

DIFERENTES METODOS PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA EN TEJIDOS DE *Lotus* sp.

O. Borsani¹, H. Urrestarazú¹ y P. Díaz¹⁻²

Aceptado: 28 de enero de 1997

RESUMEN

La actividad nitrato reductasa (ANR) en tallos y hojas de *Lotus corniculatus* y *Lotus tenuis* fue ensayada por diferentes métodos. Se encontró una alta correlación entre los métodos *in vivo* con nitrato y sin nitrato en el medio de incubación y entre el método *in situ* con el método *in vivo* sin nitrato. Los mayores valores absolutos de ANR en cualquiera de los órganos analizados, se encontraron siempre cuando se determinó la ANR por el método *in vivo* con nitrato en el medio de incubación. Se discuten las ventajas y desventajas de la utilización de los diferentes métodos para determinar la ANR en *Lotus* sp.

PALABRAS CLAVES: *Lotus* sp., nitrato reductasa, ensayo *in situ*, ensayo *in vitro*, ensayo *in vivo*.

SUMMARY

DIFFERENTS METHODS TO THE DETERMINATION OF NITRATE REDUCTASE ACTIVITY IN *Lotus* sp. TISSUES

Nitrate reductase activity (NRA) from stem and leaves of *Lotus corniculatus* and *Lotus tenuis* was assayed *in vivo*, *in situ* and *in vitro*. There was a strong correlation comparing assays *in vivo* with and without added nitrate and between *in situ* and *in vivo* without added nitrate. The highest absolute values of NRA in all tissues assayed where obtained using the *in vivo* with added nitrate methodology. The advantages and disadvantages of the different methods in the estimation of NRA for birdsfoot trefoil are discussed.

KEY WORDS: *Lotus* sp., nitrate reductase, *in situ* assay, *in vitro* assay, *in vivo* assay.

INTRODUCCION

Las leguminosas pueden utilizar el amonio derivado de la fijación simbiótica, así como el nitrato presente en el suelo después de la reducción por las enzimas nitrato reductasa (NR) y nitrito reductasa (NiR). Este proceso reductivo demanda ocho electrones, dos para la reducción de nitrato a nitrito y seis para la reducción de nitrito a amonio. La NR citoplasmática es considerada una enzima biespecífica dado que el poder reductor es suministrado por el NADH.⁺ reducido en la vía glicolítica y por el NADPH.⁺ generado en la vía de las pentosas fosfato. Asimismo, por medio de una lanzadera del malato, la malato deshidrogenasa puede suministrar poder reductor a esta reacción. El nitrito producto de esta reacción es reducido por la enzima NiR de localización cloroplástica, la cual utiliza el poder reductor del NADPH.⁺ o de la ferredoxina (Fd) reducidos en el Fotosistema I (Beevers y Hageman, 1980; Kleinhofs y Warner, 1990).

La NR es una enzima inducible por sustrato (Campbell, 1988) aunque se ha encontrado en algunas leguminosas de las tribus *Phaseolae* y *Loteae* una NR constitutiva (Monza *et al.*, 1989; Andrews *et al.*, 1990) cuyo rol aún no ha sido establecido.

La ANR se determina midiendo el nitrito producido de manera que en las determinaciones de ANR en tejidos enteros, es necesario inhibir la NiR, siguiente enzima de la vía de reducción de nitrato. Esta inhibición se logra incubando las muestras en oscuridad para impedir la reducción de la ferredoxina, y por tanto el suministro de poder reductor a la NiR.

La ANR se puede determinar por ensayos *in vivo*, *in situ* e *in vitro*. Estos métodos sirven para evidenciar diferentes aspectos de la reducción del nitrato (Andrews *et al.*, 1984).

El método *in vivo* también denominado "ensayo de tejido intacto" (Campbell y Smarrelli, 1986) es el más usado por la practicidad que presenta para evaluar la capacidad de diferentes tejidos de reducir nitrato. Para esta determinación el material es troceado y sometido a la acción de surfactantes, solventes, o ambos. El uso de vacío en este método ha sido minuciosamente discutido por Jaworski (1971).

El método *in situ* estima la capacidad de reducción de nitrato en tejido imperturbado-entero y se obtienen buenas correlaciones entre la ANR y el contenido de nitrato en los tejidos (Andrews *et al.*, 1984). Una diferencia con

¹ Laboratorio de Bioquímica. Facultad de Agronomía.

² Unidad Asociada Fijación Biológica de Nitrógeno. Facultad de Ciencias.

Correspondencia: Pedro Díaz, Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Agronomía, Av. Garzón 780 CP 12900 Montevideo - Uruguay. Fax. 0598 2 3093004. E-mail: pdiaz@bioq.edu.uy

el método anterior, es la utilización de nitrógeno gaseoso en lugar de efectuar vacío durante la incubación del tejido. Esta técnica es equivalente a la metodología "de planta entera" propuesta por Campbell y Smarrelli (1986).

En el método *in vitro* se realiza la extracción parcial de la enzima y es indicado para estimar la ANR potencial del tejido, debido a que en las condiciones de ensayo no son limitantes la concentración de sustrato ni el poder reductor (Andrews *et al.*, 1984).

En este trabajo se comparan las ANRs obtenidas por diferentes métodos en tallos y hojas de *Lotus corniculatus* y *Lotus tenuis*.

MATERIALES Y METODOS

Material biológico y condiciones de crecimiento

Semillas de *L. corniculatus* cv. La Estanzuela San Gabriel y *L. tenuis* cv. Chajá (Agrosan S.A.) se esterilizaron superficialmente según Vincent (1970). Las semillas pregerminadas en placas de Petri se sembraron en dispositivos Leonard provistos de la solución nutritiva descrita por Rigaud y Puppo (1975) con una concentración final de 1mM de KNO_3 . La solución nutritiva Leonard se cambió semanalmente para mantener la concentración de los nutrientes constante.

Se realizó asimismo un ensayo sin KNO_3 a los efectos de detectar la ANR constitutiva. Cada planta se inoculó con 1 mL de suspensión de cultivo de las cepa T1 de *Rhizobium loti* (Monza *et al.*, 1992) crecida en M79 (Vincent, 1970) hasta una densidad óptica de 10^9 células/mL.

Las plantas crecieron en condiciones controladas durante 45 días, bajo un ciclo de luz/oscuridad 16/8 h y temperatura día/noche 24/18 °C y una iluminación de 500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$. s.

La cosecha de hojas y tallos se realizó a las 4 horas de iniciada la iluminación, dado que la máxima actividad de la enzima en diferentes plantas ha sido encontrada en ese tiempo (Harper y Hageman, 1972; Warner y Kleinhofs, 1992).

Determinación ANR

Método *in vivo*

Se siguió la técnica descrita por Heuer y Plaut (1978) con modificaciones (Díaz *et al.*, 1995). Muestras de 0.1 g se colocaron en tubos con 5 mL de medio de incubación que contenían 50 mM de solución tampón fosfato potásico pH 7.5; KNO_3 , 100 mM; propanol 0.15 M y Triton X100, 0.01 % (v/v). Cada ensayo incluyó un tratamiento sin nitrato en el medio de incubación.

Los tejidos se infiltraron por vacío de 80 kPa dos veces, durante 2 min cada vez. El vacío se aplicó a 12 muestras simultáneamente dentro de un dispositivo compuesto por un frasco de vidrio con cierre hermético conectado a una bomba de vacío (Fig. 1. A). Después de realizado el vacío las muestras se incubaron en oscuridad a 28°C durante 1 hora. Los tubos se pusieron 10 min en un baño en ebullición y después que las muestras alcanzaron la temperatura ambiente se tomaron alícuotas para determinar el nitrito liberado al medio.

Método *in situ*

Se utilizó la técnica sugerida por Obatón (com. pers.). Muestras de 0.1 g de material vegetal sin trocear se introdujeron en frascos de 50 mL que contenían 5 mL de solución tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7.5 y Triton X100, 0.1 % (v/v). Los frascos se precintaron y para lograr anaerobiosis el aire se desplazó mediante flujo de gas nitrógeno. Este procedimiento se realizó con una conexión desde un tanque de nitrógeno a un distribuidor de 6 salidas. Según se

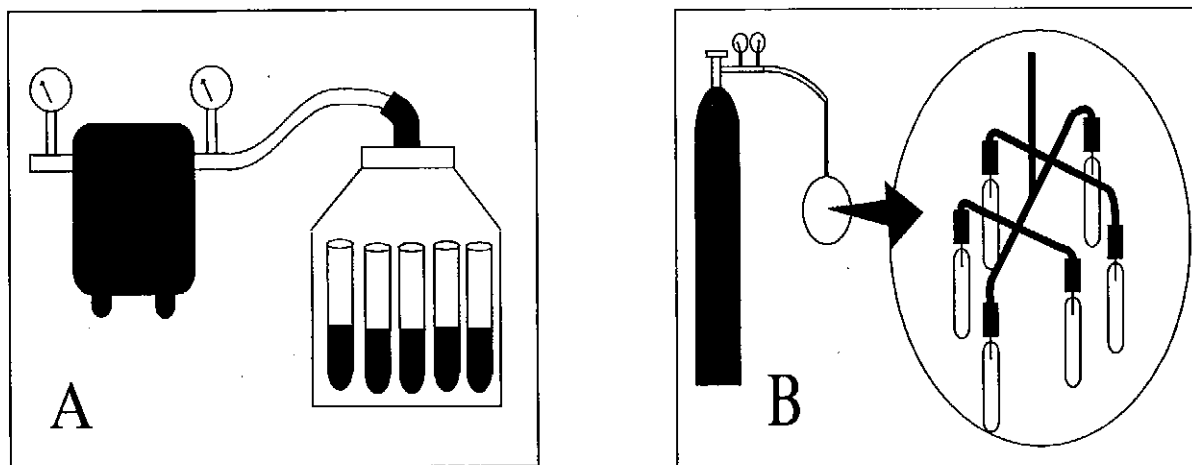


Figura. 1. A, dispositivo para la determinación de ANR *in vivo*. B, dispositivo para la determinación de ANR *in situ* (para la descripción referirse a materiales y métodos).

muestra en la Fig. 1 B la aguja de cada salida se introdujo en el tapón perforable de cada frasco, de manera que todos los frascos recibieran la misma presión de nitrógeno (125 kPa durante 1 min). Otra aguja permitió la salida del gas.

Luego de realizada la anaerobiosis los frascos se introdujeron en bolsas de polietileno negro y se mantuvieron a temperatura ambiente. Después de 1 h se agregó con jeringa a cada frasco, 5 mL de agua destilada hirviendo, e inmediatamente los mismos se llevaron a ebullición durante 10 min para analizar después el contenido de nitrito.

Método *in vitro*

Se siguió la técnica sugerida por Obatón (com. pers.) que consistió en pesar 0.2 g de hojas y tallos y dejarlas a -20°C hasta el momento de la extracción. Las muestras se maceraron a 4°C en mortero con 50 mg de caseína, 100 mg polivinilpirrolidona (PVPP) en 4 mL de la solución de extracción consistente en solución tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.4, EDTA 1 mM, clorhidrato de cisteína 7.5 mM. Posteriormente se filtraron los extractos y se conservaron a -20°C hasta el momento de la determinación.

La cisteína se adicionó como protector de los grupos sulfhidrilos, la caseína, para evitar la acción de las proteasas y el PVPP, para complejar compuestos fenólicos que pueden oxidar la enzima (Gegenheimer, 1990).

La reacción se comenzó con el agregado del extracto al medio de incubación, solución tampón fosfato potásico pH 7.4, 50 mM KNO₃ 100 mM y NADH⁺ 0.3 mM en una relación 1:5 (v/v). La reacción se detuvo después de 30

min de incubación a 28°C con la adición de acetato de zinc hasta una concentración final de 0.1 M. El precipitado se centrifugó durante 5 min a 12000 g y en el sobrenadante se determinó el nitrito.

Determinación de nitrito

El nitrito se evidenció por la reacción de diazotación (Nicholas y Nason, 1969). A 1 mL de muestra en los métodos *in vivo* e *in situ* y a 0.5 mL en el método *in vitro*, se le agregaron 4 mL de una mezcla de sulfanilamida 30 mM en HCl 2 M y N-naftiletildiamina.2 HCl 0.4 mM. Después de 20 minutos se leyó la absorbancia a 540 nm. La curva estándar se realizó con NaNO₂.

Diseño experimental y análisis de los datos

Los datos corresponden a medias de tres repeticiones de dos experimentos diferentes. Los resultados obtenidos de los diferentes métodos se compararon mediante una regresión lineal.

RESULTADOS Y DISCUSION

La ANR en órganos de *L. corniculatus* y *L. tenuis* no presentó diferencias significativas con los distintos métodos ensayados y siempre la actividad fue superior en tallo que en hoja (Tabla 1).

Las determinaciones de ANR por el método *in vivo* con y sin nitrato en el medio de incubación presentaron una

Tabla 1. ANR en diferentes órganos de dos especies de lotus medida por distintos métodos.

condiciones de crecimiento y órgano	ANR			
	<i>in vivo</i> con NO ₃ ^{-b}	<i>in vivo</i> sin NO ₃ ⁻	<i>in situ</i> sin NO ₃ ⁻	<i>in vitro</i> con NO ₃ ⁻
<i>L. corniculatus</i>				
sin nitrato				
tallo	324 ^c ± 48	230 ± 41	222 ± 29	394 ± 189
hoja	161 ± 24	159 ± 41	141 ± 18	212 ± 81
con nitrato				
tallo	521 ± 78	364 ± 65	330 ± 64	404 ± 167
hoja	289 ± 45	180 ± 50	177 ± 71	426 ± 143
<i>L. tenuis</i>				
sin nitrato				
tallo	302 ± 30	169 ± 21	163 ± 25	335 ± 201
hoja	163 ± 28	147 ± 38	149 ± 36	287 ± 178
con nitrato				
tallo	441 ± 78	243 ± 45	235 ± 40	313 ± 182
hoja	251 ± 11	138 ± 21	141 ± 34	460 ± 349

^bCon o sin el agregado de KNO₃ a la mezcla de incubación

^cLos valores son media de tres repeticiones seguidos de su desvío estándar.

correlación de $+0.86$ ($p < 0.01$) independientemente de la presencia de nitrato en el medio de crecimiento y del órgano con que se trabajó. La ANR con nitrato en el medio de incubación fue siempre superior a la ANR sin nitrato en el medio de incubación (Tabla 1). Datos semejantes fueron encontrados por Nicholas *et al.* (1976) en hojas de soja. Estos autores atribuyen esta diferencia a la presencia de sustrato en el medio de incubación, lo que indicaría que el nitrato en los tejidos estudiados en el momento de la determinación resulta limitante.

Se encontró una correlación de $+0.89$ ($p < 0.01$) entre los métodos *in vivo* sin nitrato e *in situ* (Fig. 2). En ambos casos al no haber nitrato en el medio de incubación la NR tiene como única fuente de nitrato el presente en los tejidos vegetales. Este hecho agrega evidencias a lo encontrado por otros autores, que consideran a la medida de ANR por el método *in vivo* sin nitrato en el medio de incubación, como el que estima la ANR en condiciones de planta entera y por lo tanto los valores obtenidos por el método *in situ* (Andrews *et al.*, 1984).

Cuando se analizó por separado la ANR de tallos y hojas la correlación entre los métodos *in vivo* e *in situ* fue mayor en tallo que en hojas (datos no mostrados). Dado que la ANR se encuentra muy relacionada con el contenido de agua del material (Shaner y Boyer, 1976; Aparicio-Tejo y Sánchez-Díaz, 1982), estas diferencias podrían deberse a la menor deshidratación del tallo. De esta forma, la capacidad de deshidratación de hojas durante el procesamiento del material afectaría a la NR e introduciría variaciones en la estimación de la actividad al expresarse por gramo de peso fresco.

El ensayo *in vivo* más nitrato es considerado el mejor indicador de la reducción de nitrato en tejidos, dado que el nitrato no es limitante y se relacionaría con la ANR medida *in vitro* (Andrews *et al.*, 1984). Nicholas *et al.* (1976) encontraron en plantas soja una correlación entre la ANR *in vivo* más nitrato y la ANR *in vitro*. Sin embargo, en lotus no se encontró correlación entre estos métodos, lo que coincide con los resultados obtenidos en soja por Streeter y Bosler (1972).

Los valores de ANR *in vitro* obtenidos presentaron una alta variación (Tabla 1) y expresados por gramo de peso fresco de tejido no superaron los valores de ANR obtenidos por el método *in vivo* más nitrato. Esto no concuerda con los resultados obtenidos por Nicholas *et al.* (1976) en soja, donde la ANR *in vitro* superaba la ANR *in vivo* más nitrato. Estas diferencias podrían deberse a dificultades en la extracción de la enzima, problema que también fue considerado por Streeter y Bosler (1972).

Entre el método *in vivo* con y sin nitrato en el medio de incubación la elección de una alternativa u otra va a estar en función del objetivo que se persigue, es decir si se desea obtener la ANR potencial o la ANR real.

A partir de los resultados de este trabajo el método *in situ* se presentaría como muy ventajoso para ensayos en

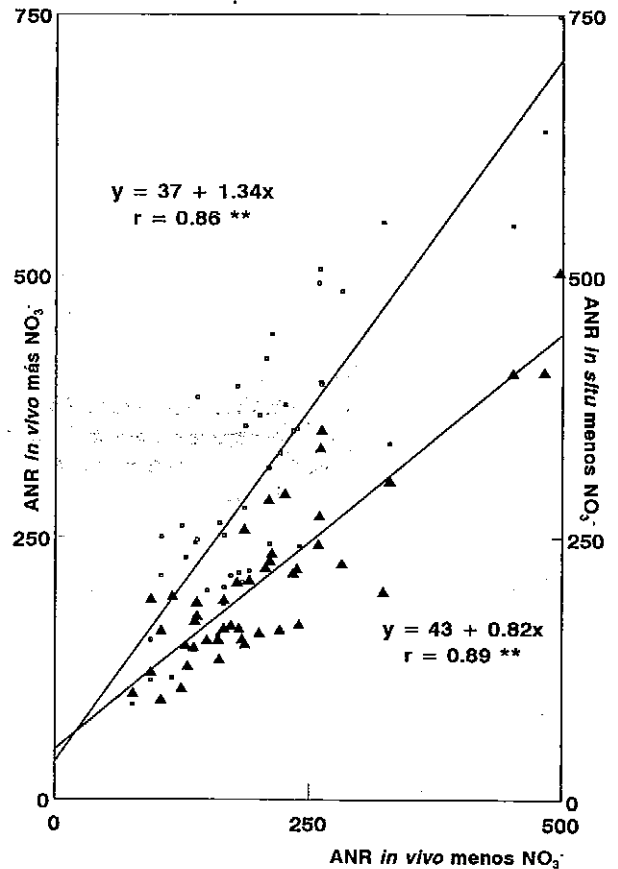


Figura 2. Correlación entre los diferentes métodos de determinación de ANR expresada en $\text{nmol de NO}_2^-/\text{g PF} \cdot \text{h}^{-1}$ ▲ métodos *in vivo* menos NO_3^- e *in situ* ■ métodos *in vivo* menos NO_3^- e *in vivo* más NO_3^- .

campo al obtener resultados semejantes a los que se encontraron por el método *in vivo* sin nitrato. Sin embargo, el método *in situ* presenta el inconveniente que sólo permite manejar un número reducido de muestras por la configuración del equipo.

Para materiales vegetales diferentes al utilizado en este trabajo, se deberían optimizar las condiciones de los ensayos tales como concentraciones de sustrato, pH del medio de incubación, tampón y uso de surfactantes.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICYT) por el financiamiento de la beca de iniciación a la investigación otorgada a O. Borsani en la Cátedra de Bioquímica de Facultad de Agronomía. Este trabajo fue financiado por Swedish Agency for Research Cooperation with Developing Countries (SAREC).

BIBLIOGRAFIA

- ANDREWS, M.; DE FARIA, S.; Mac INORY, S.; and SPRENT, J. 1990. Constitutive nitrate reductase activity in the leguminosae. *Pytochemistry* 29:49-54.
- ANDREWS, M.; SUTHERLAND, J.; THOMAS, R. and SPRENT, J. 1984. Distribution of nitrate reductase activity in six legumes: The importance of the stem. *New Phytol.* 98:301-310.
- APARICIO-TEJO, P. and SANCHEZ-DIAZ, M. 1982. Nodule and leaf nitrate reductases and nitrogen fixation in *Medicago sativa* L under water stress. *Plant Physiol.* 69:479-482.
- BEEVERS, L. and HAGEMAN, R. 1980. Nitrate and nitrite reduction. In: *The Biochemistry of Plants*. B. Mifflin (Eds.) Vol. 5. pp. 115-168.
- CAMPBELL, W. 1988. Nitrate reductase and its role in nitrate assimilation in plants. *Physiol. Plant* 74:214-219.
- CAMPBELL, W. and SMARELLI, J. 1986. Nitrate reductase: Biochemistry and regulation. In: *Biochemical basis of plant breeding*. C. Neyra (Eds) V. 2 pp. 1-39.
- DIAZ, P.; BORSANI, O. and MONZA, J. 1995. Effect of inoculation and nitrate on nitrate reductase activity and acetylene reduction activity in *Lotus* sp. - *Rhizobium loti* symbiosis. *Symbiosis* 19:53-63.
- GEGENHEIMER, P. 1990. Preparation of extracts from plants. In: *Methods in Enzymology*. M. Deutscher (Eds.) Academic Press. 182. pp. 174-193.
- HARPER, J. and HAGEMAN, R. 1972. Canopy and seasonal profiles of nitrate reductase in soybeans (*Glycine max* L. Merr.). *Plant Physiol.* 49:146-154.
- HEUER, B. and PLAUT, Z. 1978. Reassessment of the *in vivo* assays for nitrate reductase in leaves. *Physiol. Plant* 43: 306-312.
- JAWORSKY, E. 1971. Nitrate reductase assay in intact plants tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43:1274-1279.
- KLEINHOF, A and WARNER, R. 1990. Advances in nitrate assimilation. In: *The Biochemistry of Plants*. B. Mifflin and P. Lea (Eds.) 16. pp. 89-120.
- MONZA, J.; DELGADO, M. and BEDMAR, E. 1989. Actividad nitrato reductasa en hoja, tallo, raíz y nódulo de *Lotus corniculatus* en simbiosis con *Rhizobium loti*. *Turrialba* 39: 170-175.
- MONZA, J.; FABIANO, E. and ARIAS, A. 1992. Caracterización de un indigeno population of rhizobia nodulating *Lotus corniculatus*. *Soil Biol. Biochem.* 24:241-247.
- NICHOLAS, J.; HARPER, J. and HAGEMAN, R. 1976. Nitrate reductase activity in soybeans (*Glycine max* L. Merr.). *Plant Physiol.* 58:736-739.
- NICHOLAS, D. and NASSON, A. 1969. Nitrite determination by diazotation and coupling reactions. In: *Methods in Enzymology*. S. Colowick, and N. Kaplan (Eds). 3 pp 983-984.
- RIGAUD, J. and PUPPO, A. 1975. Indole-3-acetic catabolism by soybean bacteroids. *Gen. J. Microbiol.* 88:223-228.
- STREETER, J. and BOSLER, M. 1972. Comparison of *in vitro* and *in vivo* assays for nitrate reductase in soybean leaves. *Plant Physiol.* 49:448-450.
- SHANER, D. and BOYER, J. 1976. Nitrate reductase activity in maize (*Zea mays* L). leaves. Regulation by nitrate flux at low leaf water potential. *Plant Physiol.* 58:505-509.
- VINCENT, J. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBP Handbook N°15. Blackwell, Oxford.
- WARNER, R. and KLEINHOF, A. 1992. Genetics and molecular biology of nitrate metabolism in higher plants. *Physiol. Plant* 85:245-252.