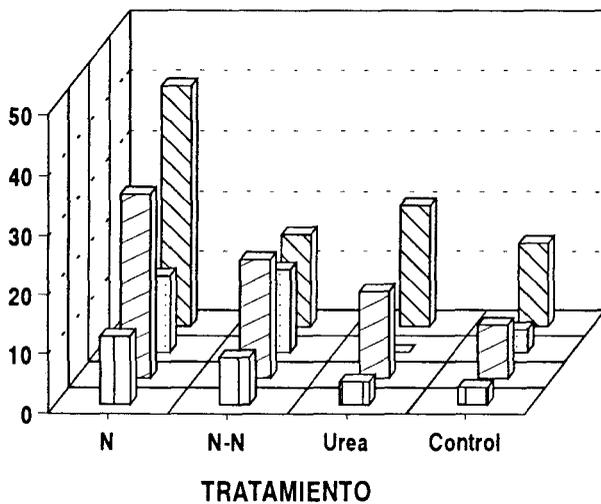


LSD(.05)=0,02



C - ACTIVIDAD NITRATO-REDUCTASICA

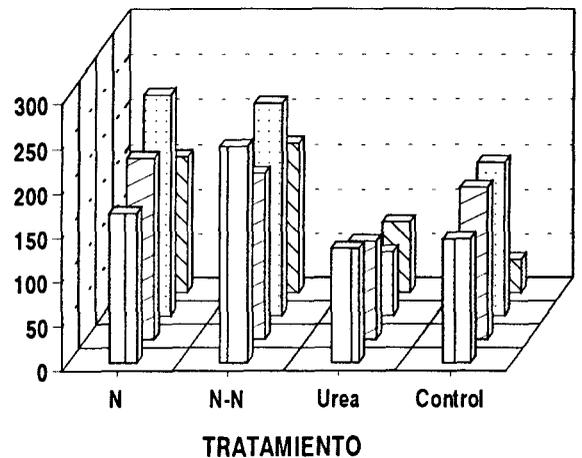
(nM $\text{NO}_2/\text{h}\cdot\text{mg proteina}$)



LSD(.05)=5,3

D - CONTENIDO DE NITROGENO EN LA PARTE AEREA

(mg N/planta)



LSD(.05)=67

Fig.3.1.8: Actividad N_2 asa y ANR en bacteroides de *Bradyrhizobium* sp.(*Lupinus*). Productividad en N de la parte aérea bajo varios tratamientos nitrogenados.

L.albus sólo produjo ANR con niveles semejantes a los de *L.luteus* con la raza L-750, y únicamente bajo la adición de ambos tipos de nitrato (potásico y amónico). Finalmente, se analizó el efecto de los tres factores sobre la productividad de la parte aérea de las plantas (Fig.3.1.8D), de este modo se apreció que se producía un incremento significativo con respecto a los controles al añadir tanto nitrato amónico como potásico a la solución nutritiva. Por el contrario, la adición de urea disminuía significativamente el contenido en N de ambas especies.

3.2. DETERMINACIÓN DE LAS CINÉTICAS DE REACCIÓN DE LOS DISTINTOS TIPOS DE NITRATO REDUCTASA EN BRADYRHIZOBIUM spp

3.2.1. Estudio comparativo de MV y NADH como donadores de electrones

Previamente a los estudios sobre la cinética de reacción de las NR, se realizaron unos tests para determinar qué compuesto entre los posibles donadores de electrones originaba una mayor actividad enzimática. Los ensayos sobre la bioquímica de las enzimas NR conllevan la utilización de una metodología que nos permita una estimación lo más real posible de sus actividades; para ello, necesitamos contar entre los componentes del medio con una fuente apropiada que actúe de donadora de electrones, tales como los piridín nucleótidos (NADH, NADPH) o los viológenos (benzil viológeno, metil viológeno, etc).

En la Tabla 3.2.1, se muestran las actividades NR de los bacteroides de dos razas de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) IM-43B y L-750, y otra de *B. japonicum* (USDA-110), utilizando dos tipos de donadores (MV y NADH). Se puede apreciar que cuando las razas USDA-110 y L-750 crecían en medio sin N combinado, NADH era más efectivo como donador, esto es, cuando la mayor parte de los nitritos eran producidos por una actividad de tipo constitutiva; por el contrario, los valores obtenidos utilizando MV eran más elevados cuando las células habían crecido con nitrato, ésto es cuando se generaba "de novo" una proteína NR, mostrando las células de *B. japonicum* una mayor preferencia por el MV. Sin embargo, en la raza IM-43B, las actividades mostraban valores similares con ambos compuestos cuando crecían con N combinado en

el medio y fue prácticamente indetectable con NADH en ausencia del mismo. Esta última raza posee mayoritariamente NR de tipo inducido, pero la ANR constitutiva debe tener un comportamiento bioquímico diferente al de las otras razas probadas (ver apartado 3.1.1).

Tabla 3.2.1: Actividad nitrato reductásica en bacteroides de *B. japonicum* y *Bradyrhizobium* sp (*Lupinus*) utilizando distintos donadores de electrones.

ACTIVIDAD NITRATO-REDUCTASICA*
(μ moles NO_2 /h*mg proteína)

| Especie | Raza | 0 mM nitrato | | 5 mM nitrato | |
|------------------------|----------|--------------|-------|--------------|-------|
| | | MV | NADH | MV | NADH |
| <i>B. japonicum</i> | USDA-110 | 1,21 | 3,5 | 1,10 | 0,157 |
| <i>B. sp (lupinus)</i> | L-750 | 0,72 | 3,07 | 0,26 | 0,166 |
| <i>B. sp (lupinus)</i> | IM-43B | 0,55 | 0,045 | 0,42 | 0,366 |

* Valores medios sobre 4 repeticiones.

3.2.2. Determinación del pH óptimo.

Se han estudiado los pH óptimos de la enzima nitrato reductasa de dos especies de *Bradyrhizobium* [*Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) L-750 y *B. japonicum* USDA-110] tanto en cultivos de células en vida libre (0 y 10 mM de nitrato), como en sus bacteroides aislados de nódulos de plantas crecidas bajo dos niveles de nitrato (0 y 5mM).

En la figura 3.2.1 se muestran los pH óptimos de las enzimas NR de las razas USDA-110 y L-750, en distintos momentos durante

Fig.3.2.1: Actividades NR de las razas USDA-110 (A) y L-750 (B), en el rango de pH 6'6-8'6, durante su crecimiento en medio líquido sin nitrato.

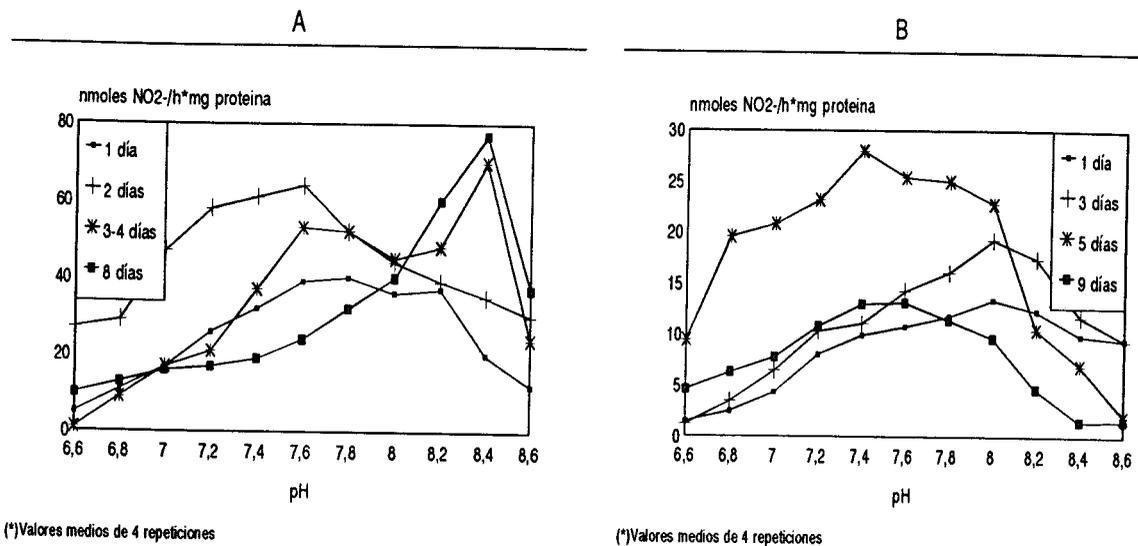
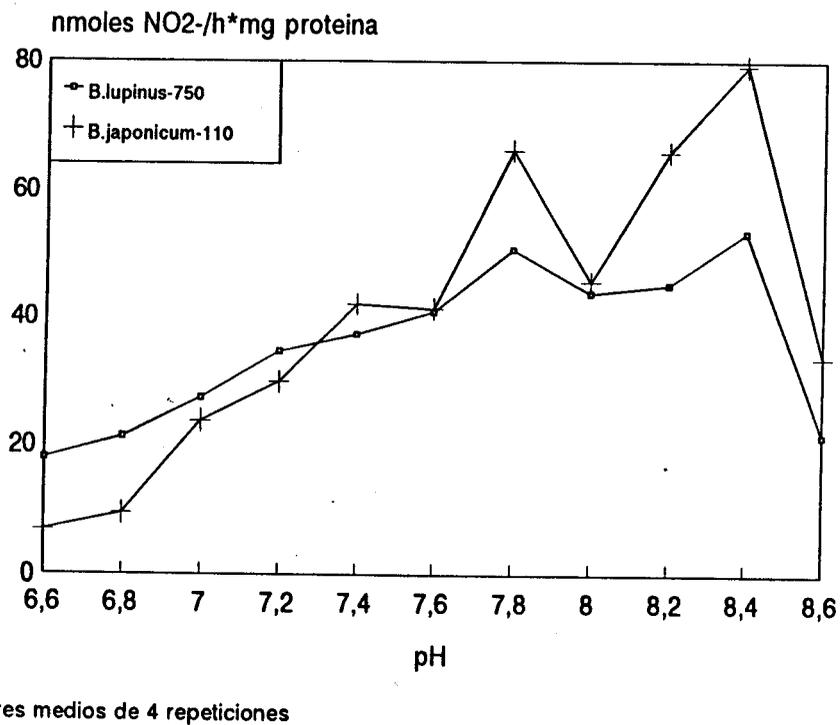


Fig.3.2.2: Valores de pH óptimo de las razas de *Bradyrhizobium* spp. crecidas a una concentración de 10 mM de NO₃.

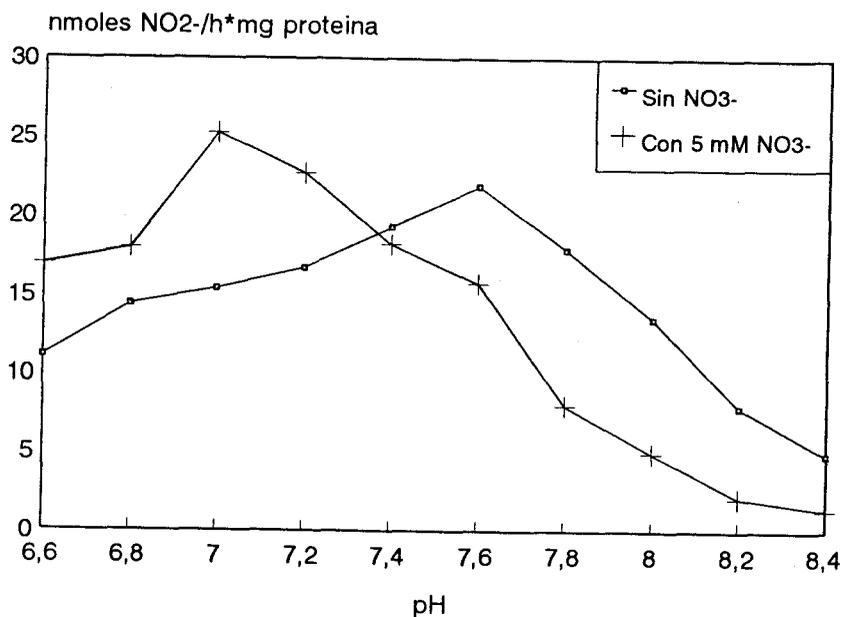


su crecimiento en medio líquido sin nitrato, usando glutamato como fuente de nitrógeno. Como se aprecia en la figura 3.2.1A, los máximos de actividad NR iban variando a lo largo del tiempo de crecimiento de la raza US-110, así, aparecía un pH óptimo de 7'4-7'6 en células en la fase logarítmica de crecimiento; conforme aumentaba la edad del cultivo iba desapareciendo este pico y aparecía un nuevo pH óptimo en 8'2-8'3, que era el único presente cuando el cultivo llegaba a la fase estacionaria (más de 8 días). Por el contrario, en la raza L-750 (Fig.3.2.2B) aparecía un pH óptimo de 8'0 al principio del cultivo (1 y 3 días de crecimiento) y, a medida que las células iban envejeciendo, el pH óptimo pasaba a ser de 7'4, valor que se mantenía en cultivos ya en fase estacionaria.

Cuando las células se hacían crecer en medio líquido y en presencia de una concentración 10 mM de nitrato hasta su fase estacionaria (Fig.3.2.2), se observaban dos valores de pH óptimo en ambas especies de *Bradyrhizobium* a pH 7'8 y pH 8'4, respectivamente, siendo estos dos picos significativamente más pronunciados en las células de *B.japonicum*. Por tanto, las ANR de ambos *Bradyrhizobium* presentan en vida libre unos pH óptimos muy similares.

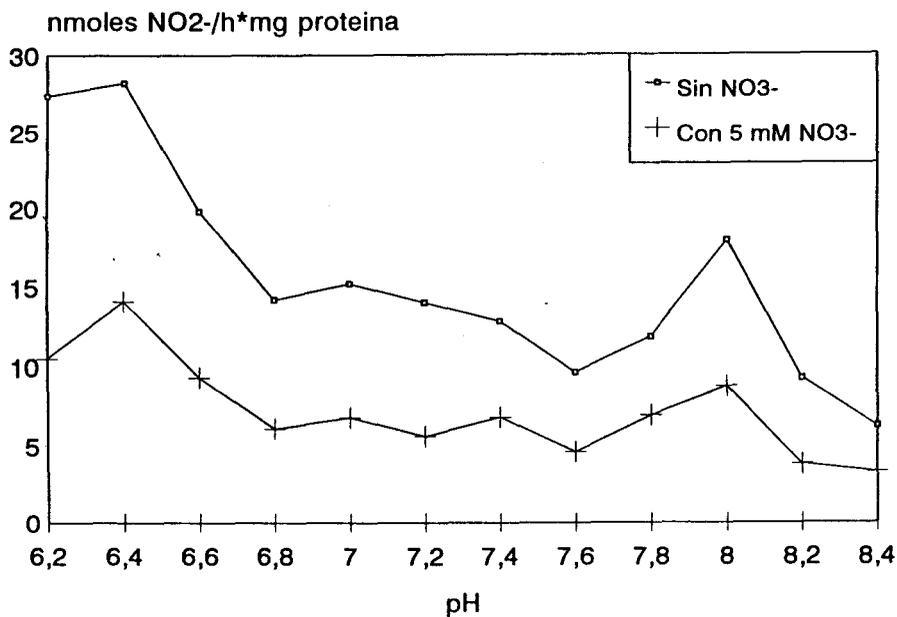
Estos mismos ensayos realizados en bacteroides aislados de plantas crecidas sin y con 5 mM de nitrato se representan en las figuras 3.2.3 y 3.2.4. La primera de ellas se refiere a los bacteroides de la raza L-750, donde encontramos un pH óptimo para cada tipo de desarrollo. Así, en bacteroides de plantas sin N combinado las actividades máximas aparecieron a pH 7'6, mientras que cuando aquéllas se desarrollaban en presencia de nitratos el

Fig.3.2.3: Valores de pH óptimos en bacteroides de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) L-750, aislados de plantas de altramuz crecidas a 0 y 5 mM de nitrato.



(*)Valores medios de 4 repeticiones

Fig.3.2.4: Valores de pH óptimo en bacteroides de *B.japonicum* USDA-110 aislados de plantas de soja, crecidas a 0 y 5 mM de nitrato.



(*)Valores medios de 4 repeticiones

pH óptimo de actividad NR era en torno a 7'0. Sin embargo, en los bacteroides de USDA-110 no influía la presencia de nitratos, mostrando la NR en ambos tratamientos dos pH óptimos de actuación (6'4 y 8'0). Es de destacar las respuestas totalmente diferentes de las ANR en los bacteroides de *Bradyrhizobium sp(Lupinus)* a las de los de *B.japonicum* ante la presencia de nitratos en el medio.

3.2.3. Determinación de K_M

La K_M de una enzima es una medida de su afinidad por un sustrato, por lo tanto dicha K_M es específica para cada tipo de complejo enzima-sustrato, aunque puede variar en función de otros factores, tales como el pH al que se desarrolle la reacción. En la Tabla 3.2.2 se detallan los valores de K_M de las diferentes NR que aparecen tanto en las bacterias crecidas en vida libre, como en bacteroides aislados de nódulos crecidos sin/con nitrato a los pH óptimos descritos en el apartado anterior.

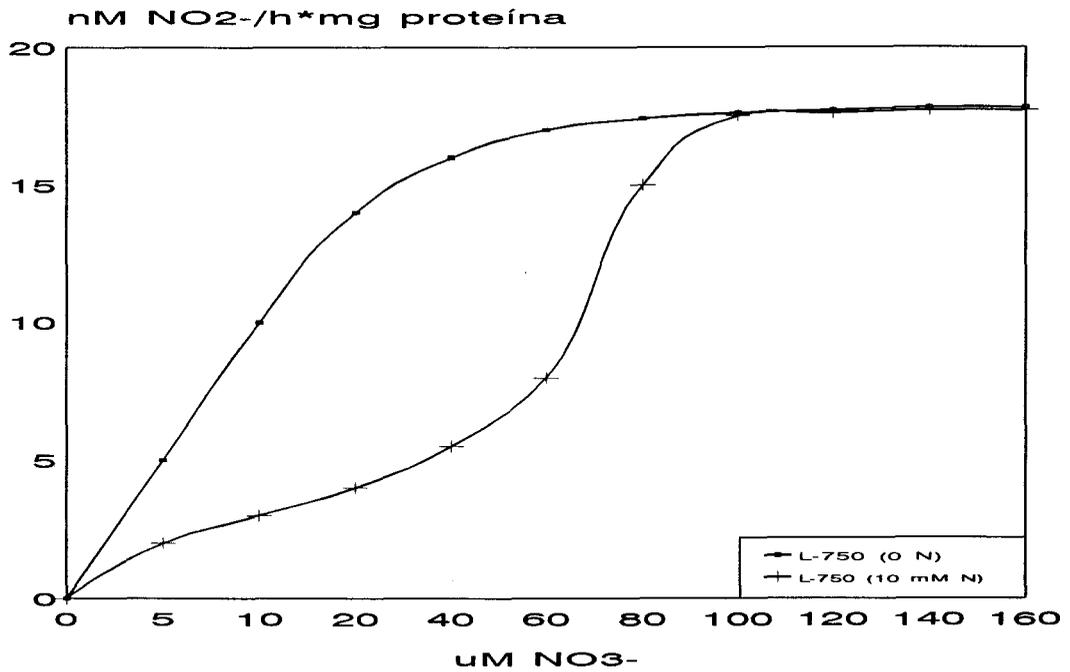
| | Bacterias | | | | Bacteroides | | | |
|-----------------------------------|-----------|-------|---------|-------|-------------|-------|---------|-------|
| | Nitrato | | | | Nitrato | | | |
| | 0 mM | | 10 mM | | 0 mM | | 5 mM | |
| | pH opt. | K_M | pH opt. | K_M | pH opt. | K_M | pH opt. | K_M |
| <i>B. japonicum</i> (USDA-110) | 7,6 | 13 | 7,8 | 116 | 6,4 | 35 | 6,4 | 20 |
| | 8,4 | 3,6 | 8,4 | 122 | 8,0 | 125 | 8,0 | 93 |
| <i>B. sp (lupinus)</i> (L-750) | 7,4 | 16,8 | 7,8 | 79 | 7,6 | 45 | 7,0 | 25 |
| | 8,0 | 12,8 | 8,4 | 69 | | | | |

Tabla 3.2.2: Valores de K_M ($\mu\text{M NO}_3^-$) de las NR de bacterias y bacteroides a sus pH óptimos de actuación en presencia (5 ó 10 mM) o ausencia de nitrato.

Como observamos en la tabla, en bacterias en vida libre crecidas en ausencia de nitrato en el medio de cultivo, aparecían con valores bajos de K_M que se obtuvieron de curvas que seguían la cinética de MM. Cabe destacar que la adición de nitrato al medio hizo que variasen tanto las K_M , como los tipos de curva que pasaron a ser sigmoidales, típicas de enzimas que muestran un comportamiento alostérico ó cooperativo, según se muestra en la Fig.3.2.5 a modo de ejemplo, para las bacterias en vida libre de la raza L-750. Como consecuencia de este comportamiento la velocidad del enzima varió muy poco a concentraciones pequeñas de sustrato, lo que provocó que las K_M aumentasen, pasando de niveles de 3,6-16,8 μM , a oscilar entre 69 y 122 μM .

En cuanto a los bacteroides se refiere, en los provenientes de nódulos de altramuz aparecían unas K_M , a los dos pH óptimos ensayados, que eran ligeramente diferentes entre sí y que seguían la cinética de MM. Por otra parte, en los provenientes de soja aparecían dos K_M distintas para ambos pH (6'4 y 8'0) y para ambas concentraciones de nitrato (0 y 5 mM). Así, la enzima que poseía menor pH óptimo (6'4) también daba valores de K_M bajos y seguía una cinética tipo MM, mientras que aquella que actuaba preferentemente a pH alto (8'0) mostraba unos valores elevados de K_M (93-125) y su curva correspondía a un comportamiento típicamente alostérico.

Fig.3.2.5: Ejemplo del comportamiento de las enzimas NR de la raza L-750 a pH 7'4.



(*) Valores medios de 4 repeticiones

3.3 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS DISTINTOS TIPOS DE NITRATO REDUCTASA EN BRADYRHIZOBIUM spp

Tras la caracterización cinética de los distintos tipos de NR en células de *Bradyrhizobium* [*Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) L-750 y *B. japonicum* USDA-110], se planteó la necesidad de caracterizarlas bioquímicamente, determinando sus pesos moleculares (PM) y sus puntos isoeléctricos (pI). Para ello se hicieron pasar los extractos celulares por tres tipos de columnas cromatográficas: una de exclusión molecular (Sephadex G-200), con la que obtuvimos una purificación de 5-7 veces; otra de intercambio aniónico (DEAE), que nos proporcionó una purificación de 12-19 veces y una tercera de hidroxapatita, donde la purificación osciló en un rango de 145-160 veces. Los porcentajes de recuperación, las actividades específicas y la purificación obtenida en cada paso se muestran en la Tabla 3.3.1. Tras su paso por la primera de las columnas se determinaron sus PM, y tras su paso por la segunda sus pI, confirmándose posteriormente los resultados mediante electroforesis SDS-PAGE (Laemmli, 1970) y de doble dimensión (O'Farrell, 1972), respectivamente. Los ensayos se hicieron tanto en bacterias en vida libre como en bacteroides aislados de sus respectivas leguminosas hospedadoras.

| Paso | PM (kD) | Prot. (mg) | NRA(nM NO ₂ ⁻ /h) Total | Purific./mg (veces) | Recuper (%) | |
|---|------------|---------------|--|------------------------|----------------|-------|
| Células enteras | --- | 120,00 | 372,0 | 3,1 | 1,0 | 100,0 |
| (NH ₄) ₂ SO ₂ ppdo. | --- | 41,40 | 277,4 | 6,7 | 2,2 | 74,6 |
| Sephadex G-200 | 362 | 4,29 | 90,4 | 22,1 | 7,1 | 24,3 |
| | 88 | 4,79 | 79,2 | 16,4 | 5,2 | 21,2 |
| DEAE | 362 | 0,65 | 38,0 | 58,5 | 18,9 | 10,2 |
| | 88 | 1,44 | 53,1 | 36,9 | 11,9 | 14,3 |
| Hidroxiapatita | 362 | 0,068 | 30,9 | 454,4 | 146,5 | 8,3 |
| | 88 | 0,034 | 17,3 | 511,3 | 164,9 | 4,7 |

Tabla 3.3.1. Purificación de NR constitutivas de bacteroides de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*)

3.3.1. Determinación de los PM de las NR de las bacterias

3.3.1.1. En bacterias crecidas con/sin nitrato

Los datos obtenidos al pasar las muestras bacterianas por la columna de Sephadex G-200 se muestran en la Tabla 3.3.2. En ella se apreciaba, que al crecer las células de las estirpes USDA-110 y L-750 con una concentración 10 mM de nitrato en el medio de cultivo aparecían cuatro tipos de NR, cuyos PM se encuentran en torno a los 90, 180, 360 y 720 kD. La actividad enzimática específica de estas iba aumentando proporcionalmente a su PM, lo que hace pensar en un efecto de tipo asociativo o cooperativo como se ha mencionado en el apartado anterior.

Con respecto a las células que crecieron en ausencia de nitrato, observamos que sólo aparecen dos tipos de NR (NR_c), cuyos PM son de unos 90 y 360 Kd, lo cual no hace pensar que las NR de 180 y 720 kD sean NR_i. En estas condiciones de crecimiento sin nitrato, las actividades de ambas enzimas apenas difieren

entre sí, aunque muestran valores significativamente superiores a los observados cuando las ANR eran inducidas en medio con nitrato, lo que significa una mayor afinidad por el sustrato.

Como se ha indicado anteriormente, los PM se confirmaron mediante electroforesis. Para ello se concentraron las muestras obtenidas en la columna de Sephadex y se corrió un gel de SDS-PAGE al 10 % de acrilamida, donde apareció una única banda de un PM aproximado de 73 kD (Fig.3.3.1), lo que corrobora la idea de que las cuatro NR están formadas un monómero del mismo PM.

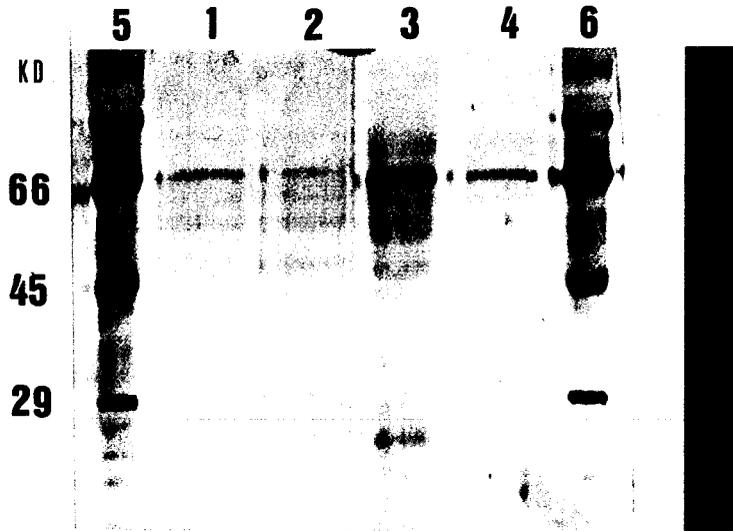
| ESPECIE | Nº PICO | NITRATO (mM) | PM* (kD) | ANR* ($\mu\text{M NO}_2/\text{h} \cdot \text{mg prot.}$) |
|--------------------------------|---------|-----------------|--------------|---|
| <i>B.japonicum</i> USDA-110 | 1 | 0 | ----- | ----- |
| | | 10 | 707 \pm 26 | 24.7 \pm 5.2 |
| | 2 | 0 | 365 \pm 15 | 46 \pm 5 |
| | | 10 | 365 \pm 15 | 20.4 \pm 8.1 |
| | 3 | 0 | ----- | ----- |
| | | 10 | 177 \pm 10 | 15.9 \pm 4.5 |
| | 4 | 0 | 89 \pm 5 | 43 \pm 4 |
| | | 10 | 89 \pm 5 | 12.1 \pm 4.6 |
| <i>B.lupinus</i> L-750 | 1 | 0 | ----- | ----- |
| | | 10 | 730 \pm 29 | 60.7 \pm 22 |
| | 2 | 0 | 361 \pm 18 | 44 \pm 7 |
| | | 10 | 361 \pm 18 | 25.2 \pm 8.7 |
| | 3 | 0 | ----- | ----- |
| | | 10 | 180 \pm 10 | 11.9 \pm 3.5 |
| | 4 | 0 | 94 \pm 4 | 31 \pm 9 |
| | | 10 | 94 \pm 4 | 18.2 \pm 6.4 |

Tabla 3.3.2: PM y actividades específicas de las enzimas NR de células de *B.japonicum* y *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*), crecidas bajo concentraciones 0-10 mM NO_3^- .

* Valores medios de 20 repeticiones.

Fig.3.3.1: Electroforesis en SDS-page de las NR constitutivas e inducidas de *B.japonicum*, tras su purificación por columnas DOWEX, DEAE e hidroxapatita.

1,2= NR constitutivas de 90 y 360 kD, respectivamente.
3,4= NR inducidas de 180 y 720 kD, respectivamente.
5,6= Marcadores de PM



3.3.1.2. En bacterias en distintas fases de crecimiento

De los resultados obtenidos en el apartado 3.2. se desprendía la idea de que dependiendo de la fase de crecimiento del cultivo, se manifestaban unas u otras enzimas NR con distintos pH óptimos y K_M . Para comprobar estos hechos se hicieron crecer células tanto de *B.japonicum* USDA-110 como de *Bradyrhizobium* sp.(*Lupinus*) L-750 durante 3 y 10 días, se determinaron por cromatografía de exclusión molecular los tamaños de las NR que aparecían, y se analizaron las actividades respectivas.

Los resultados que se muestran en la Tabla 3.3.3 nos permiten ver que en células de *B.japonicum* de 3 días de crecimiento se obtuvo una actividad NR tres veces mayor en la enzima de alto PM (360 kD) que en el monómero de 90 kD, mientras que la actividad resultó algo mayor en este último tras diez días de cultivo. Por otra parte, en células de *Bradyrhizobium* sp.

(*Lupinus*) L-750, vemos que a los tres días de crecimiento, la actividad NR es mayor en el pico correspondiente a la proteína de 90 kD, mientras que en cultivos ya en fase estacionaria la actividad mayor se corresponde con el pico de 360 kD. Por tanto, el comportamiento de ambos isómeros es opuesto según la especie de *Bradyrhizobium* de la que se trate.

| RAZA | DÍAS | PM* (X ± S.E.) | ANR* (X ± S.E.) |
|----------|------|-------------------|--------------------|
| USDA-110 | 3 | 365± 10 | 15± 3 |
| | 10 | 360± 7 | 36± 12 |
| | 3 | 87± 6 | 5,8±1,2 |
| | 10 | 91± 9 | 43± 14 |
| L-750 | 3 | 360± 27 | 38± 15 |
| | 10 | 361± 20 | 49± 5 |
| | 3 | 91± 8 | 75± 21 |
| | 10 | 93± 6 | 32± 9 |

Tabla 3.3.3. Actividades y PM de las NR a lo largo del crecimiento bacteriano.

* Valores medios de 5 repeticiones.

3.3.1.3. En bacterias crecidas en microaerobiosis con nitrato

Aparece ampliamente descrito en la bibliografía (Daniel et al., 1980) la existencia de estirpes de rizobios, capaces de utilizar el nitrato como aceptor final de electrones en una cadena alternativa de generación de ATP (ANR respiratoria). En este proceso de respiración de nitratos que se realiza en ausencia de O₂, no se conoce bien cuales de las enzimas NR intervienen. Por ello, crecimos células de *B.japonicum* y de

Bradyrhizobium sp. (*Lupinus*) en presencia de una concentración 10 Mm de nitrato y en microaerobiosis, y por cromatografía en gel de exclusión molecular determinamos los PM de las enzimas NR que aparecieron. Los datos se muestran en la Tabla 3.3.4. La diferencia más notable con respecto a aquellas células crecidas en presencia de O₂ es la ausencia total de la NR de menor tamaño (90 Kd) y la escasez de la de 180 Kd, que sólo apareció en dos de las diez repeticiones; mientras que los dos tetrámeros se detectaron en ambas razas, aunque la mayoría de las veces las actividades fueron considerablemente menores que en células crecidas en aire.

| RAZA | Nº pico | PM* (X ± S.E.) | ANR* (X ± S.E.) |
|----------|------------|-------------------|--------------------|
| USDA-110 | 1 | 735± 35 | 5,1± 2,8 |
| | 2 | 365± 29 | 3,6± 0,5 |
| | 3 | 180± 15 | 3,6± 0,7 |
| | 4 | ----- | ----- |
| L-750 | 1 | 762± 38 | 4,3± 2,3 |
| | 2 | 320± 29 | 3,1± 1,1 |
| | 3 | 166± 17 | 3,1± 1,1 |
| | 4 | ----- | ----- |

Tabla 3.3.4. Actividades y PM de las NR de células crecidas en microaerobiosis y con una concentración 10 mM de nitrato.

* Valores medios de 10 repeticiones.

3.3.2. Determinación de los PM de las NR de los bacteroides

Para averiguar los PM de las enzimas NR que aparecen en los bacteroides, se recogieron nódulos de plantas de soja y de altramuza, previamente inoculadas con las cepas USDA-110 y L-750 respectivamente. A la mitad de los tratamientos se le añadió nitrato potásico a una concentración final de 5 Mm, mientras que la otra mitad se mantuvo sin N combinado en la solución nutritiva. La proteína total purificada de los bacteroides aislados se hizo pasar por la columna citada anteriormente. Los datos obtenidos se recogen en la Tabla 3.3.5. En los bacteroides al igual que en las bacterias, observamos la presencia de cuatro tamaños de NR cuando los aislamos de plantas crecidas en presencia de nitrato (90, 180, 360 y 730 kD) y sólo de dos (90 y 360) cuando lo hacíamos de plantas crecidas en ausencia del mismo. Los tamaños eran equivalentes a aquellos que aparecían en bacterias en vida libre. Sin embargo, las actividades NR eran superiores a las de las bacterias, y, cuando crecimos las plantas en ausencia de nitrato destacaba el valor de la actividad de la NR de mayor PM frente al de la NR de menor tamaño. Por otra parte, al igual que en las bacterias, en la raza L-750 las actividades NR de los bacteroides aislados de plantas crecidas con nitrato, fueron menores que aquellas que se obtuvieron de bacteroides de plantas crecidas en ausencia del mismo.

| ESPECIE | Nº PICO | NITRATO (mM N) | PM* (kD) | ANR* (μ M NO ₂ /h*mg prot) |
|-------------------------------|---------|-------------------|--------------|---|
| <i>Bjaponicum</i> USDA-110 | 1 | 0 | ----- | ----- |
| | | 5 | 718 \pm 16 | 47 \pm 23 |
| | 2 | 0 | 360 \pm 19 | 68 \pm 19 |
| | | 5 | 360 \pm 19 | 37 \pm 24 |
| | 3 | 0 | ----- | ----- |
| | | 5 | 163 \pm 4 | 14 \pm 11 |
| | 4 | 0 | 90 \pm 3 | 18 \pm 4 |
| | | 5 | 90 \pm 3 | 34.5 \pm 1.5 |
| <i>B.lupinus</i> L-750 | 1 | 0 | ----- | ----- |
| | | 5 | 730 \pm 8 | 21 \pm 7 |
| | 2 | 0 | 363 \pm 18 | 52 \pm 11 |
| | | 5 | 363 \pm 18 | 25 \pm 21 |
| | 3 | 0 | ----- | ----- |
| | | 5 | 167 \pm 8 | 14 \pm 7 |
| | 4 | 0 | 92 \pm 7 | 38 \pm 13 |
| | | 5 | 92 \pm 7 | 23 \pm 11 |

Tabla 3.3.5. PM y actividades de las NR obtenidas de bacteroides aislados de plantas crecidas con concentraciones de 0 y 5 mM de nitrato.

* Valores medios de 15 repeticiones.

3.3.3. Determinación de los pI

Los pI de las NR se determinaron tanto en *B.japonicum* USDA-110 como en *Bradyrhizobium* sp.(*Lupinus*) L-750. Las fracciones activas obtenidas tras el paso de los extractos celulares por la columna de Sephadex, se concentraron y se pasaron por la columna de intercambio aniónico, dónde se separaron en los correspondientes isómeros. Para cada uno de los PM de NR se obtuvieron tres isómeros de distinto pI (Tabla 3.3.6), que coincidieron en bacterias y bacteroides, pero que mostraron valores algo menores en las células de la raza US-110 que en las de L-750; así, se obtuvieron tres fracciones activas con pI aproximados de 6'7, 7'6 y 8'1 para la primera de las razas, y de 7'0, 7'8 y 8'4, para la segunda. Posteriormente, se confirmaron estos datos mediante geles en doble dimensión (Fig.3.3.2), donde aparecieron igualmente tres isómeros para cada tipo de NR, pero dónde los valores variaron ligeramente con respecto a los anteriores. Así, la raza US-110 mostró tres pI de 7'0, 7'8 y 8,1; y L-750 dio valores de 7'2, 8'1 y 8'4.

| PM (kD) | pI | |
|---------|--------------------|---|
| | <i>B.japonicum</i> | <i>Bradyrhizobium</i> sp (<i>Lupinus</i>) |
| 90 | 6'7, 7'6 y 8'1 | 7'0, 7'8 y 8'4 |
| 180 | 6'7, 7'6 y 8'1 | 7'0, 7'8 y 8'4 |
| 360 | 6'7, 7'6 y 8'1 | 7'0, 7'8 y 8'4 |
| 720 | 6'7, 7'6 y 8'1 | 7'0, 7'8 y 8'4 |

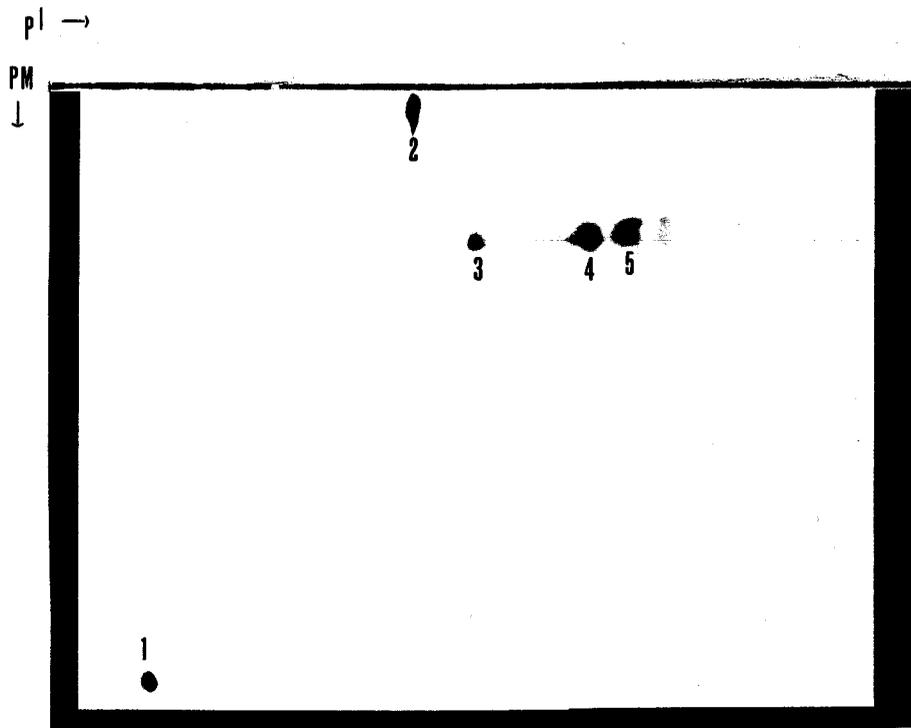
Tabla 3.3.6. pI obtenidos por columna de intercambio aniónico para las cuatro NR de *Bradyrhizobium* spp.

Fig.3.3.2: Gel en doble dimensión de la NR₆ de 360 kD de la *B.japonicum*, tras su purificación por columnas DOWEX, DEAE e hidroxapatita.

1= Marcador. pI 3'6.

2= Marcador. pI 6'6.

3,4,5= Isoenzimas de NR. pI 7'0, 7'8 y 8'1, respectivamente



3.4. ESTUDIO DE LOS PATRONES ELECTROFORÉTICOS DE PROTEÍNAS TOTALES DE BRADYRHIZOBIUM spp. Y CITOSOLES NODULARES

Rhizobium spp. puede crecer con fuentes de nitrógeno muy diversas, inorgánicas (sales de amonio, nitrato, etc.) u orgánicas como aminoácidos, extracto de levadura y de malta, hidrolizado de caseína e incluso peptona (Vincent, 1962).

En este trabajo se estudió la influencia de diversas fuentes nitrogenadas inorgánicas sobre los patrones de proteínas totales, tanto de bacterias en vida libre como de los nódulos (bacteroides y citosoles) formados en dos especies de *Lupinus*. Las fuentes nitrogenadas y las concentraciones a las que se utilizaron se indican en el apartado 2.5.

Los geles de proteínas se corrieron electroforéticamente por SDS-PAGE (Laemmli, 1970) y se analizaron mediante un scanner y un programa de ordenador para cuantificación densitométrica de proteínas, del cual se obtuvieron gráficas del tipo que se representa en la Fig.3.4.1 y listados en los que aparece la posición que ocupa cada proteína en el gel, su porcentaje de área, la altura del pico obtenido y el PM que posee. Se presenta como ejemplo el listado de la raza de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) IM-43B crecida con NH_4NO_3 (Tabla 3.4.1)

Fig.3.4.1: Gráfica correspondiente al patrón de proteínas totales de células en vida libre de IM-43B crecidas con NO_3NH_4 , previamente separadas en gel de acrilamida por SDS-PAGE.

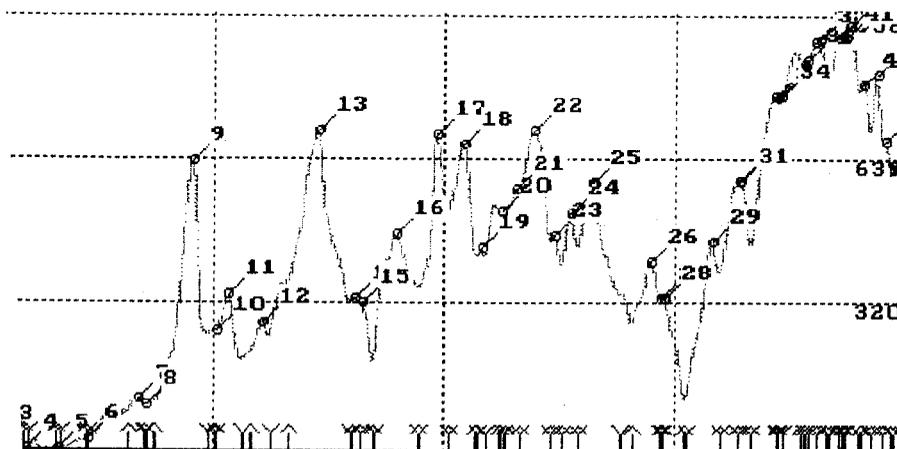


Tabla 3.4.1: Listado obtenido con el programa QS de las proteínas correspondientes a la muestra que se presenta en la Fig.3.4.1.

| Peak | Posn | Mol Wt | %Area | Pk Ht |
|------|------|---------|-------|-------|
| 1 | 6 | 116854 | 0.02 | 22 |
| 2 | 21 | 114589 | 0.01 | 23 |
| 3 | 45 | 111057 | 0.02 | 19 |
| 4 | 101 | 103233 | 0.00 | 3 |
| 5 | 171 | 94223.5 | 0.00 | 4 |
| 6 | 236 | 86563.1 | 0.01 | 24 |
| 7 | 347 | 74893.4 | 0.52 | 115 |
| 8 | 364 | 73250.7 | 0.05 | 102 |
| 9 | 467 | 64040.6 | 5.23 | 638 |
| 10 | 519 | 59840.4 | 0.18 | 266 |
| 11 | 548 | 57618.8 | 2.13 | 344 |
| 12 | 624 | 52180.1 | 1.47 | 281 |
| 13 | 745 | 44560.5 | 9.51 | 704 |
| 14 | 826 | 40092.1 | 0.68 | 336 |
| 15 | 843 | 39212.7 | 1.20 | 328 |
| 16 | 918 | 35557.8 | 5.51 | 478 |
| 17 | 1009 | 31577.4 | 4.63 | 698 |
| 18 | 1067 | 29276.3 | 4.85 | 674 |
| 19 | 1103 | 27933.1 | 1.14 | 447 |
| 20 | 1149 | 26306.2 | 0.65 | 526 |
| 21 | 1182 | 25197.7 | 2.35 | 577 |
| 22 | 1221 | 23947.8 | 5.87 | 704 |
| 23 | 1266 | 22582.4 | 1.54 | 472 |
| 24 | 1301 | 21574.4 | 2.35 | 523 |
| 25 | 1350 | 20238.5 | 6.19 | 590 |
| 26 | 1479 | 17103.7 | 3.03 | 416 |
| 27 | 1501 | 16619.8 | 0.27 | 338 |
| 28 | 1507 | 16490.2 | 1.63 | 336 |
| 29 | 1614 | 14341.8 | 3.24 | 460 |
| 30 | 1670 | 13331.4 | 2.91 | 593 |
| 31 | 1675 | 13244.7 | 2.02 | 593 |
| 32 | 1752 | 11978.9 | 5.10 | 780 |
| 33 | 1758 | 11885.5 | 0.53 | 776 |
| 34 | 1765 | 11777.5 | 0.64 | 780 |
| 35 | 1812 | 11077 | 0.70 | 852 |

3.4.1. Efecto de diversas fuentes de N combinado sobre el patrón proteico de bacterias en vida libre de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*)

Este estudio se realizó sobre dos razas de *Bradyrhizobium* sp (*Lupinus*): IM-43B (NR_i) y L-750 (NR_c y NR_i). Se compararon los efectos de los distintos tratamientos nitrogenados (KNO₃, NN y NH₄Cl a 10 mM), con respecto a un control sin N combinado, y se identificaron las proteínas que se expresaban de "novo", las que alteraban su concentración y las que se reprimían en cada uno de ellos. En la Tabla 3.4.2 se muestran las diferencias observadas en el patrón de proteínas totales. La adición de nitrato potásico ó amónico (NN) se traducía en la aparición o en el aumento de expresión de una banda con un PM aproximado de 86 kD, en IM-43B y L-750 respectivamente, que probablemente se corresponda con la enzima nitrato reductasa, ya que su PM se aproxima al que se ha encontrado anteriormente para dicha enzima (apartado 3.2). Si añadimos amonio al medio de cultivo, tanto en forma de ClNH₄ como de NO₃NH₄, se induce en ambas razas una proteína de 72 kD y otra de unos 17 Kd, que alcanza alturas de pico mayores en la raza L-750. De igual modo, en esta raza se manifiesta una banda de 95 kD en los tratamientos con NH₄⁺ que no aparece en células de IM-43B. Contrariamente, con los compuestos amoniacaes se reprimía una banda de 52 kD en ambas razas, que podría corresponderse con una de las formas de la enzima glutamina sintetasa (GS) descrita por Darrow (1980). Por otra parte, en las células crecidas en presencia de NO₃NH₄ se localiza una banda correspondiente a un tamaño de 27 kD. Para finalizar, mencionaremos que la adición de cualquier fuente nitrogenada provocaba la aparición de una banda

de unos 21 kD en ambas razas rizobianas. En L-750, se ve afectado igualmente, un péptido de 16 kD que alcanzaba en cualquiera de los tratamientos nitrogenados una altura de pico 2-3 veces mayor que en el control.

| PM(kD) | L-750 | | | | IM-43B | | | |
|--------|-------|----|-----|-----|--------|----|---|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 95 | - | - | + | + | - | - | - | - |
| 86 | + | ++ | - | ++ | - | ++ | - | ++ |
| 72 | - | - | + | + | - | - | + | + |
| 52 | + | + | - | - | + | + | - | - |
| 27 | - | - | - | ++ | - | - | - | ++ |
| 21 | - | + | + | + | - | + | + | + |
| 17 | - | - | ++ | + | - | - | + | - |
| 16 | + | ++ | +++ | +++ | + | + | + | + |

Tabla 4.2: Diferencias electroforéticas entre las proteínas totales de células en vida libre de *Bradyrhizobium* sp (*Lupinus*) IM-43B y L-750 crecidas bajo distintas fuentes de nitrógeno.

"-" = ausencia total de proteína

"+" a "+++" = cantidad de proteína existente en la banda

1 = control sin N combinado

2 = NO₃K

3 = ClNH₄

4 = NH₄NO₃.

3.4.2. Comparación de los patrones proteicos de bacteroides de *Bradyrhizobium* sp (*Lupinus*)

Al objeto de estudiar en los bacteroides de las razas IM-43B y L-750 la influencia de diferentes fuentes nitrogenadas (nitrato potásico, nitrato amónico y urea), se inocularon plantas de *L.albus* y *L.luteus* crecidas en cultivo hidropónico suplementado con dichas fuentes a una concentración final de 5 mM.

En la Tabla 3.4.3 se muestran las diferencias electroforéticas encontradas en los bacteroides de la raza IM-43B al ser aislados de nódulos tanto de *L.albus* como de *L.luteus*. La adición de cualquier nitrato se traducía en la aparición de una banda de alto PM, que variaba algo de tamaño según la especie vegetal, así tenía un PM de 139 kD en bacteroides aislados de *L.albus* y de 121 kD en los correspondientes de *L.luteus*. Igualmente se expresaban ó sobreexpresaban otras bandas cuyo tamaño coincidía en ambas especies: una de 98 kD y otra de unos 86 kD, la última de las cuales probablemente se corresponda con la enzima NR. La adición de nitratos tiene además un efecto represor sobre algunas proteínas; así encontramos que en los bacteroides provenientes de ambas leguminosas crecidas tanto con NO_3K como con NO_3NH_4 no se localizaba una banda de 43 kD ni otra de 64 kD, la última de las cuales podría corresponderse con la enzima GS descrita por Bhandari y Nicholas (1986). Por su parte, el nitrato añadido en forma de NO_3K provocó la aparición de un péptido de 15 kD y la desaparición de otro de 24-27 kD en bacteroides aislados de ambas leguminosas. En cuanto al amonio, añadido bien en forma de NO_3NH_4 o de urea, reprimía una proteína de 73 kD. En todos ellos, al ser aislados de plantas crecidas en urea, se manifestaba el aumento

en un péptido de 37 kD, que podría tratarse de la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) descrita por Davies y Texeira (1975), en bacteroides de *Lupinus* como un hexámero formado por subunidades de 38 kD. Por ultimo, la adición de cualquier fuente nitrogenada hacía que se expresara una banda de aproximadamente 19 kD.

| PM(kD) | <i>L.albus</i> | | | | <i>L.luteus</i> | | | |
|--------|----------------|-----|----|----|-----------------|-----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 139 | - | ++ | ++ | - | - | - | - | - |
| 121 | - | - | - | - | - | ++ | ++ | - |
| 98 | - | + | + | - | - | + | + | - |
| 86 | - | ++ | ++ | - | + | +++ | ++ | + |
| 73 | + | + | - | - | + | + | - | - |
| 64 | ++ | - | + | ++ | ++ | - | - | ++ |
| 43 | + | - | - | + | + | - | - | + |
| 37 | + | + | + | ++ | + | + | + | ++ |
| 24-27 | ++ | - | ++ | ++ | ++ | - | ++ | ++ |
| 19 | - | ++ | ++ | ++ | - | ++ | ++ | ++ |
| 15 | - | +++ | - | - | - | +++ | - | - |

Tabla 3.4.3: Diferencias electroforéticas en los bacteroides de la raza IM-43B aislados de plantas de *L.albus* y *L.luteus* crecidas con distintos tipos de N combinado en la solución nutritiva.

"-" = ausencia total de proteína

"+" a "+++" = cantidad de proteína existente en la banda

1 = control sin N combinado

2 = NO₃K

3 = NH₄NO₃

4 = urea

Las diferencias encontradas en el patrón proteico de bacteroides de la raza L-750 aislados de las mismas leguminosas anteriores se muestra en la Tabla 3.4.4. En primer lugar, cabría destacar que la adición de cualquier compuesto nitrogenado influía negativamente sobre la expresión de una proteína de 32 kD y sobre una banda de, aproximadamente 48 kD, en ambas especies de leguminosas, que podrían corresponderse con el componente férrico de la nitrogenasa, descrito por Israel et al. (1974), y con cualquiera de las cadenas (α o β) del componente MoFe de la N_2 asa (Vance, 1990), respectivamente. Al añadir NO_3K o NO_3NH_4 a la solución nutritiva, se observaba la aparición de una proteína de 99 y un aumento en la expresión de otra en torno a los 93 kD, la cual se podría corresponder con alguna de las enzimas NR; en ambas especies se reprimían una banda de 40 kD y otra de unos 64 kD, al igual que ocurría en la raza IM-43B. En aquellos bacteroides aislados de plantas crecidas con NO_3K como única fuente de N, no se localizaba una proteína de 105 kD existente en el control sin N combinado, y por el contrario, surgía "de novo" una banda de 22 kD. Por otra parte, el amonio añadido como urea o acompañado de nitrato (NN), provocaba la represión de una proteína de 68 kD. Del mismo modo, la urea por si sola hacía que no se localizara una banda de 83 kD en *L.albus* ó disminuyera su expresión en *L.luteus*.

| PM(kD) | <i>L.albus</i> | | | | <i>L.luteus</i> | | | |
|--------|----------------|----|----|----|-----------------|-----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 105 | ++ | - | ++ | ++ | ++ | - | ++ | ++ |
| 99 | - | + | + | - | - | ++ | ++ | - |
| 92-94 | + | ++ | ++ | - | ++ | +++ | ++ | ++ |
| 83 | ++ | ++ | ++ | - | ++ | ++ | ++ | + |
| 68 | ++ | ++ | - | - | + | ++ | - | - |
| 64 | ++ | - | - | + | ++ | - | + | ++ |
| 48 | ++ | ++ | ++ | - | +++ | + | ++ | + |
| 40 | + | - | - | + | + | - | - | + |
| 32 | ++ | + | + | - | +++ | ++ | ++ | + |
| 22 | - | ++ | - | - | - | ++ | - | - |

Tabla 3.4.4: Diferencias electroforéticas en bacteroides de la raza L-750 aislados de plantas de *L.albus* y *L.luteus* crecidas con distintos tipos de N combinado en la solución nutritiva.

"-" = ausencia total de proteína

"+" a "+++" = cantidad de proteína existente en la banda

1 = control sin N combinado

2 = NO₃K

3 = NH₄NO₃

4 = urea

3.4.3. Estudio de los patrones electroforéticos de las proteínas solubles del citosol nodular

Finalmente se determinó la influencia de varios factores, esto es, raza bacteriana, especie vegetal y tratamiento nitrogenado sobre las proteínas solubles del citosol nodular. Así, el ensayo fue planteado con dos razas rizobianas (IM-43B y L-750), dos especies de *Lupinus* (*L.albus* y *L.luteus*) y cuatro tratamientos nitrogenados (KNO_3 , NH_4NO_3 , urea y control sin N). Los resultados obtenidos de los geles por SDS-PAGE mostraron que uno de los factores (la estirpe bacteriana) no influía sobre el patrón de proteínas citosólicas, por lo que se pasa a describir los efectos de los otros dos factores estudiados.

3.4.3.1. Efecto del N combinado sobre las proteínas solubles de nódulos de *L.albus* y *L.luteus*

Las diferencias observadas en los citosoles de *L.albus* y *L.luteus* se muestran en la Tabla 3.4.5. La adición de nitrato potásico ó amónico al medio de cultivo provoca la aparición de una banda de 67 kD en *L.luteus*, que podría tratarse de la nodulina N-75, rica en hidroxiprolina y relacionada con la barrera de difusión del O_2 (Franssen et al., 1988), ya que según aparece en la bibliografía, dicha barrera aumenta ante la presencia de nitrato en el medio (Minchin et al., 1986). Contrariamente, con ambos nitratos se inhibió una banda de 32 kD en ambas leguminosas, que podría corresponderse con la enzima malato-deshidrogenasa, que se inhibe con los tratamientos que disminuyen la fijación y descrita con un peso de 30-37 kD (Vance, 1990). Por otra parte, la presencia de amonio (NN ó urea)

producía mayores alturas de pico en proteínas de 80 y 22'5 kD. Igualmente, en plantas de *L.luteus* éstos compuestos provocaban la expresión de una banda de 53 kD, mientras que en plantas de *L.albus* este efecto sólo lo causaba la urea. La adición de cualquier compuesto nitrogenado a la solución nutritiva hacía que se expresaran en mayor grado algunas proteínas, así se apreciaba que un par de bandas correspondientes a 86 y 90 kD aumentaban considerablemente su área. Cada una de ellas se podría corresponder con una NR distinta, ya que unidas a la banda

| PM(kD) | <i>L.albus</i> | | | | <i>L.luteus</i> | | | |
|--------|----------------|----|-----|-----|-----------------|-----|-----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 90 | + | ++ | +++ | +++ | + | +++ | +++ | ++ |
| 86 | + | ++ | +++ | +++ | + | +++ | +++ | ++ |
| 80 | + | + | ++ | ++ | - | - | + | + |
| 67 | - | - | - | - | - | + | + | - |
| 53 | - | - | - | + | - | - | + | + |
| 42 | ++ | + | ++ | +++ | ++ | + | + | + |
| 40 | ++ | ++ | - | - | ++ | + | + | + |
| 32 | + | - | - | + | + | - | - | + |
| 22'5 | + | + | ++ | ++ | + | + | ++ | ++ |
| 15 | +++ | + | ++ | ++ | + | + | + | + |

Tabla 3.4.5: Diferencias electroforéticas en las proteínas solubles de nódulos provenientes de plantas de *L.albus* y *L.luteus* crecidas con distintos tipos de N combinado en la solución nutritiva.

"-" = ausencia total de proteína

"+" a "+++" = cantidad de proteína existente en la banda

1 = control sin N combinado

2 = NO₃K

3 = NH₄NO₃

4 = urea

descrita anteriormente de 22'5 kD, suman un tamaño de 108'5 y 112'5 kD, respectivamente, que es aproximadamente el tamaño descrito para las NR de vegetales superiores (Kleinhofs y Warner, 1990). La banda de 22'5 kD podría corresponderse con el grupo FAD desprendido de las NR eucarióticas por el SDS.

Entre aquellas bandas que disminuyen su expresión nos encontramos con una de 42 kD, que podría corresponderse con la GS, ya que su peso aparece descrito en *Lupinus* como 347 kD con un monómero de 41'5 kD (Jingwen y Kennedy, 1985), o también podría tratarse de la enzima GDH, cuyo monómero tiene un peso similar a la GS, y cuya expresión suele aumentar en presencia de NH_4^+ (Stone et al., 1979). Dicha banda mostraba un comportamiento distinto según la especie vegetal, ya que si bien en plantas de *L.luteus* disminuía su área con cualquier forma de N combinado que añadíamos a la solución nutritiva, en *L.albus* el amonio tenía un efecto inductor.

Por otra parte, nos encontramos con una banda de 40 kD, que podría tratarse de la enzima aspartato-amino-transferasa, cuyo porcentaje suele disminuir con cualquier tratamiento nitrogenado (Reynolds y Farnden, 1979), coincidiendo con lo observado por nosotros en plantas de *L.luteus*; este efecto fue más acentuado en *L.albus*, donde dicha proteína desapareció totalmente con los compuestos amoniacales.

Cabe destacar el efecto de los compuestos nitrogenados sobre las leghemoglobinas. Así, mientras que en *L.luteus* no parecieron verse afectadas, en *L.albus* la leghemoglobina mayoritaria (15 kD) disminuía ante la presencia de cualquier fuente de N combinado, aunque se vio más afectada por el nitrato que por el amonio.

3.4.3.2. Efecto especie de *Lupinus* sobre las proteínas solubles del citosol nodular

En ambas especies de *Lupinus* aparecían tres tipos de leghemoglobina con PM aproximado de 15, 16 y 17 kD, respectivamente. En los citosoles de nódulos aislados de *L. albus* se apreciaba siempre que la leghemoglobina de menor tamaño era mayoritaria, mientras que en los citosoles de *L.luteus* la leghemoglobina predominante era la de tamaño intermedio (Fig.3.4.2).

Por otra parte, en los citosoles de *L.luteus*, aparece un péptido de unos 13 kD con una intensidad 10 veces superior que en aquéllos que proceden de *L.albus*.

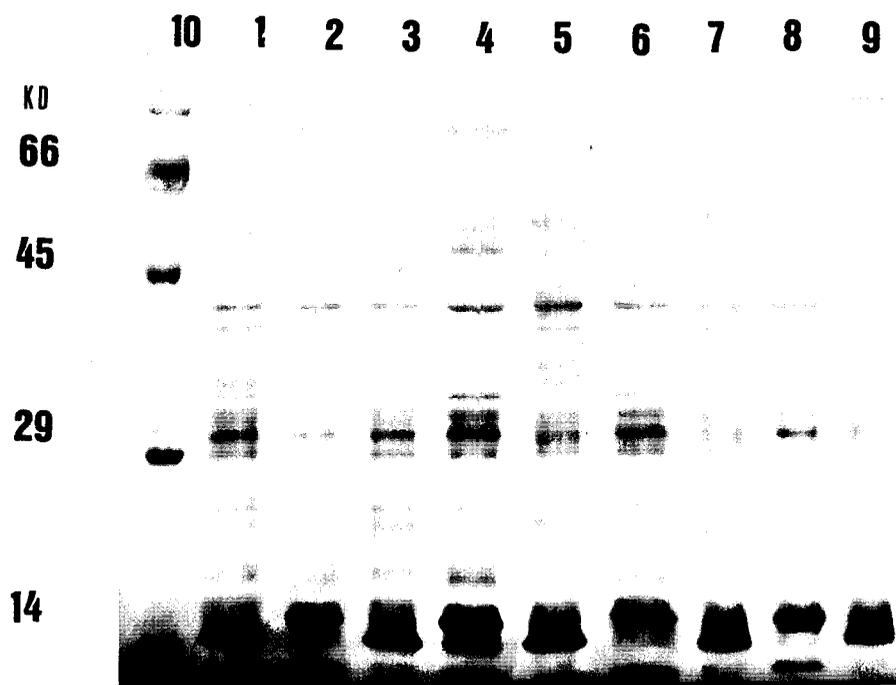


Fig.3.4.2: Electroforesis en SDS-PAGE de proteínas solubles de nódulos aislados de *L.albus* y *L.luteus* crecidas bajo distintos compuestos nitrogenados.

1, 3, 5, 7, 9 = Citosoles provenientes de plantas de *L.albus*
2, 4, 6, 8 = Citosoles provenientes de plantas de *L.luteus*
10 = Marcadores de PM.

4. DISCUSSION

4.1. INFLUENCIA DE LA ESPECIE DE LEGUMINOSA Y DE LA FUENTE NITROGENADA EN EL MEDIO SOBRE LAS ACTIVIDADES NITROGENASA Y NITRATO-REDUCTASA; POSIBLE RELACIÓN ENTRE AMBAS

Una medida indirecta de la efectividad de las cepas de *Bradyrhizobium* spp. en la fijación de nitrógeno es la determinación de la actividad de reducción del acetileno (ARA) en las raíces noduladas (Hardy et al., 1973). Esta actividad se inhibe parcialmente por la presencia de NO_3^- en el medio de desarrollo de las plantas, aun cuando éste no esté en contacto directo con los nódulos (Vézina et al., 1988). Nuestros datos muestran además, que cualquier tipo de compuesto nitrogenado asimilable inhibe dicha actividad en plantas de altramuza (*Lupinus* sp.); así, hemos encontrado que una exposición continuada a 5 mM de NH_4^+ o urea producía una inhibición similar o superior a la ocurrida con nitrato, donde la actividad se reducía en un 50% o más dependiendo del cultivar utilizado. Esto concuerda con algunos trabajos (Imsande, 1986) en los que tanto el nitrato como el amonio inhibían la fijación y se contradice con otros (Vigue et al., 1977), donde se afirma que el sistema no se ve afectado por la presencia de urea. Como previamente describieron Gibson y Harper en el sistema *Bradyrhizobium japonicum*-soja (1985), nosotros hemos observado que esta inhibición de la nitrogenasa por el N combinado no afecta por igual a todas las especies de *Lupinus*, ni a todas las cepas de *Bradyrhizobium* spp., coincidiendo con la mayoría de los trabajos consultados, aunque hay quienes discrepan de este tipo de datos (Zlotinov y Kadynova, 1990). Así, se ha observado la importancia de las interacciones

Lupinus sp. x raza de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) sobre la fijación de N_2 en ausencia de N combinado. Sin embargo, la presencia de nitrato por un período de tiempo prolongado hizo que las actividades de la N_2 asa decayesen, aunque esta inhibición no solía guardar relación con las actividades obtenidas previamente sin N. Estos resultados nos indican que sería posible seleccionar tanto el cultivar como la cepa rizobiana más apropiados para mantener unos niveles altos de fijación en suelos en los que esté presente algún tipo de compuesto nitrogenado asimilable a concentraciones elevadas.

Por otra parte, cuando hicimos un seguimiento de los carbohidratos cedidos al nódulo, vimos que aumentaban a medida que tenía lugar el establecimiento de la simbiosis. Sin embargo, la presencia de nitrato hacía que estos incrementos fueran menores, y las diferencias entre ambos tratamientos nitrogenados iban creciendo durante el período de estudio, como si existiera un efecto acumulativo debido a un descenso del consumo de C en los nódulos de plantas crecidas con N combinado; datos similares fueron obtenidos por Streeter (1988). Por el contrario, el contenido en proteínas nodulares disminuía conforme la simbiosis progresaba, generalmente de forma más rápida a la que se producían los incrementos en C (Streeter, 1986); por otro lado, la síntesis de compuestos nitrogenados aún decaía más ante la presencia de nitratos (Taylor *et al.*, 1988), como consecuencia, los cocientes C/N aumentaban a lo largo del tiempo, llegando a ser estos aumentos de tipo exponencial en las plantas tratadas con nitrato en las fases más tardías de su período activo. Estos datos parecen confirmar la hipótesis de que no existe una

competencia por los carbohidratos entre las dos vías posibles de asimilar nitrógeno para suministrar energía a los nódulos, contrariamente a lo que observaron Alcantar-Gonzales *et al.* (1988), por tanto la planta se muestra indiferente al hecho de que el nitrógeno le sea aportado por la reducción de nitratos en vez de por la fijación de N_2 en los nódulos.

La actividad Hup^+ en los bacteroides se vio afectada por la presencia de N combinado de una forma indirecta, mediante la inhibición de la actividad nitrogenasa, lo que implicaba una menor concentración de H_2 en el bacteroide y, por tanto una menor actividad de las enzimas que recuperan este sustrato con producción de energía en forma de ATP (Eisbrenner y Evans, 1983). De igual modo, la actividad Hup^+ disminuyó conforme la simbiosis avanzaba y la N_2 asa disminuía su actividad. Así, dependiendo de que las cepas hibridasen ó no con una sonda que contenía los genes *hup* de *B.japonicum* 122 (Murillo *et al.*, 1989) se podrían agrupar al menos en dos tipos distintos; el tipo de hidrogenasa presente en cada cepa afectó significativamente a la cantidad de H_2 reciclado tanto en presencia como en ausencia de nitrato, siendo más efectiva en todos los casos la cepa que no presentaba homología en su ADN con la sonda de *B.japonicum*.

La reducción de nitratos en los bacteroides siguió un patrón opuesto a la de la actividad nitrogenasa cuando hicimos controles periódicos, mostrando una curva gaussiana invertida, presentando mayores actividades al principio y al final del período vegetativo. Esto podría estar relacionado con la hipótesis de una complementación entre las dos formas posibles de asimilar nitrógeno existentes en el nódulo, bien vía N_2 asa ó vía NR

(Alcantar-Gonzales et al., 1988), corroborando la idea de que la actividad nitrato-reductora del bacteroide contribuye de una forma sustancial a la asimilación de NO_3^- en la planta en períodos de insuficiente actividad fijadora de N_2 (Oyhama y Kumazawa, 1979; Randall et al., 1978; Vance y Heichel, 1981), si bien otros autores no parecen estar de acuerdo con esta hipótesis (Fernández-López et al., 1989). Los valores de ANR obtenidos para las distintas cepas de *Bradyrhizobium* sp.(*Lupinus*) fueron diferentes debido a que unas poseían NR de tipo constitutiva e inducida, mientras que otras poseían preferentemente NR inducida. Cada una de las cepas mostró una respuesta distinta a las fuentes de N combinado, según con qué especie de leguminosa hubiera establecido la simbiosis.

Las biomásas nodulares se vieron afectadas por todos los tratamientos nitrogenados; el peso fresco se vio siempre disminuido, aunque el tamaño, dependiendo de la especie vegetal, unas veces disminuyó y otras permaneció constante, lo cual constata que la planta ejerce el control sobre los puntos de infección. Cabe destacar sin embargo, que la presencia de NN no disminuía los puntos de infección con respecto al tratamiento sin N, sino al contrario, los aumentaba; ésto puede ser debido al efecto estimulante sobre la nodulación que ejercen pequeñas concentraciones de compuestos nitrogenados en el medio (Streeter, 1988), ya que al añadir NN a 5 mM lo que en realidad existe a disposición de la planta son 2'5 mM de nitrato y 2'5 mM de amonio, iones cuyo efecto no parece ser aditivo sobre la simbiosis.

Las correlaciones entre las tres enzimas estudiadas (Hup, N_2 asa y NR) presentaban valores bien conocidos para algunas de estas actividades enzimáticas, así por ejemplo, la represión de la Hup por la caída de la actividad N_2 asa. Llamaban la atención aquellos puntos con niveles intermedios de NR, pero muy pequeños de Hup; estos valores se corresponden con los de la ANR constitutiva; por lo que la inexistencia de actividad Hup, y por tanto de actividad N_2 asa, podría ser compensada de alguna manera, mediante una actividad NR mayor en las razas Hup (Bedmar y Olivares, 1986). Esto plantea la posibilidad de que los bacteroides usen una NR respiratoria que genere el ATP necesario para la N_2 asa.

Las relaciones entre los rendimientos en N de los tallos y alguna de las actividades enzimáticas estudiadas ponen de manifiesto los efectos positivos de las C/N y las ARA. De igual modo, en los casos donde no aparecía actividad NR, cuando la cantidad de carbono soluble o la relación C/N disminuían por debajo de un determinado valor los rendimientos disminuían significativamente, ésto podría implicar que la NR en los bacteroides influya de algún modo en las producciones de la planta, siempre que el suministro de carbohidratos a los bacteroides sea suficiente para mantener un cierto grado de desarrollo; estos datos vienen apoyados por lo afirmado anteriormente acerca de la acumulación de carbohidratos en los nódulos en presencia de nitrato. Hup y ANR estaban negativamente correlacionados, los mayores rendimientos se producen con valores intermedios de ambas; ésto confirmaría la importancia de ambas actividades enzimáticas en la nutrición nitrogenada de las

plantas, ya que los mayores rendimientos se obtuvieron cuando ambas actividades estaban presentes a niveles moderados.

Finalmente, al correlacionar los resultados para las enzimas NR y N_2 asa en los bacteroides y las productividades en N de la parte aérea, se observaba que los mayores rendimientos se obtenían con valores altos de ARA y medios o bajos de ANR constitutiva. Como varios autores ya han afirmado (Streeter y Devine, 1983), proponemos que la ANR en los bacteroides puede ser beneficiosa para la planta cuando algún factor haya podido disminuir la actividad N_2 asa, tales como la presencia de altas concentraciones de N combinado, o cuando el estado de crecimiento de la planta ya haya sobrepasado los máximos niveles de ARA, por lo que ambas enzimas pudieran trabajar complementándose en el suministro de amonio para la síntesis de aminoácidos en las leguminosas (Silsbury *et al.*, 1986).

4.2. CONSTANTES CINÉTICAS Y BIOQUÍMICAS DE LA ENZIMA NITRATO-REDUCTASA DE BRADYRHIZOBIUM spp

Kennedy *et al.*, (1975) agruparon los distintos tipos de NR presentes en las células de *Bradyrhizobium* spp. en solubles y particuladas, basándose en la utilización de distintas fuentes como donadoras de electrones. Las NR que utilizan NADH eran las que aparecían unidas a membrana, mientras que las NR solubles sólo parecía que pudieran aceptar electrones del MV. De los resultados obtenidos en el apartado 3.2 deducimos que aquellas NR de tipo constitutivo usan preferentemente el NADH, al igual que lo hacen las NR de vegetales superiores (Sik *et al.*, 1976), por lo que posiblemente la actividad que nosotros hemos detectado proviene en su mayoría de NR constitutivas, asimilatorias y unidas a membrana. Todo esto corroboraría lo observado en la Fig.3.1.3A, en la que las mayores producciones se alcanzaban en aquellos puntos que se correspondían con una ANR constitutiva. El por qué dan actividad con uno u otro compuesto aún no está claro; Kennedy *et al.*, en 1975 afirmaron que la NR soluble no aceptaba electrones del NADH ni aún en presencia de FAD por la falta de un sistema transportador de los mismos, que la particulada sí posee por estar unida a membrana. Sin embargo, encontraron que en preparaciones tanto de rizobios crecidos en vida libre como de bacteroides sonicados tras tres ó cinco días a 3°C, la NR particulada sólo aceptaba como donador al NADH. Nosotros siempre hemos obtenido altas actividades con NADH, aunque si bien es cierto que cuando había inducción de ANR nos funcionó mejor el MV, por lo que postulamos que ésta última debe

ser de tipo soluble, aunque también en estos casos obtuvimos actividad con NADH, dando valores con menos variabilidad y sin necesidad de realizarlo en condiciones anaeróbicas.

Comparando las dos razas de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) entre sí, vemos que aparecen diferencias significativas en los datos relativos a la ANR en ausencia de nitrato, donde se observa que la raza IM-43B no acepta electrones del NADH, corroborando así los datos del apartado 3.1.1, donde muestra una ANR preferentemente inducida. Con respecto a los datos relativos a la inducción por nitrato, se aprecia un distinto comportamiento bioquímico según se trate de células de *B. japonicum* o de células de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*), debido a su distinta aceptación del MV como donador de electrones.

Tradicionalmente, los ensayos de actividad NR se han hecho a pH 7'5, ya que es el pH óptimo que se ha encontrado para la gran mayoría de enzimas NR, ya sean eucariotas o procariotas (Kleinhofs y Warner, 1990). Nosotros hemos observado, haciendo un seguimiento de los pH óptimos a lo largo del crecimiento de las células en medio líquido, cómo en *B. japonicum* aparece primero un pH de 7'6, que posteriormente en cultivos ya en fase estacionaria pasa a ser de 8'3, mientras que en *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) ocurre lo contrario, aparece primero un pH más básico (8'0) que pasa a valores cercanos a la neutralidad (7'4) a medida que el cultivo celular envejece. Esto puede ser consecuencia de la existencia de varias NR en *Bradyrhizobium* spp. que, aunque pueden estar presentes en las células, se manifiestan con más o menos actividad dependiendo de la fase en que se encuentra el cultivo en vida libre ó del pH del medio.

En el caso de inducción de NR por nitrato en bacterias en vida libre aparecen dos pH óptimos (7'8 y 8'4), que coinciden en ambas razas de *Bradyrhizobium* spp., mostrando ambas actividades una evolución paralela, al contrario de lo observado para las NR de tipo constitutivo.

En estudios con bacteroides aislados de plantas crecidas tanto en presencia como en ausencia de nitrato, en *B.japonicum* aparecen dos pH óptimos, pero con valores inferiores a los observados en bacterias en vida libre. Uno de ellos pasa a ser de 6'4, el mismo que posee una de las NR constitutivas de soja (Jolly et al., 1976, Streit et al., 1987), mientras que el otro se mantiene en valores básicos (8'0); ésto puede estar relacionado con algún tipo de respuesta de la bacteria al transformarse en bacteroide, debido al distinto metabolismo celular existente en el nódulo, que le obligue a adoptar una determinada conformación química para disminuir sus pH óptimos, tratando de adecuarse a los de la planta hospedadora. Sin embargo, los bacteroides de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) muestran en ambos casos (con y sin nitrato) un solo valor de pH óptimo, que es similar a uno de los que aparecen en bacterias en vida libre, y que tiene valores semejantes a los descritos para plantas de altramuza (Kleinhofs y Warner, 1990), rondando siempre la neutralidad (7'0-7'6).

En los rizobios de ambas especies, crecidos sin nitrato, aparecen valores bajos de K_M (3'6 a 16'8), lo cual significa que las enzimas NR_c tienen una alta afinidad por el sustrato y alcanzan pronto la saturación. Al crecerlos en presencia de nitrato, los valores aumentan llegando hasta $K_M=122$, indicando

así una disminución de la afinidad; este efecto es más notable en *B.japonicum* que en *Bradyrhizobium* sp.(*Lupinus*), donde los valores de K_M con/sin nitrato, oscilan dentro de un rango menor. Las NR que aparecen en ausencia de nitrato ó de tipo constitutivo, al estar presentes cuando la concentración de nitrato en el medio es baja o nula, poseen una alta afinidad por el mismo; por el contrario, las NR que aparecen en presencia de nitrato, al estar este último presente en grandes cantidades, no necesitan tener mucha afinidad por él, si no una alta actividad específica para eliminarlo del medio, lo cual consiguen agrupándose y mostrando un efecto cooperativo que explica el cambio que ocurre en el tipo de curva, las cuales pasan de ser hiperbólicas en las NR constitutivas (enzimas que siguen la cinética de MM) a sigmoideal en las NR inducidas (típica de enzimas cooperativas).

En cuanto a bacteroides se refiere, el comportamiento de ambas razas es totalmente distinto. Como aparece en la bibliografía (Bedmar et al., 1991) y como se mostró en los ensayos de invernadero (apartado 3.1), los bacteroides de *Bradyrhizobium* sp.(*Lupinus*) aumentan su actividad NR en presencia de nitrato en el medio; sin embargo, en los bacteroides de *B.japonicum* no se ve inducción de NR en presencia de nitrato (M.Chamber, comunicación personal, Bedmar et al., 1991). Esto concuerda con los datos anteriores, en los que en *Bradyrhizobium* sp.(*Lupinus*) aparecía un pH óptimo y un valor de K_M para cada concentración de nitrato, lo cual nos hace pensar que se trate de dos enzimas distintas, mientras que en *B.japonicum* no hay diferencia entre los datos obtenidos en presencia ó ausencia de

NO_3^- , y lo que observamos en ambos casos, puede corresponderse bien con dos tipos de enzimas, con distintas constantes cinéticas y pH óptimos, bien con una misma enzima que dependiendo del pH al que actúe tiene distintos valores de K_M por reagrupamiento de los monómeros con el consiguiente efecto cooperativo.

4.3. ISOENZIMAS DE LAS NITRATO-REDUCTASAS EN *Bradyrhizobium* spp

El método a seguir para caracterizar las diferentes isoenzimas de cualquier tipo de actividad es la purificación de las mismas mediante sucesivos pasos de la muestra por distintas columnas cromatográficas (Streit *et al.*, 1985). Tras el paso por tres columnas, nosotros hemos obtenido una purificación de, aproximadamente 150 veces de la enzima NR de *Bradyrhizobium* spp. Intentos anteriores de purificación (Kennedy *et al.*, 1975; Delgado *et al.*, 1992) se basaron solamente en precipitación con sulfato amónico y posterior paso por columna de exclusión molecular. El método desarrollado por nosotros permite un mayor grado de purificación.

La purificación de las enzimas NR, tanto de células en vida libre crecidas en ausencia de nitrato como de bacteroides aislados de plantas desarrolladas en cultivo hidropónico sin nitrato reveló la existencia de dos NR constitutivas, con unos PM aproximados de 90 y 360 kD, haciéndonos pensar que esta última se trate de un tetrámero. La purificación de NR de células en vida libre crecidas con nitrato o de bacteroides aislados de plantas que crecieron en presencia del mismo reveló la aparición de dos nuevas NR en torno a 180 y 720 kD (NR inducidas), que igualmente podría tratarse de un monómero y su correspondiente forma tetramérica. Los geles de SDS-PAGE, mostraron que los cuatro tipos de NR poseen idénticas subunidades de unos 72 kD. Puesto que los datos obtenidos de la columna de Sephadex mostraban un monómero de 90 kD, la diferencia entre ambos datos puede ser debida a las distintas técnicas utilizadas o a que al

tratar con SDS se desprenda algún componente de pequeño tamaño, ya que en algunos geles se observaron bandas de 15-20 kD, que al igual que ocurre en otras NR podría tratarse del grupo FAD (Kleinhofs y Warner, 1990). Las diferencias entre las dos formas de NR constitutivas, así como entre las dos de NR inducidas puede deberse a simples cambios conformacionales para conseguir una mayor actividad específica en forma de tetrámero. Casos similares están descritos, como la NR de *Chlorella vulgaris* que posee un monómero de 90 kD que muestra actividad NR con NADH, mientras que es necesaria la conformación en forma de tetrámero para que tenga actividad con MV (Solomonson et al., 1986). Esto coincidiría con el apartado 3.2., donde el MV era usado preferentemente por las nr₁. La inducción "de novo" de una proteína NR en presencia de NO₃⁻ puede deberse a la existencia de más de un gen que codifique para proteínas distintas.

Cuando purificamos las enzimas NR de células en distinta fase de crecimiento en medio sin nitrato, y medimos su actividad, vimos que en células jóvenes de USDA-110 la NR de 360 kD era más activa que la de 90 kD, mientras que en células ya en fase estacionaria mostraba más actividad la de menor tamaño; ocurriendo lo contrario en células de L-750. Si relacionamos estos datos con los obtenidos para el pH óptimo en el apartado 3.2, podemos concluir que la NR de más pequeño PM de *Bradyrhizobium* spp. tiene un pH óptimo de 8'2 y su tetrámero de 7'4. El hecho de que según la fase de crecimiento sea más abundante uno u otro tipo de NR, puede ser por un equilibrio de la reacción, que dependiendo del pH del medio puede estar desplazada hacia uno u otro lado, provocando una mayoría de

formas NR adaptadas a ese pH. Así, a medida que un cultivo celular de *Bradyrhizobium spp.* crece el pH del medio se va alcalinizando; esto estaría de acuerdo con los datos anteriores, donde el pH óptimo inicial tiene valores inferiores que el final (7'4 frente a 8'2) y donde inicialmente aparece la mayoría de NR en forma de tetrámero para, conforme el pH va aumentando pasar a una mayoría de NR en forma de monómero.

En cuanto a las células crecidas en anaerobiosis con nitrato como aceptor de electrones, nuestros estudios apoyan la idea de Daniel et al. (1982), de que estas células tienen un tiempo de generación mayor, frente a otros estudios que sugieren lo contrario (Hassan et al., 1985). Al purificar las NR de células crecidas bajo estas condiciones, las diferencias más destacadas que encontramos fueron: 1º) la práctica desaparición de las NR monoméricas (90 y 180 kD), y 2º) la disminución de la actividad en las NR tetraméricas. El menor crecimiento celular podría ser debido a que las NR de tipo respiratorio no tengan la misma capacidad de generar energía que cuando las células crecen en presencia de O₂. Se podría postular que la desaparición de las NR de menor tamaños debido a que al existir una alta concentración de nitrato en el medio, lo que tenemos es una mayoría de NR en forma tetramérica para conseguir un efecto cooperativo y una mayor actividad específica; también podría tratarse de que, al no llegar a los pH alcalinos debido a una baja actividad metabólica bacteriana no es necesaria la presencia de formas monoméricas que actúan a esos pH, según se ha descrito en el apartado anterior.

La presencia de distintos isómeros en los nódulos de las leguminosas está ampliamente descrita para varios enzimas. Así, la enzima GDH aparece en una sola forma isoenzimática en la raíz, mientras que en los nódulos aparecen hasta 8 isómeros distintos (Ratajczak et al, 1986), o la AAT, que aparece en 4 formas distintas en los nódulos (Reynolds y Farnden, 1979). De igual modo nosotros encontramos para la NR de *Bradyrhizobium* spp. la existencia de 12 formas isoenzimáticas (tres valores de pI para cada uno de los cuatro PM de NR); además estos valores eran los mismos, independientemente de la NR de la que se trató (monómero, tetramero, constitutiva o inducida), lo cual viene a corroborar la hipótesis de que las de mayor PM se corresponden con formas tetraméricas de las de menor PM, puesto que al asociarse siguen manteniendo los mismos pI, aunque variaban ligeramente dependiendo de la especie de *Bradyrhizobium* de la que tratásemos. Así, al igual que nos ocurrió para los pH óptimos, las NR de *B.japonicum* volvieron a presentar puntos isoeléctricos más bajos. El valor 6'7 podría corresponderse con NR respiratorias, ya que Fernández-López y Bedmar (1993) describieron en *B.japonicum* dos NR respiratorias, una de las cuales poseía un pI similar. La existencia de tantas formas isoenzimáticas podría explicarse por una relativa facilidad de estas enzimas para ganar ó perder algunos radicales, que le permita así variar sus puntos isoeléctricos con objeto de adaptarse a los distintos pH del medio y a las distintas concentraciones de nitrato.

4.4. INFLUENCIA DEL N COMBINADO SOBRE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES EN *Bradyrhizobium* sp (*Lupinus*) Y CITOSOLES NODULARES

La disponibilidad de N en forma inorgánica en el medio circundante a la raíz (suelo o solución nutritiva) afecta a la asociación simbiótica *Rhizobium*-leguminosa según se ha observado en multitud de trabajos sobre el tema. Hasta ahora se han descrito tanto efectos inhibidores como estimulantes (Gibson 1976, Houwaard 1980, Groat y Vance 1981, Streeter 1985), lo cual indica que la relación entre el N asimilado por el sistema radicular y la fijación simbiótica de N₂ en el nódulo es muy compleja. Nuestros resultados muestran que los patrones electroforéticos de proteínas totales variaban tanto en los rizobios crecidos en vida libre como en el nódulo (citosol y bacteroide) cuando la planta dispone de alguna forma asimilable de N en el medio. No se ha utilizado suficiente metodología como para permitirnos asegurar con total certeza qué proteína se corresponde con cada banda afectada en los distintos tratamientos, lo que habría exigido un estudio bioquímico en profundidad para cada caso particular, aunque basándonos en la bibliografía existente hemos hecho algunas especulaciones. Solamente en el caso de las enzimas NR, en las que se han caracterizado sus constantes bioquímicas, hemos podido hacer estimaciones precisas. El objetivo fue poner de manifiesto los numerosos cambios que ocurren en el metabolismo de las proteínas nodulares y bacterianas en respuesta a la presencia de distintas fuentes de N combinado en el medio.

Los datos obtenidos en función de los distintos tratamientos nitrogenados dentro de una misma raza rizobiana, fue distinta según se tratase de sus bacterias crecidas en vida libre o de la forma bacteroidal de las mismas; esto es consecuencia de que ambas formas celulares exhiben metabolismos diferentes y tienen respuestas distintas ante los agentes externos.

En las bacterias en vida libre los cambios producidos por los compuestos nitrogenados variaron según la raza bacteriana, aunque hubo algunos cambios comunes para ambas, como la desaparición de una banda de 52 kD cuando existía amonio en el medio de cultivo o la presencia de un péptido de 27 kD en células crecidas con NN. En cuanto a la NR los datos vinieron a confirmar los que ya habíamos obtenido previamente; así, aparecieron en los tratamientos nitrogenados tres bandas, una en torno a los 90 kD, otra de 72 kD y una última de 21 kD, que se podrían corresponder con la NR, la NR sin FAD y el grupo FAD, respectivamente. Además, la banda de mayor PM no aparece en células de IM-43B crecidas en ausencia de nitrato, mientras que en L-750 sí lo hace; esto vendría a corroborar los datos de apartados anteriores con respecto a la NR_c y a la NR_i.

Las bandas de proteínas en los bacteroides variaban dependiendo tanto de la especie de leguminosa de la que los hubiéramos aislado, como de la raza de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) inoculada. Sin embargo hubo, al igual que en las bacterias, algunos cambios comunes, que deben estar relacionados con enzimas importantes del metabolismo celular. Así, la presencia de amonio en la solución nutritiva produjo la represión de una proteína de unos 70 kD (73 kD en la raza IM-43B y 68 en

L-750) y de otra de 64 kD, pudiéndose corresponder esta última con la GS, como mencionamos previamente. En el caso de IM-43B pudimos observar cómo los posibles componentes de la nitrogenasa se veían afectados por la presencia de cualquier tipo de compuesto nitrogenado, disminuyendo su concentración bandas de 48 y 32 kD, que podrían corresponderse con los componentes α y β de la dinitrogenasa y con el α de la dinitrogenasa reductasa, respectivamente (Vance, 1990). Los cambios ocurridos en la NR vuelven a corroborar los resultados previos, apareciendo una banda en presencia de nitrato en torno a los 86 kD en la raza IM-43B y de 90-94 kD en L-750; sin embargo en esta última raza la inducción es mayor y se produce también con urea, al igual que en los ensayos de invernadero, donde la primera raza no aumentaba su ANR con urea, mientras que la segunda sí lo hacía. Por otra parte, las bandas que aparecían con PM en torno a los 20 y 70 kD, cuyas sumas daban un PM de, aproximadamente 90 kD, podrían corresponderse con la proteína NR rota por el SDS, como se menciona en el apartado 3.2. El hecho de que en los geles de NR purificada sólo aparecieran bandas de unos 72 y 18 kD, y nunca la de 90 kD, podría ser debido a que la proteína purificada fuera más susceptible a la ruptura con SDS que cuando se solubilizó el bacteroide íntegro con el mismo detergente. Con estos resultados volvemos a apoyar la idea de que el nitrato tiene acceso al bacteroide en tratamientos de larga duración y a concentraciones elevadas (> 5 mM), provocando un aumento de proteína NR en el mismo.

En la composición proteica de los citosoles nodulares no influyó la raza rizobiana y sí la especie vegetal y el compuesto

nitrogenado. En cuanto a la respuesta obtenida ante la presencia de alguno de éstos, cabe destacar la aparición de bandas correspondientes a 90, 86 y 22'5 kD, de las que probablemente las dos primeras se corresponden con dos bandas de NR codificadas por genes estructurales distintos y quizás una dependiente de NADH y otra de NADPH, y la última con el grupo FAD común a ambas. Esto sería similar a lo que ya se ha descrito para otras leguminosas (ej. soja) donde aparecen varias NR, cuyos pesos varían poco entre sí y oscilan entre 100-110 kD (Streit *et al.*, 1985). Por otra parte, hay que destacar los cambios producidos en una banda de 42 kD, que aunque disminuye con cualquier tratamiento en *L.luteus*, en *L.albus* parece que el amonio tuviera un efecto inductor; si observamos las gráficas del correspondiente ensayo de invernadero (apartado 3.1.3) vemos cómo en *L.albus* las enzimas NR y N₂asa se ven más afectadas por el amonio que en *L.luteus*, sin embargo los rendimientos (contenido de N/planta) no muestran diferencias significativas entre ambas especies. Esto puede explicarse si relacionamos ambos datos; la disminución de actividades enzimáticas en los bacteroides se pudo ver compensada en *L.albus* mediante la inducción en el citosol de una enzima relacionada con el metabolismo del amonio (GS ó GDH, ya que sus PM oscilan entre 42-44 kD) que tomara amonio del medio y lo asimilara directamente a través de cualquiera de las dos vías posibles (GS/GOGAT o GDH). Finalmente, la especie de leguminosa influyó en la síntesis de nodulinas importantes, como las leghemoglobinas, variando en *L.albus* y *L.luteus* la proporción relativa de cada una de las tres bandas que aparecieron.

También se apreciaron variaciones importantes en otras enzimas que pueden ser algunas de las relacionadas con el metabolismo del carbono (ej. malato-deshidrogenasa) ó con la barrera de difusión del O₂ (nodulina N-75).

5. CONCLUSIONES

- 1^a. La especie de leguminosa hospedadora influye en la expresión de las ANR en los bacteroides.
- 2^a. Las plantas inoculadas con cepas de *Bradyrhizobium* sp (*Lupinus*) que poseen actividad NR de tipo constitutivo tuvieron mayores rendimientos y contenidos en nitrógeno.
- 3^a. La actividad nitrato-reductasa del bacteroide complementa a la nitrogenasa en caso de stress por nitrato, en su aporte de nitrógeno a la parte aérea, puesto que una fuerte caída en la producción de proteínas en el nódulo no lleva asociada una caída en el aporte de carbohidratos al nódulo por la planta.
- 4^a. Los efectos inhibidores que se observan por la presencia de compuestos nitrogenados sobre la fijación de nitrógeno, son debidos principalmente a la acción directa de éstos sobre el estado fisiológico de la planta.
- 5^a. La presencia de nitrato en el medio de cultivo afecta a los pH óptimos y a las K_M de las NR de bacteroides de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) y no lo hace sobre los de bacteroides de *B. japonicum*.
- 6^a. Las NR que aparecen en ausencia de nitrato en bacterias de *Bradyrhizobium* spp. tienen valores bajos de K_M y siguen la cinética de Michaelis-Menten.

- 7^a. Las NR obtenidas en presencia de nitrato en bacterias de *Bradyrhizobium* spp. tienen valores altos de K_M y presentan una curva sigmoideal, típica de enzimas que poseen un efecto cooperativo.
- 8^a. En *Bradyrhizobium* spp. existen dos NR constitutivas, cuyos PM son 90 y 360 kD, correspondiéndose la segunda con un tetrámero de la primera.
- 9^a. En *Bradyrhizobium* spp. existen dos NR inducidas, cuyos PM son 180 y 720 kD, correspondiéndose la segunda con un tetrámero de la primera.
- 10^a. Para cada una de las cuatro NR anteriores, existen tres formas isoenzimáticas de pI distintos.
- 11^a. La presencia de N combinado en el medio de crecimiento, afectó a los patrones de proteínas totales, tanto en bacterias en vida libre como en nódulos (bacteroides y citosol).
- 12^a. El patrón proteico de los bacteroides se ve influido por la especie de leguminosa hospedadora.
- 13^a. La abundancia relativa de cada uno de los tres tipos de leghemoglobina presentes en el citosol nodular de *Lupinus* sp. viene determinada por la planta hospedadora.

6. BIBLIOGRAFIA

- Alcantar-Gonzales, G.; Migianac-Maslow, M.; Champigny, M.L. y Moyse, A.** 1988. Effect d'un apport de nitrates sur l'équilibre énergétique et les activités de réduction de l'acétylène (capacité maximale de la nitrogénase) et nitrate réductase de nodosités de racines de soja en symbiose avec *Bradyrhizobium japonicum*. C.R. Acad. Sci. Paris, 307, III: 145-152.
- Andrews, M.** 1986. The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants. *Plant Cell Environ.*, 9: 511.
- Aparicio-Tejo, P.M. y Sánchez Díaz, M.** 1982. Nodule and leaf nitrate reductases and nitrogen fixation in *Medicago sativa* L. under water stress. *Plant Physiol.*, 69: 479-482.
- Azcón, G.; de Aguilar, C.; Barea, J.M. y Olivares, J.** 1988. Simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. En: *Biología Vegetal*. Prensa Científica (Ed.). Barcelona. pp. 56-66.
- Barceló, J.; Rodrigo, G.N.; Sabater, B. y Sánchez, R.** 1987. Reducción de nitrógeno. En: *Fisiología Vegetal*. Ediciones Pirámide S.A. Madrid. pp. 362-380.
- Becana, M.; Aparicio-Tejo, P.M. y Sánchez Díaz, M.** 1984. Root nodule enzymes of ammonia metabolism from *Medicago sativa* L. as influenced by nitrate levels. *J. Plant Physiol.*, 116: 285-292.

- Becana, M.; Aparicio-Tejo, P.M. y Sánchez-Díaz, M. 1985a. Nitrate and nitrite reduction by alfalfa root nodules: accumulation of nitrite in *Rhizobium meliloti* bacteroids and senescence of nodules. *Physiol. Plantarum*, 64: 353-358.
- Becana, M.; Aparicio-Tejo, P.M. y Sánchez-Díaz, M. 1985b. Nitrate and nitrite reduction in the plant fraction of alfalfa root nodules. *Physiol. Plantarum*, 65: 185-188.
- Becana, M.; Aparicio-Tejo, P.M. y Sánchez-Díaz, M. 1985c. Levels of ammonia, nitrite, and nitrate in alfalfa root nodules supplied with nitrate. *J. Plant Physiol.*, 119: 359-367.
- Becana, M., Aparicio-Tejo, P.M. y Sánchez Díaz, M. 1986. Nitrate metabolism in alfalfa root nodules under water stress. *J. Exp. Bot.*, 37: 798.
- Becana, M. y Sprent, J.I. 1987. Nitrogen fixation and nitrate reduction in the root nodules of legumes. *Physiol. Plantarum*, 70: 757-765.
- Becana, M.; Minchin, F.R. y Sprent, J.I. 1989. Short-term inhibition of legume N₂ fixation by nitrate: I. Nitrate effects on nitrate-reductase activities of bacteroids and nodule cytosol. *Planta*, 180: 40-45.

- Becana, M: y Klucas, R.V.** 1992. Oxidation and reduction of leghemoglobin in root nodules of leguminous plants. *Plant Physiol.*, 98: 1217-1221.
- Bedmar, E.J. y Olivares, J.** 1986. Estudio de las actividades nitrogenasa, hidrogenasa y nitrato reductasa, consumo de oxígeno y contenido en ATP de los nódulos formados por las razas de *Rhizobium leguminosarum* 128C53 y 300 en simbiosis con guisantes. *Microbiol.*, 2: 89-96.
- Bedmar, E.J. y Olivares, J.** 1988. Limitaciones de la fijación biológica del nitrógeno. En: *Biología Vegetal*. Prensa Científica (Ed.). Barcelona. pp. 74-83.
- Bedmar, E.J.; Delgado, J.M. y Olivares, J.** 1990. Membrane vesicle-bound nitrate reductase from *Bradyrhizobium japonicum*. En: *Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives*. P.M. Gresshoff, L.E. Roff, G. Stacey and W.E. Newton (Eds.). Chapman and Hall Publ. New York, London.
- Bedmar, E.J., Delgado, J.M., Fernández-López, M. y Olivares, J.** 1991. Utilización de nitrato en bacteroides y citosol de (*Brady*)*Rhizobium*. En: *Aportaciones a la Biología de la Fijación del Nitrógeno Atmosférico*. M. Megías, A.J. Palomares y F. Ruíz-Berraquero (Eds.). Universidad de Sevilla. pp. 331-345.
- Bergersen, F.J.** 1982. Root nodules of legumes: structure and function. Chichester: Research studies Press. pp. 61-79.

- Bhandari, B. y Nicholas, D.J.D.** 1984. Denitrification of nitrate to nitrogen gas by washed cells of *Rhizobium japonicum* and by bacteroids from *Glycine max*. *Planta*, 161: 81-85.
- Bhandari, B. y Nicholas, D.J.D.** 1986. Properties of glutamine synthetase of bacteroids from root nodules of *Glycine max*. *Plant Science*, 44: 89-96.
- Bishop, P.E.; Jarlenski, D.M.L. y Hetherington, D.R.** 1980. Evidence for an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 7342-7346.
- Blasco, F.; Nunzi, F.; Pommier, J.; Brasseur, R.; Chippaux, M. y Giordano, G.** 1992. Formation of active heterologous nitrate reductases between nitrate reductases A and B of *E. coli*. *Mol. Microbiol.*, 6: 209-219.
- Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Breitenbeck, G.A. y Bremner, J.M.** 1989. Ability of free-living cells of *Bradyrhizobium japonicum* to denitrify in soils. *Biol. Fert. Soils*, 7: 219-224.
- Brock, T.D. y Madigan, M.T.** 1988. *Biology of microorganisms*. Ed. Prentice-Hall, New Jersey. pp. 572-631.

- Burns, R.C. y Hardy, R.W.F.** 1975. Nitrogen Fixation in Bacteria and Higher Plants. R.C. Burns and R.W.F. Hardy (Eds). Springer-Verlag. New York. pp. 189.
- Burris, R.H.** 1976. Nitrogen fixation. En: Plant Biochemistry. J. Bonner y J.E. Varner (Eds.). Academic Press. New York. pp. 887-908.
- Caboche, M. y Rouze, P.** 1990. Nitrate reductase: A target for molecular and cellular studies in higer plants. Trends Genet., 6: 187-192.
- Campbell, W.H.** 1988. Nitrate reductase and its role in nitrate assimilation by plants. *Physiol. Plantarum*, 74: 214-219.
- Campbell, W.H.** 1992. Expression in *Escherichia coli* of cytochrome c reductase activity from maize NADH: nitrate reductase complementary DNA. *Plant Physiol.*, 99: 693-699.
- Caroll, B.J. y Gresshoff, P.M.** 1983. Nitrate inhibition of nodulation and nitrogen fixation in white clover. *Z. Pflanzenphysiol.*, 110: 77.
- Caroll, B.J.; Hansen, A.P.; McNeil, D.L. y Gresshoff, P.M.** 1987. Effect of oxygen supply on nitrogenase activity of nitrate- and dark-stressed soybean (*Glycine max* [L] Merr.) plants. *Austr. J. Plant Physiol.*, 14: 679-687.

- Crawford, N.; Smith, M.; Bellissimo, D. y Davis, R.** 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.
- Chamber-Pérez, M.A.** 1975. Inoculation and survival of *Rhizobium japonicum* strains under soybean crops on calcareous soil. M.S. Thesis. Iowa State University. USA, pp. 28-31.
- Chamber-Pérez, M.A.** 1979. Efecto de la concentración de varias razas de *Rhizobium japonicum* introducidas en los inoculantes, sobre la nodulación y producciones de la soja. An. INIA. Ser. Producción vegetal nº 10: 135-148.
- Cheniae, G. y Evans, H.J.** 1959. Properties of a particulate nitrate reductase from the nodules of the soybean plants. Biochim. Biophys. Acta, 35: 140-153.
- Daniel, R.M. y Appleby, C.A.** 1972. Anaerobia-nitrate, symbiotic and aerobic growth of *Rhizobium japonicum*: effects on cytochrome P-450, other haemoproteins, nitrate and nitrite reductases. Biochim. Biophys. Acta, 275: 347-354.
- Daniel, R.M. y Gray, J.** 1976. Nitrate reductase from anaerobically grown *Rhizobium japonicum*. J. Gen. Microbiol., 96: 247-251.

- Daniel, R.M.; Smith, I.M.; Philip, J.A.D.; Ratcliffe, H.D.; Drozd, J.W. y Bull, A.T. 1980a. Anaerobic growth and denitrification by *R. japonicum* and other rhizobia. *J. Gen. Microbiol.*, 120: 517-521.
- Daniel, R.M.; Steele, K.W. y Limmer, A.W. 1980b. Denitrification by rhizobia: A possible factor contributing to nitrogen losses from soils. *NZ 3 Agric. Sci.*, 14: 109-112.
- Daniel, R.M.; Limmer, A.W.; Steele, K.W. y Smith, I.M. 1982. Anaerobic growth, nitrate reduction and denitrification in 46 *Rhizobium* strains. *J. Gen. Microbiol.*, 128: 1811-1815.
- Darrow, R.A. 1980. Role of GS in nitrogen fixation. En: *Glutamine: Metabolism, Enzymology and Regulation*. J. Mora y R. Palacios (Eds.). Academic Press. New York, London. pp. 139-166.
- Davies, D.D. y Teixeira, A.N. 1975. The synthesis of glutamate and the control of glutamate dehydrogenase in pea mitochondria. *Phytochemistry*, 14: 647-656.
- Delgado, M.J.; Olivares, J. y Bedmar, E. J. 1992. Constitutive and nitrate-induced, membrane-bound nitrate reductase from *Bradyrhizobium japonicum*. *Curr. Microbiol.*, 24: 121-124.
- Eisbrenner, G. y Evans, H.J. 1983. Aspects of hydrogen metabolism in nitrogen-fixing legumes and other plant-microbe associations. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 34: 105-136.

- Evans, H.J.** 1954. Diphosphopyridine nucleotide-nitrate reductase from soybean nodules. *Plant Physiol.*, 29: 298-301.
- Fernández-López, M.; Delgado, M.J.; Olivares, J. y Bedmar, E.J.** 1989. Utilización del nitrato por bacteroides y citosol de nódulos formados por *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiología*, 5: 13-23.
- Fernández-López, M. y Bedmar, E.J.** 1993. Metabolismo del nitrato en microorganismos fijadores de dinitrógeno: respiración del nitrato en *B.japonicum*. VI Reunion Nacional de Fijación de Nitrógeno. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno. pp. 25-27.
- Franssen, H.J.; Scheres, B.; van der Wiel, C. y Bisseling, T.** 1988. En: *Molecular genetics of plant-microbe interactions*. R. Palacios y D.P.S. Verma (Eds). APS press, St. Paul, Minnesota. pp. 321-326.
- Giannakis, C.; Nicholas, D.J.D. y Wallace, W.** 1988. Utilization of nitrate by bacteroids of *Bradyrhizobium japonicum* in the soybean root nodule. *Planta*, 174: 51-58.
- Gibson, A.H.** 1976. Recovery and compensation by nodulated legumes to environmental stress. En: *Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants*. Nutman (Ed.). Cambridge University Press. pp. 380-415.

- Gibson, A.H. y Harper, J.E.** 1985. Nitrate effect on nodulation of soybean by *Bradyrhizobium japonicum*. *Crop Science*, 25: 497-501.
- Goa, J.** 1953. A micro biuret method for protein determination. Determination of total protein in cerebrospinal fluid. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigations*, 5: 218-222.
- Groat, R.G. y Vance, C.P.** 1981. Root nodule enzymes of ammonia assimilation in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.*, 67: 1198-1203.
- Hageman, R.V. y Burris, R.H.** 1978. Nitrogenase y nitrogenase-reductase associate and dissociate with each catalytic cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 75: 2699-2702.
- Hardy, R.W.F.; Holsten, R.D.; Jackson, E.K. y Burns, R.C.** 1973. The acetylene-ethylene assay for N₂-fixation: laboratory and field evaluations. *Plant Physiol.*, 43: 1185-1207.
- Hardy, R.W.F.** 1976. En: *Proceedings of First International Symposium on Nitrogen Fixation*. W.E. Newton and C.J. Nyman (Eds). Washington State University Press. pp. 693-717.

- Hardy, R.W.F.; Havelka, V.D. y Quebedeaux, B.** 1977. Increasing crop productivity: the problem, strategies, approach and selected rate-limitations related to photosynthesis. Proceedings of the fourth International Congress on Photosynthesis. O. Hall, J. Cooms y T.W. Goodwin (Eds.) The Biochemical Society, London, Colchester. pp. 695-735.
- Hassan, G.A.; Zablutowicz, R.M. y Focht, D.D.** 1985. Kinetics of denitrifying growth by fast-growing cowpea rhizobia. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 29: 517-521.
- Heckmann, M.O. y Drevon, J.J.** 1987. Nitrate metabolism in soybean root nodules. *Physiol. Plantarum*, 69: 721-725.
- Heichel, G.H.** 1987. Energy in Plant Nutrition and Plant Control. Z.R. Hesel (Ed.). pp. 63-80.
- Hochstein, L.I. y Tomlinson, G.A.** 1988. The enzymes associated with denitrification. *Ann. Rev. Microbiol.*, 42: 231-261.
- Houwaard, F.** 1980. Influence of ammonium and nitrate nitrogen on nitrogenase activity of pea plants as affected by light intensity and sugar addition. *Plant Soil*, 54: 271-282.
- Hunter, W.J.** 1983. Soybean root and nodule nitrate reductase. *Physiol. Plantarum*, 59: 471-475.

- Imsande, J.** 1986a. Ineffective utilization of nitrate by soybean during pod fill. *Physiol. Plantarum*, 68: 689-694.
- Imsande, J.** 1986b. Inhibition of nodule development in soybean by nitrate or reduced nitrogen. *J. Exp. Bot.*, 37: 348-355.
- Iobbi-Nivol, C.; Santini, C.L.; Bonnefay, V. y Giordano, G.** 1987. Biochemical and immunological evidence for a second nitrate reductase of *Escherichia coli* k-12. *J. Biochem.*, 168: 451-459.
- Iobbi-Nivol, C.; Santini, C.L.; Blasco, F. y Giordano, G.** 1990. Purification and further characterization of the second nitrate reductase of *Escherichia coli* k-12. *Enr. J. Biochem.*, 188: 679-687.
- Israel, D.W.; Howard, R.L.; Evans, H.J. y Russell, S.A.** 1974. Purification and characterization of the molybdenum-iron protein component of nitrogenase from soybean nodule bacteroids. *J. Biol. Chem.*, 249: 500-508.
- Jingwen, Ch. y Kennedy, I.R.** 1985. Purification and properties of lupine nodule glutamine synthetase. *Phytochemistry*, 24: 2167-2172.

- Johnson, J.L.; Bastian, N.R. y Rajagopalan, K.V.** 1990. Molybdopterin guanine dinucleotide, a modified form of molybdopterin identified in the molybdenum cofactor of demethyl sulfoxide reductase from *Rhodobacter sphaeroides* form a specialist denitrificans. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 87: 3190-3194.
- Jolly, S.O.; Campbell, W. y Tolbert, N.E.** 1976. NADPH- y NADH-nitrate reductases from soybean leaves. Arch. Biochem. Biophys., 174: 431-439.
- Kamberger, W.** 1977. Regulation of symbiotic nitrogen fixation in root nodules of alfalfa (*Medicago sativa*) infected with *Rhizobium meliloti*. Arch. Microbiol., 115: 103.
- Kennedy, I.R.; Rigaud, J. y Trinchant, J.C.** 1975. Nitrate reductase from bacteroids of *Rhizobium japonicum*: enzyme characteristics and possible interaction with nitrogen fixation. Biochimica et Biophysica Acta., 397: 24-35.
- Kleinhofs, A. y Warner, R.L.** 1990. Advances in nitrate assimilation. En: The Biochemistry of Plants: a comprehensive treatise. B.J. Minflin y Peter J. Lea (Eds). Academic Press. Harcourt Brace. Javanovich Publishers. Vol. 16. pp. 89-119.
- Kondorosi, A.; Barabas, I.; Svab, Z.; Orosz, L. y Sik, T.** 1973. Evidence for common genetic determinants of nitrogenase and nitrate reductase in *Rhizobium meliloti*. Nature. New Biology, 246: 153-154.

- Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Layzell, D.B.; Hunt, S. y Palmer, G.R.** 1990. Mechanism of nitrogenase inhibition in soybean nodules. Pulse-modulated spectroscopy indicates that nitrogenase is limited by O₂. *Plant Physiol.*, 92: 1101-1107.
- Leonard, L.T.** 1944. Method of testing bacterial cultures and results of tests of commercial inoculants. USDA Circ. No. 703. Washington D.C. pp. 8.
- Ligero, F.; Lluch, C.; Olivares, J. y Bedmar, E.J.** 1987. Nitrate reductase activity in nodules of pea inoculated with hydrogenase positive and hydrogenase negative strains of *Rhizobium leguminosarum*. *Physiol. Plantarum*, 69: 313-316.
- Lowe, R.M. y Evans, H.J.** 1964. Preparation and some properties of a soluble nitrate reductase from *Rhizobium japonicum*. *Biochim. Biophys. Acta* 85: 377-389.
- Miller, S.S.; Boylan, K.L.M. y Vance, C.P.** 1987. Alfalfa root nodule carbon dioxide fixation III. Immunological studies of nodule phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.*, 84: 501-508.

- Minchin, F.R.; Minguez, M.I.; Sheehy, J.E.; Witty, J.F. y Skot, L.** 1986. Relationships between nitrate and oxygen supply in symbiotic nitrogen fixation by white clover. *J. Exp. Bot.*, 87: 1103-1113.
- Minchin, F.R.; Becana, M. y Sprent, J.I.** 1989. Short-term inhibition of legume N₂ fixation by nitrate: II. Nitrate effects on nodule oxygen diffusion. *Planta*, 180: 46-52.
- Murillo, J.; Villa, A.; Chamber, M. y Ruiz-Argueso, T.** 1989. Occurrence of H₂-uptake hydrogenase in *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) and their expression in nodules of *Lupinus* sp. and *Ornithopus compressus*. *Plant Physiol.*, 89: 78-85.
- Nicholas, J.D.J. y Nason, A.** 1957. Enzymes involved in metabolism related to nitrogenase. En: *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*. F.J. Bergensen (Ed.). John Wiley and sons. pp. 265-315.
- Nelson, L.M. y Edie, S.A.** 1988. Effect of nitrate on nitrogen fixation and nodule carbohydrate and organic and concentrations in pea nutrient deficient in nitrate reductase. *Physiol. Plantarum*, 73: 534-540.
- Noel, K.D.; Carneol, M. y Brill, W.J.** 1982. Nodule protein synthesis and nitrogenase activity of soybean exposed to fixed nitrogen. *Plant Physiol.*, 70: 1236-1241.

- O'Farrell, P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 250(10): 4007-4021.
- O'Hara, G.W.; Daniel, R.M. y Steele, K.W. 1983. Effect of oxygen on the synthesis, activity and breakdown of the *Rhizobium* denitrification system. *J. Gen. Microbiol.*, 129: 2405-2412.
- O'Hara, G.W. y Daniel, R.M. 1985. Rhizobial denitrification: a review. *Soil Biol. Biochem.*, 17: 1-9.
- Oyhama, T. y Kumazawa, K. 1979. Assimilation and transport of nitrogenous compounds originated from $^{15}\text{N}_2$ fixation and NO_3^- absorption. *Soil. Sci. Plant Nutr.*, 25: 9-19.
- Oyhama, T. y Kumazawa, K. 1987. Characteristics of nitrate respiration of isolated bacteroids. *Soil Science and Plant Nutrition*, 33(1): 69-78.
- Orme-Johnson, H.W. 1985. Molecular basis of biological nitrogen fixation. *Annu. Rev. Biophys. Chem.*, 14: 419-459.
- Pateman, J.A.; Cove, D.J.; Rerer, B.M. y Robert, D. 1964. A common co-factor for nitrate reductase and xanthine dehydrogenase wich also regulates the synthesis of nitrate reductase. *Nature*, 201: 58-60.

- Postgate, J.** 1981. Fijación del nitrógeno. Cuadernos de biología. Ed. Omega. pp. 18-27.
- Postgate, J.R.** 1982. Biological nitrogen fixation: fundamentals. Ed. Phil. Trans. R. Soc. 269.
- Rajagopalan, K.V.** 1989. Chemistry and biology of the molybdenum cofactor. En: Molecular and Genetic Aspect of Nitrate Assimilation. J. Wray and J. Kinghorn (Eds). Oxford:Oxford Science Publications. pp. 212-216.
- Randall, D.D.; Russell, W.J. y Johnson, D.R.** 1978. Nodule nitrate reductase as a source of reduced nitrogen in soybean, *Glycine max.* *Physiol. Plantarum*, 44: 325-328.
- Ratajczak, L.; Koroniak, D.; Mazurowa, H.; Ratajczac, W. y Prus-Glowacki, W.** 1986. Glutamate dehydrogenase isoforms in lupine roots and root nodules. Immunological studies. *Physiol. Plantarum*, 67: 685-689.
- Reynolds, P.H.S. y Farnden, K.J.F.** 1979. The involvement of aspartate aminotransferases in ammonium assimilation in Lupin nodules. *Phytochemistry*, 18: 1625-1630.
- Rigaud, J.; Bergersen, F.J.; Turner, G.L. y Daniel, R.M.** 1973. Nitrate dependent aerobic acetylene-reduction and nitrogen fixation by soybean bacteroids. *J. Gen. Microbiol.*, 77: 137-144.

- Roberts, G.P. y Brill, W.J.** 1981. Genetics and regulation of nitrogen fixation. *Annu. Rev. Microbiol.*, 35: 207-235.
- Robson, R.L.; Eady, R.R.; Richardson, T.M.; Miller, R.W.; Hawkins, M.E. y Postgate, J.** 1986. The alternative nitrogenase of *A. chroococcum* is a vanadium enzyme. *Nature*, 322: 388-390.
- Sánchez Esquivel, S.** 1988. Nitrogen Source Control of Microbial Processes. CRC Press, Inc. Boca Ratón, Florida.
- Sandeman, R.A. y Gresshoff, P.M.** 1985. Nitrogenase activity and inactivation in isolated bacteroids from the legume siratro and the non-legume *Parasponia rigida*. *Pl. Sci. Lett.*, 34: 239-246.
- Schubert, K.R.; Engelke, J.A.; Russell, S.A. y Evans, H.J.** 1977. Hydrogen reactions of nodulated leguminous plants. *Plant Physiol.*, 60: 651-654.
- Schubert, K.R. y Wolk, C.P.** 1982. The Energetics of Biological Nitrogen Fixation. American Society of Plant Physiologists. Rockville, 30.
- Schuller, K.A.; Minchin, F.R. y Gresshoff, P.M.** 1988. Nitrogenase activity and oxygen diffusion in nodules of soybean cv. Bragg and a supernodulating mutant: effects of nitrate. *J. Exp. Bot.*, 39: 865-877.

- Serrano, A. y Chamber, M.** 1990. Nitrate reduction in *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) strains and its effects on their symbiosis with *Lupinus luteus*. *J. Plant Physiol.*, 136: 240-246.
- Sik, T.; Kondorosi, A.; Barabas, I. y Svab, Z.** 1976. Nitrate reductase and effectiveness in *Rhizobium*. En: Symposium on N₂-fixation. W.E. Newton y C.J. Nyman (Eds). Washington State University Press. Vol.2. pp. 374-382.
- Silsbury, J.H.; Catchpoole, D.W. y Wallace, W.** 1986. Effects of nitrate and ammonium on nitrogenase (C₂H₂ reduction) activity of swards of Subterranean clover, *Trifolium subterraneum*. *L. Aust. J. Plant Physiol.*, 13: 257-273.
- Smith, B.E.; Eady, R.R.; Thorneley, R.N.F.; Yates, M.G. y Postgate, J.R.** 1977. Recent Developments in Nitrogen Fixation. W. Newton, J.R. Postgate y C. Rodríguez-Barrueco (Eds.). Academic Press. London, New York. pp. 119.
- Solomonson, L.P.; Barber, M.J.; Robbins, A.P. y Oaks A.** 1986. *J. Biol. Chem.*, 261: 11290-11294.
- Solomonson, L.P. y Barber, M.J.** 1990. Assimilatory nitrate reductase: Functional properties and regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 41: 225-253.

- Sprent, J.I.; Giannakis, C. y Wallace, W.** 1987. Transport of nitrate and calcium into legume root nodules. *Journal of Experimental Botany*, 38(192): 1121-1128.
- Stephens, B.D. y Neyra, C.A.** 1983. Nitrate and nitrite reduction in relation to nitrogenase activity in soybean nodules and *Rhizobium japonicum* bacteroids. *Plant Physiol.*, 71: 731-735.
- Steward, V. y Parales, J.** 1988. Identification and expression of the narI and marX of the nar (nitrate reductase) locus in *Escherichia coli* k-12. *J. Bacteriol.*, 170: 1589-1597.
- Steward, V.** 1988. Nitrate respiration in relation to facultative metabolism in Enterobacteria. *Microbiol. Rev.*, 52: 190-232.
- Stone, S.R.; Copeland, L. y Kennedy, I.R.** 1979. Glutamate dehydrogenase of Lupin nodules: purification and properties. *Phytochemistry*, 18: 1273-1278.
- Streeter, J.G. y Jeffers, D.L.** 1979. Distribution of total non-structural carbohydrates in soybean plants having increased reproduction load. *Crops Science*, 19: 729-734.
- Streeter, J.G.** 1982. Synthesis and accumulation of nitrite in soybean nodules supplied with nitrate. *Plant Physiol.*, 69: 1429-1434.

- Streeter, J.G. y DeVine, P.J.** 1983. Evaluation of nitrate reductase activity in *Rhizobium japonicum*. *Appl. Environm. Microbiol.*, 46: 521-524.
- Streeter, J.G.** 1985. Nitrate inhibition of legume nodule growth and activity: II. Short term studies with high nitrate supply. *Plant Physiol.*, 77: 321-328.
- Streeter, J.G.** 1986. Effect of nitrate on acetylene reduction activity and carbohydrate composition of *Phaseolus vulgaris* nodules. *Physiol. Plantarum*, 68: 294-300.
- Streeter, J.G.** 1988. Inhibition of legume nodule formation and N₂ fixation by nitrate. *CRC Critical Reviews in Plant Science*, 7(1): 1-23.
- Streit, L.; Nelson, R.S. y Harper, J.E.** 1985. Nitrate reductases from wild-type and nr₁-mutant soybean (*Glycine max* [L] Merr.) leaves. I. Purification, kinetics and physical proprieties. *Plant Physiol.*, 78: 80-84.
- Streit, L.; Martin, B.A. y Harper, J.E.** 1987. A method for the separation and partial purification of the three forms of nitrate reductase present in wild-type soybean leaves. *Plant Physiol.*, 84: 654-657.

- Taniguchi, S. y Itagaki, E.** 1960. Nitrate reductase of nitrate respiration type from *E.coli*. I. Solubilization and purification from the particulate system with molecular characterization as a metalloprotein. *Biochim. Biophys. Acta*, 44: 263-279.
- Taylor, D.C.; Shelp, B.J.; Nelson, L.M. y Grodzinski, B.** 1988. Carbon and nitrogen partitioning in young nodulated pea (wild type and nitrate-reductase-deficient mutant) plants exposed to NH_4NO_3 . *Physiol. Plantarum*, 74: 593-601.
- Trinchant, J.C. y Rigaud, J.** 1980. Nitrite inhibition of nitrogenase from soybean bacteroids. *Arch. Microbiol.*, 124: 49-54.
- Trinick, M.J.** 1980. Growth of *Parasponia* in agar tube culture and symbiotic effectiveness of isolates from *Parasponia* spp. *New Phytol.*, 85: 37.
- Turner, G.L. y Gibson, A.H.** 1980. Measurements of nitrogen fixation by indirect means. En: *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*. F.J. Bergensen (Ed.). John Wiley and sons. pp. 111-138.
- Vance, C.P. y Heichel, C.H.** 1981. Nitrate assimilation during vegetative regrowth of alfalfa. *Plant Physiol.*, 68: 1052-1056.

- Vance, C.P. y Stade, S.** 1984. Alfalfa root nodule carbon dioxide fixation II. Partial purification and characterization of root nodule phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.*, 75: 261-264.
- Vance, C.P.** 1990. Symbiotic nitrogen fixation: recent genetic advances. En: *The Biochemistry of Plants: a comprehensive treatise*. B.J. Minflin y Peter J. Lea (Eds). Academic Press. Harcourt Brace. Javanovich Publishers. Vol. 16. pp. 89-119.
- Vessey, J.K.; Walsh, K.B. y Layzell, D.B.** 1988. Oxygen limitation of N₂ fixation in stem-girdled and nitrate-treated soybean. *Physiol. Plantarum*, 73: 113-121.
- Vézima, L.P.; Joy, K.W. y Hope, H.J.** 1988. The effects of nitrate on the enzymes involved in nitrogen assimilation in nodulated pea roots. *Physiol. Plantarum*, 72: 762-768.
- Vigue, J.T.; Harper, J.E.; Hageman, R.H. y Peters, D.B.** 1977. Nodulation of soybeans grown hydroponically on urea. *Crop Sci.*, 17: 169-172.
- Vincent, J.M.** 1962. Australian studies of the root nodule bacteria. *Proc. Linn. Soc. N.S.W.*, 79: 8-38.
- Vincent, J.M.** 1970. A manual for the practical study of root-nodules bacteria. IBP Handbook No. 15. Blackwell Scientific Publication. Oxford, Gran Bretaña.

Yakunin, A.F.; Tsygankov, A.A.; Gogotov, I.N. y Jha, M. 1990. Effect of Mo, V and W on the growth and nitrogenase synthesis in phototrophic bacteria. En Nitrogen Fixation. Proceedings of the 5th Intenational symposium on Nitrogen Fixation with non legumes. M. Polsinelli, R. Materassi and M. Vincenzim (Eds.). Kluner Academic Publishers, pp. 583-584.

Zablotowicz, R.M.; Eskew, D.L. y Focht, D.D. 1978. Denitrification in *Rhizobium*. Can. J. Microbiol., 24: 757-760.

Zablotowicz, R.M. y Focht, D.D. 1979. Denitrification and anaerobic, nitrate dependent acetylene reduction in cowpea *Rhizobium*. J. Gen Microbiol., 11: 445-448.

Zlotnikov, K. y Kadirova, M. 1990. Mutants of rhizobia with altered responses of symbiotic N₂-fixation to combined nitrogen. En: Nitrogen Fixation: Achievements and Objetives. P.M. Gresshoff, L.E. Roff, G. Stacey and W.E. Newton (Eds.). Chapman and Hall Publ. New York, pp. 609.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal Integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D.^a MARIA CAMACHO MARTINEZ VARGA DE REY titulada ESTUDIOS SOBRE LAS ACTIVIDADES REDUCTORAS DE NITRATOS EN BRADYRHIZOBIUM SPP. Y RELACIONES CON LA FIJACION SIMBIOTICA DE N₂. CARACTERIZACION BIOQUIMICA Y EFECTOS DEL NITROGENO COMBINADO. acordó otorgarle la calificación de APTO. CON LAUDE

Sevilla, 11 de NOVIEMBRE 1994

El Vocal,

Cert. P. M. Z.

El Presidente

M. H. G.

El Vocal,

M. L. M.

El Secretario,

R. R.

El Vocal,

Dulce N. Rodriguez

El Doctorado,

M. Camacho



500545766

FBI E TD-269

545766