

UNIVERSIDAD DE GRANADA

**Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos
Estación Experimental del Zaidín, CSIC-Granada**



TESIS DOCTORAL

**PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN
NÓDULOS DE SOJA. IMPLICACIÓN DE LA
DESNITRIFICACIÓN.**

**Cristina Sánchez Gómez
Granada, 2009**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Cristina Sánchez Gómez
D.L.: GR. 3525-2009
ISBN: 978-84-692-6404-1

UNIVERSIDAD DE GRANADA

**Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos
Estación Experimental del Zaidín, CSIC-Granada**

**PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN
NÓDULOS DE SOJA. IMPLICACIÓN DE LA
DESNITRIFICACIÓN.**

**Memoria de Tesis Doctoral presentada por la licenciada en Biología
Cristina Sánchez Gómez para aspirar al Grado de Doctor**

Fdo. Cristina Sánchez Gómez

VºBº Los Directores

Fdo. María J. Delgado Igeño

Doctora en Biología

Investigador Científico del CSIC

Fdo. Eulogio J. Bedmar Gómez

Doctor en Biología

Prof. de Investigación del CSIC

Granada, 2009

El trabajo que se presenta en esta memoria de Tesis Doctoral se ha realizado en el Grupo del Metabolismo del Nitrógeno del Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC).

Parte de los resultados de este trabajo se han presentado en los siguientes congresos y reuniones:

XIII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions. Sorrento, Italia, 21-27 de julio, 2007.

Cycling forwards: York N-cycle meeting. York, Inglaterra, 21-22 de septiembre, 2007.

IX Reunión Nacional del Metabolismo del Nitrógeno. Alicante, España, 23-25 de abril, 2008.

8th European Nitrogen Fixation Conference. Gante, Bélgica, 30 de agosto-3 de septiembre, 2008.

Nijmegen N-cycle meeting. Nijmegen, Holanda, 18-19 de septiembre, 2008.

MiP 2009. III Reunión del Grupo Especializado Microbiología de Plantas. Granada, España, 18-20 de febrero, 2009.

14th N-cycle meeting. Alicante, España, 16-18 de septiembre, 2009.

Parte de los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se han incluido en las siguientes publicaciones:

Eloy F. Robles, Cristina Sánchez, Nathalie Bonnard, María J. Delgado, y Eulogio J. Bedmar. 2006. The *Bradyrhizobium japonicum* *napEDABC* genes are controlled by the FixLJ-FixK₂-NnrR regulatory cascade. *Biochemical Society Transactions*. 34: 108-110.

Cristina Sánchez, Toshiki Uchiumi, Eulogio J. Bedmar, David J. Richardson, y María J. Delgado. Expresión de la nitrato reductasa de los bacteroides de nódulos de soja en respuesta a encharcamiento. *Enviado para su publicación.*

Cristina Sánchez, Manuel A. Matamoros, Eulogio J. Bedmar, María J. Delgado y Manuel Becana. Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en nódulos de leguminosas. *Enviado para su publicación.*

Emilio Bueno, Socorro Mesa, Cristina Sánchez, Eulogio J. Bedmar y María J. Delgado. NifA is required for maximal expression of denitrification genes in *Bradyrhizobium japonicum*. *Aceptado para su publicación en Environmental Microbiology.*

Cristina Sánchez, Andrew J. Gates, Georgina E. Meakin, Toshiki Uchiumi, Lourdes Girard, David J. Richardson, Eulogio J. Bedmar y María J. Delgado. Production of nitric oxide and nitrosylhaemoglobin complexes in soybean nodules in response to flooding. *Enviado para su publicación en Molecular Plant-Microbe Interactions.*

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de Tesis, María Jesús Delgado y Eulogio Bedmar. A María Jesús, por buscarme siempre un hueco y responder tan eficazmente en los momentos en los que más te he necesitado. A Eulogio, por estar siempre dispuesto para atender cualquier duda.

A mis compañeros de grupo: Alba, Belén, Chouhra, Chudi, David, Juan, Juan Sánchez Raya, Germán, Manolico, Rajaa y Silvia, por ayudarme en todo lo que habéis podido, sobre todo en los días de “desnodulación”, por hacerme reír, y porque sois los responsables de un ambiente excepcional tanto en las horas de trabajo como en los “saraos”. A los compañeros que han pasado por el laboratorio: Bea, Cinta, Marina Nacho, Nadia, y Emad, con los que he compartido muy buenos momentos. A Birgit y Nicolás, que aunque estuvisteis muy poco tiempo, me dejasteis marcada una profunda huella. A Eloy, mi gran apoyo y compañero de “frikadas” durante los dos primeros años de Tesis.

A David Richardson, Toshiki Uchiumi y Lourdes Girard, mis supervisores en las estancias que he realizado, por vuestra hospitalidad, profesionalidad y buenos consejos. De igual forma, a todos los integrantes de sus respectivos grupos, por vuestra ayuda y amabilidad.

A todos aquellos que hicisteis mis estancias en Norwich, Kagoshima y Cuernavaca inolvidables: Rosa, Miguel, Georgina, Paul, Andy, Heather, Grigor, Aiko, Fuyuko, Maki, Yuko, Yukiko, Hiro, Hiroki, Hisa, Ura, Alma, Nicolás (de nuevo), Norma, Oswaldo, Emanuel y “el vinagrillo”.

Al Grupo de Interacciones Planta-Bacteria de la EEZ, por ofrecerme vuestra ayuda siempre que lo he necesitado y vuestros consejos acertados durante los seminarios compartidos.

A mis compañeros de la EEZ, por vuestra ayuda y por esos momentillos de risas tanto en el pasillo como en los barriles. A Helena, mi “compi” de laboratorio (del ARN)

en los últimos meses, por tu apoyo, buen humor y sesiones musicales. A Virginia, por tus “fregonazos” y por alegrarnos las tardes.

A la Virgi, Mendes, Maese, Mariajo, Elena, Peter, Vero, Belén, Diana, Marina (otra vez), Fernando, Albert, Nandish, Pedro y mis compañeros del Kung Fu, por compartir esas cervecitas reparadoras y por darme todo vuestro ánimo y apoyo durante todo este tiempo.

A mi familia, en todo momento incondicional, porque siempre encuentro consuelo a vuestro lado y me ayudáis a no rendirme frente a las dificultades.

A María del Mar, porque estás siempre a mi lado, a las duras y a las maduras, por tu paciencia, comprensión, y por compartir tu vida conmigo. A su familia, por las excursiones “atrochamonte”, comidas ricas ricas y ayuda informática.

¡¡¡Gracias a todos!!!

ÍNDICE GENERAL

	Página
INTRODUCCIÓN	1
1. El óxido nítrico en plantas.....	3
1.1. Introducción a la molécula de óxido nítrico.....	3
1.2. Mecanismos de señalización del óxido nítrico.....	4
1.2.1. Nitrosilación de metales.....	4
1.2.2. S-nitrosilación.....	5
1.2.3. Nitración de tirosina.....	5
1.2.4. Señalización a través de calcio.....	6
1.3. Síntesis de óxido nítrico.....	7
1.3.1. Síntesis de óxido nítrico dependiente de arginina.....	8
1.3.2. Síntesis de óxido nítrico dependiente de nitrito.....	9
1.4. Funciones del óxido nítrico.....	11
1.4.1. Crecimiento y desarrollo.....	12
1.4.2. Estrés biótico.....	13
1.4.3. Estrés abiótico.....	14
1.4.4. Regulación de la expresión génica por óxido nítrico.....	16
1.5. Modulación de los niveles de óxido nítrico.....	17
1.5.1. Reactividad química.....	17
1.5.2. Óxido nítrico y glutatión.....	17
1.5.3. Óxido nítrico y hemoglobinas vegetales.....	18
2. La simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosa.....	20
2.1. La fijación biológica de dinitrógeno.....	20
2.2. El proceso de nodulación.....	23
2.3. La nitrogenasa.....	27
2.4. Genes implicados en la fijación de dinitrógeno.....	29
2.4.1. Genes <i>nif</i>	31
2.4.2. Genes <i>fix</i>	31
2.5. Regulación de la fijación de dinitrógeno.....	33
2.5.1. Sistema FixLJ-FixK ₂	34
2.5.2. Sistema RegSR-NifA.....	35
2.6. Regulación de la concentración de oxígeno en nódulos.....	37

	Página
2.6.1. La barrera de difusión de oxígeno.....	38
2.6.2. La leghemoglobina.....	40
2.6.3. La cadena respiratoria del bacteroide.....	42
3. La desnitrificación.....	44
3.1. Introducción a la desnitrificación.....	44
3.1.1. Nitrato reductasas.....	46
3.1.2. Nitrito reductasas.....	48
3.1.3. Óxido nítrico reductasas.....	48
3.1.4. Óxido nitroso reductasas.....	50
3.2. Desnitrificación en el orden <i>Rhizobiales</i>	50
3.3. Desnitrificación en <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	52
3.3.1. Nitrato reductasa periplásmica.....	53
3.3.2. Nitrito reductasa.....	54
3.3.3. Óxido nítrico reductasa.....	54
3.3.4. Óxido nitroso reductasa.....	55
3.3.5. Regulación de la desnitrificación.....	55
3.4. Desnitrificación en nódulos de soja.....	57
4. El óxido nítrico en la simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosa.....	60
4.1. Posibles fuentes de óxido nítrico en nódulos.....	60
4.2. Posibles funciones del óxido nítrico en nódulos.....	63
4.3. Posibles sistemas de destoxificación de óxido nítrico en nódulos.....	64
4.3.1. Papel de las hemoglobinas.....	64
4.3.2. Papel de los bacteroides.....	66
OBJETIVOS.....	69
CAPÍTULO 1.....	73
1. RESUMEN.....	77
2. ABSTRACT.....	78
3. INTRODUCTION.....	79
4. RESULTS.....	81

4.1. NO formation in soybean nodules induced by <i>napA</i> , <i>nirK</i> or <i>norC</i> <i>B. japonicum</i> mutants.....	81
4.2. Nitrogenase expression in soybean nodules induced by <i>napA</i> , <i>nirK</i> or <i>norC</i> <i>B. japonicum</i> mutants.....	85
4.3. <i>nifD</i> expression in <i>nirK</i> and <i>norC</i> <i>B. japonicum</i> mutants.....	87
5. DISCUSSION.....	89
6. MATERIALS AND METHODS.....	94
6.1. Bacterial strains and growth conditions.....	94
6.2. Plant growth conditions.....	94
6.3. Bacteroid isolation.....	95
6.4. Analytical methods.....	95
6.5. Detection of NO in nodules.....	97
6.6. Treatment of nodules with a NO scavenger.....	98
6.7. Whole nodule EPR spectroscopy.....	98
6.8. UV-visible spectroscopy.....	98
6.9. Transcript levels.....	99
7. ACKNOWLEDGMENTS.....	99
8. LITERATURE CITED.....	99
9. SUPPLEMENTAL MATERIAL.....	105
9.1. Supplemental table S1.....	105
CAPÍTULO 2.....	107
1. RESUMEN.....	111
2. ABSTRACT.....	112
3. INTRODUCTION.....	113
4. RESULTS.....	115
4.1. Plant growth.....	115
4.2. Nodulation.....	116
4.3. Leghaemoglobin content.....	118
4.4. Total N and N derived from biological N ₂ fixation.....	119
5. DISCUSSION.....	121

	Página
6. MATERIAL AND METHODS.....	124
6.1. Bacterial strains and growth conditions.....	124
6.2. Plant growth conditions.....	124
6.3. Leghaemoglobin content.....	125
6.4. Total N and N derived from biological N ₂ fixation.....	125
6.5. Statistical analysis.....	126
7. ACKNOWLEDGMENTS.....	126
8. LITERATURE CITED.....	126
CAPÍTULO 3.....	131
1. RESUMEN.....	135
2. ABSTRACT.....	136
3. INTRODUCTION.....	137
4. RESULTS.....	139
4.1. Involvement of NirB in nitrate-dependent aerobic and anaerobic growth.....	139
4.2. Nitrite and nitric oxide reduction under free-living conditions.....	141
4.3. NO formation in soybean nodules produced by <i>B. japonicum nirB</i> mutant.....	142
5. DISCUSSION.....	145
6. MATERIALS AND METHODS.....	148
6.1. Bacterial strains and growth conditions.....	148
6.2. Construction of a <i>nirB</i> mutant.....	148
6.3. Plant growth conditions.....	149
6.4. Bacteroid isolation.....	149
6.5. Analytical methods.....	150
6.6. Detection of NO in nodules.....	151
6.7. Treatment of nodules with a NO scavenger.....	151
6.8. Whole nodule EPR spectroscopy.....	151
6.9. UV-visible spectroscopy.....	152
6.10. Detection of transcripts.....	152
7. ACKNOWLEDGMENTS.....	153

	Página
8. LITERATURE CITED.....	153
9. SUPPLEMENTAL MATERIAL.....	159
9.1. Supplemental table S1.....	159
9.2. Supplemental table S2.....	159
DISCUSIÓN GENERAL.....	161
Capítulo 1.....	163
Capítulo 2.....	168
Capítulo 3.....	172
CONCLUSIONES.....	177
BIBLIOGRAFÍA GENERAL.....	181
APÉNDICE.....	211
Abreviaturas y símbolos.....	213
Índice de figuras.....	217
Índice de tablas.....	219

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. El óxido nítrico en plantas.

1.1. Introducción a la molécula de óxido nítrico.

El óxido nítrico (monóxido de nitrógeno, NO) es una molécula gaseosa que hasta hace relativamente pocos años se consideraba solamente un gas tóxico. Sin embargo, la identificación del NO como el factor de relajación endotelial (EDRF, endothelium-derived relaxing factor) (Ignarro *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1987) y el descubrimiento de la producción de NO por las óxido nítrico sintasas (NOSs) (Ignarro, 1990; Moncada *et al.*, 1991 Palmer *et al.*, 1987) abrieron una nueva línea de investigación que fue muy explotada durante la década de los 90. Durante esos años se demostró que esta molécula regula múltiples funciones fisiológicas y patofisiológicas en distintos sistemas y órganos de los mamíferos. En el año 1992 la revista *Science* reconoció la importancia biológica del NO eligiéndola “Molécula del Año”, y en el año 1998 se concedió el Premio Nobel de Fisiología y Medicina a los investigadores Ignarro, Murad y Fuchgott por sus trabajos sobre el NO y su función como molécula señal en células de mamíferos.

En el año 1979, Keppler demostró que las plantas de soja tratadas con herbicidas producían NO. Hoy en día está bien establecido que las células vegetales son capaces de generar NO, y en los últimos años se ha demostrado la gran importancia del NO como molécula señalizadora en gran variedad de procesos en plantas.

El NO contiene un electrón desapareado en un orbital $2p-\pi$ antienlazante, por esta característica es una molécula paramagnética y un radical libre (Stamler *et al.*, 1992). El NO puede existir como tres especies distintas e interconvertibles (Figura 1.1), ya que puede adoptar una estructura energéticamente más favorable perdiendo o ganando un electrón. Estas tres especies son el propio radical (NO^\bullet), el catión nitrosonio (NO^+) y el anión nitroxilo (NO^-), que difieren en sus propiedades físicas y en su reactividad química (Lamattina *et al.*, 2003). El término NO se utiliza para referirse, en general, a las tres especies.

El NO es ligeramente soluble en agua y algo más soluble en solventes orgánicos, por lo que es capaz de moverse por difusión por las partes hidrófilas de la célula, como el citoplasma, pero también puede moverse libremente a través de la fase lipídica y difundir hasta células vecinas o permanecer en la misma célula donde se ha producido. Al ser un radical libre reactivo, posee un vida media relativamente corta (del orden de

unos segundos) de manera que el efecto que puede ejercer el NO se limita a la célula en la que se produce, o a las células vecinas más próximas.

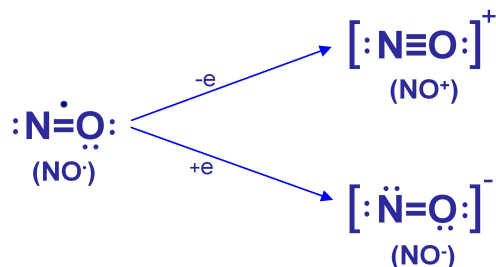


Figura 1.1. Especies de NO (adaptado de Lamattina *et al.*, 2003).

1.2. Mecanismos de señalización del óxido nítrico.

Los estudios sobre la reactividad química del NO han permitido comprender que los mecanismos de señalización en los que participa, tienen lugar gracias a su interacción con moléculas diana a través de una gran diversidad de reacciones bioquímicas de adición y de óxido-reducción (Bogdan, 2001). Es importante tener en cuenta que el NO puede encontrarse en distintos estados redox, y que cada uno de éstos podrá actuar sobre distintas dianas celulares. Las proteínas son las dianas a través de las cuales el NO ejerce su función biológica, bien a través de la nitrosilación de los metales que contienen, la *S*-nitrosilación y la nitración de la tirosina (Besson-Bard *et al.*, 2008). Entre estas proteínas se encuentran canales iónicos, enzimas, receptores y factores de transcripción (Lamattina *et al.*, 2003).

1.2.1. Nitrosilación de metales.

El NO puede formar complejos con proteínas que contienen metales mediante la nitrosilación. Las aconitasas, la catalasa, la ascorbato peroxidasa tanto citosólicas como mitocondriales, la lipooxigenasa y la citocromo *c* oxidasa son posibles dianas del NO a través de la nitrosilación, lo que conduce a la pérdida de su actividad (revisado por Besson-Bard *et al.*, 2008). En animales, el NO puede iniciar su efecto biológico a través de su interacción con el grupo hemo de la guanilato ciclase soluble (sGC), lo que provoca un cambio conformacional que conduce a su activación. El resultado es el aumento de los niveles de segundo mensajero cGMP (guanosina-monofosfato cíclico). En plantas también se ha demostrado la capacidad del NO para inducir la síntesis de cGMP tanto en tejidos como en suspensiones celulares (revisado por Neill *et al.*, 2008; Delledonne, 2005, Lamotte *et al.*, 2005 y Lamattina *et al.*, 2003), pero todavía no se ha

identificado una sGC vegetal que responda a NO. El NO también nitrosila a las hemoglobinas vegetales, tanto simbióticas como no simbióticas, y se hablará de ellas en profundidad en los apartados 1.5.3 y 4.3.1.

1.2.2. S-nitrosilación.

La S-nitrosilación es una modificación específica de cisteína, reversible, que puede modular la función de una proteína. Los grupos tiol de la cisteína se pueden nitrosilar por la acción del nitrosotiol de bajo peso molecular S-nitrosoglutatión (GSNO) o por la transferencia de NO desde otra proteína S-nitrosilada. La S-nitrosilación es una reacción específica que depende de la compartimentación subcelular de las fuentes de NO y de las proteínas diana, y de la presencia de motivos consenso flanqueando los residuos de cisteína (Hess *et al.*, 2005). La unión S-NO es lábil en un ambiente reductor por lo que las proteínas S-nitrosiladas pueden ser fácilmente desnitrosiladas. Se ha sugerido que la S-nitrosilación comparte muchas características con la fosforilación, que es el prototipo de modificación post-traduccional involucrada en la transducción de señales (Delledonne, 2005). Mediante un estudio proteómico realizado por Lindermayr y colaboradores (2005), a partir de cultivos celulares de *Arabidopsis* tratados con GSNO, se han identificados diversas proteínas que pueden ser dianas potenciales para la S-nitrosilación. Entre ellas se encuentran proteínas relacionadas con estrés, reacciones redox, citoesqueleto, regulación, señalización y metabolismo (Lindermayr *et al.*, 2005, revisado por Besson-Bard *et al.*, 2008; Delledonne, 2005; Neill *et al.*, 2008).

1.2.3. Nitración de tirosina.

La nitración de tirosina se produce *in vitro* a través de especies reactivas de nitrógeno (RNS), como el anión peroxinitrito (ONOO⁻) o el dióxido de nitrógeno (NO₂), que se forman a través de la interacción del NO con especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como radical superóxido (O₂⁻) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Radi, 2004). En animales la nitración de tirosina está clásicamente asociada con la pérdida de la función de las proteínas y, además, es un biomarcador del estrés oxidativo dependiente de NO (Hanafy *et al.*, 2001). Por otro lado, se ha demostrado que la nitración y la fosforilación de tirosina compiten durante la señalización mediada por proteínas quinasa, lo que conduce a una inhibición de la fosforilación de proteínas (Schopfer *et al.*, 2003). Varios estudios han demostrado la presencia de nitración en plantas (revisado por Neill *et al.*, 2008), sin embargo, hasta ahora es el mecanismo

menos estudiado y todavía no se conoce mucho acerca de su papel en la señalización por NO.

1.2.4. Señalización a través de calcio.

En animales, la mayoría de los canales y transportadores de calcio (Ca^{2+}) están bajo el control del NO. El NO modula su actividad directamente mediante S-nitrosilación o indirectamente a través de segundos mensajeros como el cGMP y/o el cADPR (adenosina-difosfato-ribosa cíclico). El cADPR activa los canales permeables al Ca^{2+} RYR (del inglés, ryanodine receptor), y promueve la liberación de Ca^{2+} desde los compartimentos intracelulares. En plantas, también se ha demostrado que el NO actúa a través del cADPR y de la movilización de Ca^{2+} (Figura 1.2). En plantas de tabaco, el cADPR induce la expresión de los genes relacionados con la patogénesis *PR-1* (del inglés, *pathogenesis related 1*) y *PAL* (del inglés, *phenylalanine ammonia liase*), de igual forma que lo hace el NO, y estos efectos se inhiben por un inhibidor de los canales RYR (Durner *et al.*, 1998). Además, un antagonista del cADPR, el 8-Br-cADPR (8-Bromo-cADPR), reduce la acumulación de transcritos del gen *PR-1* inducidos por la generación artificial de NO en hojas de tabaco (Klessig *et al.*, 2000). En células guarda de *Vicia faba*, el NO induce el aumento de la concentración citosólica de Ca^{2+} citosólico y/o la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular (García-Mata *et al.*, 2003; Lamotte *et al.*, 2004). Diversos estudios han demostrado que los canales RYR son las principales dianas de la acción del NO, y que el cADPR es un mensajero intracelular clave que media en la acción del NO. (Revisado por Besson-Bard *et al.*, 2008).

Otros estudios han demostrado que los inhibidores de proteínas quinasa (PKs) suprimen el efecto del NO sobre los niveles de Ca^{2+} citosólico en células guarda de *Vicia faba* y en células de *Nicotiana plumbaginifolia* (Lamotte *et al.*, 2006; Sokolovski *et al.*, 2005), implicando así a las PKs en las cascadas de señalización que transmiten la señal del NO a través del Ca^{2+} (Figura 1.2). Por otro lado, el NO, por medio del aumento de la concentración citosólica de Ca^{2+} , puede modular proteínas que intervienen en señalización como CDPKs (del inglés, Ca^{2+} -dependent protein kinases), MAPKs (del inglés, mitogen-activated protein kinases) y canales iónicos sensibles al Ca^{2+} . (Revisado por Besson-Bard *et al.*, 2008, Figura 1.2).

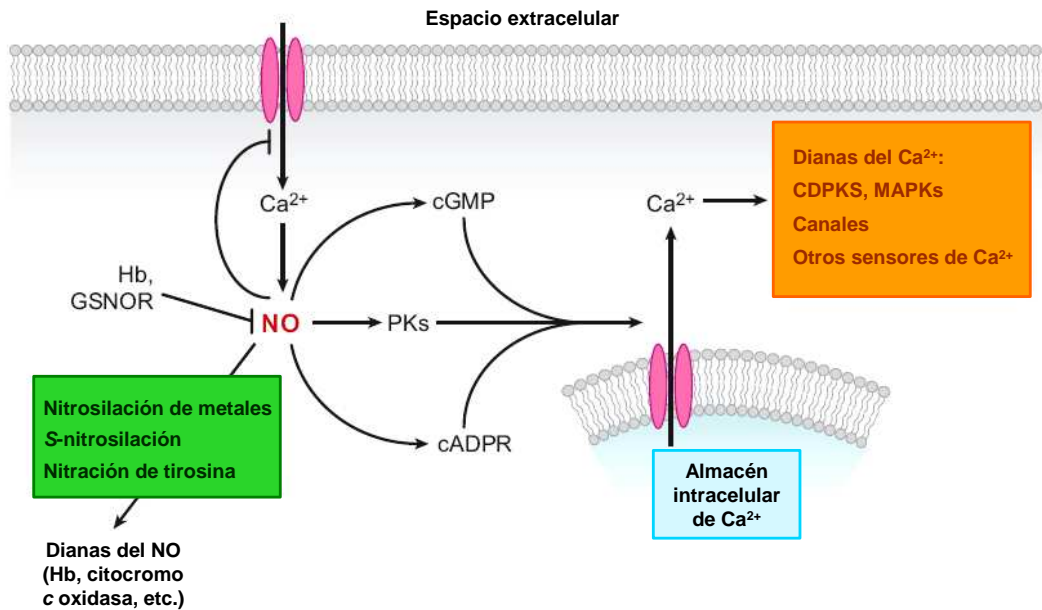


Figura 1.2. Señalización por NO en células vegetales (adaptado de Besson-Bard *et al.*, 2008).

1.3. Síntesis de óxido nítrico.

En plantas, el NO se puede formar a partir de arginina y de nitrito. En la síntesis de NO dependiente de arginina interviene una enzima con actividad tipo óxido nítrico sintasa “(NOS)-like enzyme” la cual aún no se ha identificado en plantas. Recientemente, se ha propuesto la implicación de otra ruta de síntesis de NO, aún no caracterizada en plantas, que utiliza poliaminas como sustratos. La síntesis de NO a partir del nitrito puede ocurrir de forma enzimática o no enzimática. Entre las enzimas principalmente implicadas en la síntesis de NO dependiente de nitrito, se encuentran la nitrato reductasa (NR) y la nitrito-NO reductasa (Ni-NOR). (Revisado por Besson-Bard *et al.*, 2008, Figura 1.3).

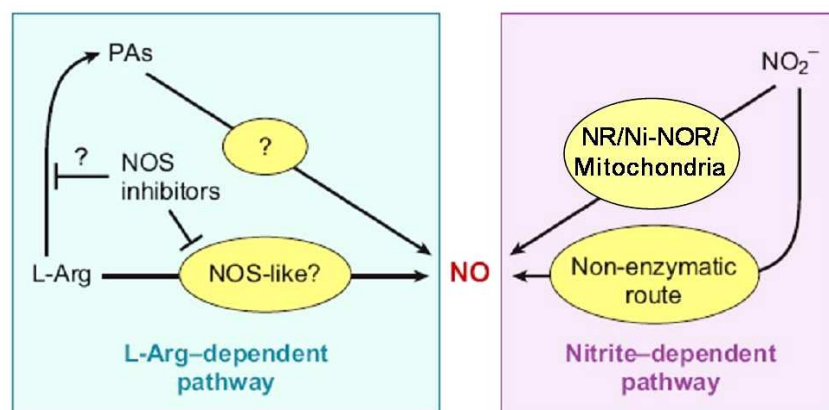


Figura 1.3. Síntesis de NO en plantas (adaptado de Besson-Bard *et al.*, 2008).

1.3.1. Síntesis de óxido nítrico dependiente de arginina.

En animales, el NO se genera principalmente por un grupo de enzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOSs), que catalizan la conversión de L-arginina a L-citrulina mediante una reacción dependiente de oxígeno y NADPH. La presencia actividad tipo NOS en plantas se ha detectado mediante la reacción de conversión de L-arginina a L-citrulina y se ha confirmado mediante la inhibición de esta reacción por inhibidores de las NOSs de mamíferos. También se han detectado proteínas vegetales inmunorrelacionadas con las NOSs de mamíferos.

La primera evidencia genética de la presencia de una enzima parecida a NOSs en plantas fue la identificación en *Arabidopsis thaliana* del gen *AtNOS1* (Guo *et al.*, 2003). El gen *AtNOS1* codifica una proteína que comparte similitud con una enzima involucrada en la síntesis de NO en la serpiente *Helix pomatia* (Guo *et al.*, 2003 y 2005). *AtNOS1* parece presentar características bioquímicas de NOSs, ya que reduce la arginina a citrulina y se inhibe en presencia de inhibidores de NOSs en mamíferos, sin embargo, no está relacionada estructuralmente con las NOSs clásicas de mamíferos. Diversas aproximaciones genéticas ha revelado que *AtNOS1* tiene un papel muy importante en la transición floral (He *et al.*, 2004), y es la principal fuente de NO en las rutas de señalización iniciadas por ABA (ácido abscísico) (Guo *et al.*, 2003) y lipopolisacáridos, que inducen respuestas defensivas en plantas (Zeidler *et al.*, 2004).

Sin embargo, posteriormente han aparecido varios trabajos que han puesto en duda si *AtNOS1* es realmente una enzima tipo NOS. En un intento de reproducir los primeros resultados, Zemojtel y colaboradores (2006) no pudieron detectar actividad tipo NOS en la proteína *AtNOS1* recombinante purificada o en otras proteínas recombinantes codificadas por genes ortólogos en maíz y arroz, por lo que parece que los ensayos típicos de medida de actividad NOS presentan limitaciones técnicas en plantas (revisado por Besson-Bard *et al.*, 2008; Neill *et al.*, 2008). Por otro lado, según los estudios de alineamiento de secuencias y los análisis estructurales, se ha propuesto que *AtNOS1* puede tratarse de una GTPasa (guanosina-trifosfatasa) involucrada en la biogénesis de ribosomas en las mitocondrias. Puesto que las mitocondrias son una fuente importante de NO (Grupta *et al.*, 2005; Planchet *et al.*, 2005) se podría explicar por qué una mutante *AtNOS1* tiene disminuida su capacidad de sintetizar NO. Por todos estos motivos, puesto que se ha demostrado que *AtNOS1* es una proteína asociada a la síntesis de NO pero no se ha demostrado que sea una proteína tipo NOS, actualmente se

ha propuesto renombrarla como AtNOa1 (del inglés, *Arabidopsis thaliana* nitric oxide-associated 1). (Revisado por Besson-Bard *et al.*, 2008; Neill *et al.*, 2008).

Los inhibidores de NOSs de mamíferos presentan limitada especificidad en células vegetales, de manera que tales inhibidores pueden actuar sobre otras enzimas que también metabolizan la L-arginina, como la arginasa y/o la arginina descarboxilasa, la primera enzima de la ruta biosintética de las poliaminas (PAs). En este sentido, el hecho de que las PAs espermina y espermidina induzcan una rápida síntesis de NO en varios tejidos de *Arabidopsis* (Tun *et al.*, 2006) es bastante relevante. Se ha sugerido la presencia de una enzima desconocida que es la responsable de la conversión directa de PAs a NO (Yamasaki y Cohen, 2006), de manera que la capacidad que tienen los inhibidores de NOSs de mamíferos para suprimir la síntesis de NO en plantas estaría relacionada con la habilidad que tienen de inhibir la arginasa y/o la arginina descarboxilasa, e indirectamente suprimir la síntesis de NO derivada de las PAs (revisado por Besson-Bard *et al.*, 2008).

También se ha detectado una enzima con actividad NOS en peroxisomas de hojas de guisante (Barroso *et al.*, 1999). Se ha demostrado mediante fluorescencia y EPR (resonancia paramagnética nuclear) la producción de NO en peroxisomas y por medio de quimioluminiscencia, estos autores también demuestran la acumulación de NO dependiente de arginina en peroxisomas a través de una proteína inmunorelacionada con la iNOS (inducible NOS) de ratón (Corpas *et al.*, 2004).

1.3.2. Síntesis de óxido nítrico dependiente de nitrito.

La principal función de la enzima nitrato reductasa (NR) en plantas es la reducción asimilatoria de nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-). La NR es un homodímero de 200 a 250 kDa, en el que cada monómero contiene tres grupos prostéticos: FAD (flavín-adenín-dinucleótido), hemo (citocromo b_{557}) y un cofactor de molibdeno (MoCo), que es el que transfiere los electrones desde el NAD(P)H [nicotinamida-adenina-dinucleótido(fosfato)] al sustrato, normalmente nitrato (Meyer *et al.*, 2005).

La producción de NO por la enzima NR se conoce desde los años 80 cuando se demostró que la NR de la soja cataliza la conversión del nitrato a NO *in vivo* (Dean y Harper, 1986 y 1988). Posteriormente, se demostró que la NR purificada de maíz tiene actividad nitrito reductasa *in vitro* y que produce NO a partir de nitrito en una reacción dependiente de NAD(P)H (Yamasaki, 1999; Yamasaki y Sakihama, 2000), y esto se confirmó mediante estudios *in vivo* e *in vitro* en *Arabidopsis* (Bright *et al.*, 2006).

El NO producido por la NR juega un papel fisiológico en diversos procesos de la planta y no es un simple producto secundario de la actividad de dicha enzima. La primera evidencia se obtuvo en *Arabidopsis*, donde se demostró que el NO producido por la NR estaba implicado en el cierre de los estomas inducido por ABA (ácido abscísico) (Desikan *et al.*, 2002). Además, la inhibición de la actividad de la NR mediante el tungstato impide la formación de NO y evita el cierre de los estomas inducido por ABA o nitrito (Desikan *et al.*, 2002; Bright *et al.*, 2006). El papel de la NR en el cierre de los estomas inducido por ABA también se ha estudiado mediante aproximaciones genéticas, y se ha demostrado que de las dos isoformas de NR presentes en *Arabidopsis*, NIA1 y NIA2, es NIA1 la fuente de NO durante la señalización por ABA (Bright *et al.*, 2006). Otros autores han sugerido que el NO producido por la NR podría participar en la formación del aerénquima en raíces (Dordas *et al.*, 2003).

En raíces hay dos tipos de NRs, una se encuentra en el citosol (cNR) y otra se encuentra unida a la membrana plasmática expuesta hacia el apoplasto (PM-NR) (Igamberdiev y Hill, 2004a). La cantidad de cNR activa está regulada, sobre todo, por factores ambientales como la disponibilidad de nitrato y el oxígeno (Störh y Stremmlau, 2006). En condiciones de hipoxia/anoxia se produce una inducción de la cNR asociada con la acidificación celular que da lugar a una acumulación de nitrito (Botrel y Kaiser, 1997; Stoimenova *et al.*, 2003). Además, la actividad de la cNR parece estar sometida a una regulación post-traducciona según su estado de fosforilación (Botrel y Kaiser, 1997; Rockel *et al.*, 2002). Puesto que la hipoxia/anoxia también provocan un aumento de los niveles de NO en plantas, que se ha relacionado con la inducción de la cNR (Dordas *et al.*, 2003a y 2004; Rockel *et al.*, 2002), se ha sugerido que la cNR es una de las enzimas responsables de la producción de NO en condiciones de baja concentración de oxígeno. (Revisado por Igamberdiev y Hill, 2004).

La nitrito:NO reductasa (NI-NOR) es otra fuente de NO en células vegetales. Esta enzima se ha estudiado principalmente en *Nicotiana tabacum* y es una enzima específica de raíz donde se encuentra unida a la membrana plasmática y expuesta hacia el apoplasto (Stöhr *et al.*, 2001). Estudios *in vitro* han demostrado que no utiliza NAD(P)H como donador de electrones, sino citocromo *c*, pero todavía no se ha identificado el donador de electrones en condiciones fisiológicas. La producción de NO por esta enzima, cuya actividad depende principalmente de la disponibilidad de nitrato en el suelo, podría estar relacionada con varios procesos fisiológicos como el desarrollo de la raíz, las interacciones con patógenos y el desarrollo de micorrizas arbusculares.

Además, se ha demostrado que la actividad de la NI-NOR se inhibe reversiblemente en presencia de oxígeno, lo que indica que, en el apoplasto de la raíz, la formación de NO dependiente de nitrito puede estar regulada *in vivo* por oxígeno. Además, se ha propuesto que la elevada producción de NO en el apoplasto por la NI-NOR puede ser la señal que indique deficiencia de oxígeno en la raíz. La presencia de una enzima NR unida a la membrana plasmática (PM-NR), que reduce el nitrato a nitrito en el apoplasto de la raíz, permite sugerir una actividad estrechamente coordinada entre estas dos enzimas, que sería la responsable de producir la primera señal que indicara la presencia de nitrato en el suelo, sin embargo todavía no se tienen datos suficientes para asegurar que realmente se trate de una NR (revisado por Stöhr y Stremlau, 2006).

En el apoplasto de la capa de aleurona de granos cebada se ha demostrado la producción no enzimática, dependiente de pH ácido, de NO a partir de nitrito, en respuesta a giberelina y ABA, dos hormonas que acidifican el medio apoplástico (Bethke *et al.*, 2004a). La presencia de agentes reductores como compuestos fenólicos puede acelerar la formación de NO (Bethke *et al.*, 2004a).

Se ha demostrado que las mitocondrias son otra fuente de NO en plantas. Las mitocondrias purificadas a partir de suspensiones celulares de tabaco son capaces de reducir el nitrito a NO a expensas de NADH en condiciones anóxicas (Planchet *et al.*, 2005). Otros autores han demostrado que sólo las mitocondrias de la raíz, y no las de hojas, son capaces de reducir el nitrito a NO tanto *in vitro* como *in situ* (Grupta *et al.*, 2005). En presencia de inhibidores de la cadena de transporte electrónico mitocondrial [mixotiazol o SHAM (ácido salicilhidroxámico)] la formación de NO en la raíz se bloquea (Grupta *et al.*, 2005). Además, estos autores sugieren que la mayor parte del NO producido en raíces sometidas a condiciones hipóxicas ($\leq 1\%$) es producida por las mitocondrias, en comparación con la NR. El hecho de que esta actividad sea específica de las mitocondrias de la raíz sugiere una conexión entre la producción de NO y ciertos aspectos del metabolismo de las raíces en condiciones de hipoxia/anoxia (Grupta *et al.*, 2005).

1.4. Funciones del óxido nítrico.

El NO es una molécula señal que tiene importantes funciones en diversos procesos de la fisiología de las plantas como son el crecimiento y desarrollo de las mismas. También interviene en la respuesta de las plantas a estreses bióticos y

abióticos. El NO puede funcionar como una molécula citotóxica o citoprotectora dependiendo de su concentración y localización en las células vegetales.

1.4.1. Crecimiento y desarrollo.

Varios estudios han demostrado que el NO rompe la dormancia de la semilla y estimula su germinación en varias especies (Zhang *et al.* 2005; Bethke *et al.*, 2004b). Además, mediante EPR se ha detectado la acumulación de NO endógeno dentro de las semillas de sorgo (Simontacchi *et al.*, 2004). Uno de los posibles mecanismos por el que el NO puede intervenir en la germinación es mediante la activación de la enzima β -amilasa (Zhang *et al.* 2005). (Revisado por Delledone, 2005).

El NO induce la elongación de la raíz de la misma forma que lo hacen las auxinas (Gouvêa *et al.*, 1997). Además, se ha demostrado que el NO interviene en la organogénesis de las raíces ya que actúa como mediador en la ruta de señalización iniciada por las auxinas que conduce a la formación de raíces adventicias de pepino (Pagnussat *et al.*, 2002) y raíces laterales de tomate (Correa-Aragunde *et al.*, 2004). El NO también participa en la respuesta de la raíz primaria frente al gravitropismo. La estimulación por gravedad de raíces de soja provoca una acumulación asimétrica de NO que está inducida por auxinas (Hu *et al.*, 2005). (Revisado por Stöhr y Stremlau, 2006).

Mediante la utilización de donadores y secuestradores de NO se ha demostrado que el NO actúa como un modulador del crecimiento y de la orientación del tubo polínico dentro del pistilo. Se ha propuesto que la distribución de los peroxisomas, fuentes de NO, en la punta del tubo polínico determina la dirección del crecimiento (Prado *et al.*, 2004). (Revisado por Delledone, 2005).

En el tejido vascular, el NO regula la muerte celular programada y la lignificación durante la formación del xilema. En las etapas tempranas del proceso, el NO se acumula en los elementos traqueales y es necesario para que se produzca la pared celular secundaria y la autólisis celular (Gabaldón *et al.*, 2005). (Revisado por Delledonne, 2005).

Mientras investigaban el efecto del NO sobre el crecimiento vegetativo, He y colaboradores (2004), observaron que la aplicación de donadores de NO en plantas de *Arabidopsis* provoca un retraso de la floración. Estos autores demostraron que las líneas mutantes en el locus *nox1* contienen niveles más elevados de arginina, citrulina y NO que la línea parental, y además, florecen más tarde. Por otro lado, líneas de *Arabidopsis* con el gen *AtNOS1* mutado, florecen antes, lo cual, a su vez, es una evidencia *in vivo* de

la síntesis de NO dependiente de arginina. Estos autores sugieren que el NO interviene en la floración actuando sobre la expresión de genes reguladores implicados en dicho proceso. (He *et al.* 2004, citado por Crawford y Guo, 2005 y Grün *et al.*, 2006).

1.4.2. Estrés biótico.

El NO desempeña un papel fundamental en los mecanismos de señalización que tienen lugar durante la respuesta de la planta a patógenos. Lo primero que acontece durante esta respuesta es la inducción de la HR (del inglés, hypersensitive response), con el fin de limitar los nutrientes disponibles para el parásito. La HR se caracteriza por una acumulación rápida de NO y ROS, que dispara la muerte celular, induce la activación de las rutas de señalización que conducen a la expresión de los genes relacionados con la defensa y media en el establecimiento de la respuesta sistémica adquirida (SAR, del inglés systemic acquired resistance). Además, se ha demostrado que el NO también juega un papel crucial en la señal intracelular que desencadena la transmisión de la HR de célula a célula. (Revisado por Delledone, 2005).

La muerte celular que ocurre durante la HR se debe a una producción equilibrada de NO y ROS (Delledone *et al.*, 1998 y 2001). Se ha propuesto que la muerte celular se desarrolla por la acción del NO junto con H₂O₂, ya que se ha observado la aceleración de la actividad superóxido dismutasa (SOD), que produce H₂O₂ a partir de superóxido (Delledone *et al.*, 2001). Además se ha demostrado que líneas transgénicas de tabaco con actividad catalasa reducida, presentan niveles más elevados de H₂O₂ y de muerte celular que las líneas control (Zago *et al.*, 2006). Las plantas transgénicas de *A. thaliana* que expresan una flavohemoglobina bacteriana, presentan niveles más bajos de NO, H₂O₂ y una HR reducida. Estos autores sugieren que probablemente la función del NO durante la HR sea inhibir la actividad de las enzimas antioxidantes (Zeier *et al.*, 2004). En relación con esta idea, se ha demostrado que el NO reprime la acumulación de la enzima ascorbato peroxidasa de los tilacoides, que se encarga de captar H₂O₂ (Murgia *et al.*, 2004). (Revisado por Delledone, 2005; Hong *et al.*, 2008).

La aplicación de donadores de NO en plantas de tabaco o en suspensiones de células de soja inducen la expresión de genes, como *PAL* y *PRI*, que juegan un papel crucial en el desarrollo de la SAR (Delledone *et al.*, 1998; Durner *et al.*, 1998). Las plantas transgénicas de *A. thaliana* que expresan una flavohemoglobina bacteriana presentan menor número de transcritos del gen *PAL*, y la expresión del gen *PRI* se ve

retrasada (Zeidler *et al.*, 2004). Estudios posteriores han permitido identificar otros genes implicados en la SAR y, además, se ha demostrado que la mayoría están modulados tanto por NO como por H₂O₂ (Zago *et al.*, 2006). (Revisado por Hong *et al.*, 2008).

Mediante la utilización de inhibidores de NOSs de mamíferos se ha demostrado que una actividad tipo NOS se encarga de la producción de NO durante la interacción planta-patógeno (Delledonne *et al.*, 1998; Durner *et al.*, 1998). En *A. thaliana* la presencia de lipopolisacáridos (LPS) procedentes de bacterias patógenas de plantas y animales inducen una rápida producción de NO que es dependiente del gen *AtNOS1*, y se ha demostrado que mutantes de *A. thaliana* en el gen *AtNOS1* son mucho más susceptibles frente a *P. syringae* DC3000 (Zeidler *et al.*, 2004). (Revisado por Hong *et al.*, 2008).

1.4.3. Estrés abiótico.

Los estreses abióticos inducen la producción de NO en células vegetales. El NO regula la respuesta de las plantas frente al estrés abiótico, reduciendo el efecto deletéreo de las ROS. La mayoría de los estreses abióticos provocan un aumento de las ROS, a partir de cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas. Estas ROS causan un daño oxidativo, pero por otro lado también están involucradas en la respuesta frente al estrés. Alguno de los efectos antioxidantes del NO se debe a su interacción con algunas ROS como el superóxido para formar peroxinitrito, que puede ser eliminado por otros procesos celulares. En otros casos, el NO incrementa la actividad de enzimas antioxidantes como la SOD, la catalasa y la ascorbato peroxidasa. Además, el NO participa en las cascadas de señalización y en la regulación de la expresión de genes de respuesta a estrés. (Revisado por Neill *et al.*, 2007; Qian y Fan, 2008).

La sequía provoca una serie de daños en las células, mediados por ROS, como son la muerte celular, el escape de iones y la fragmentación del ADN. En hojas de patata, se ha demostrado que estos efectos son menores cuando se aplica NO exógeno (Beligni y Lamattina, 1999). El déficit hídrico induce la producción de NO en plantas de tabaco y guisante (Gould *et al.*, 2003; Leshem y Haramaty, 1996). La aplicación de un donador de NO (SNP, nitroprusiato sódico) a hojas de trigo provoca una mayor tolerancia frente a sequía debido a que estas hojas pierden menos agua, presentan una menor tasa de transpiración, menor escape de iones e inducción del cierre de los estomas. Cuando se aplica un secuestrador de NO [cPTIO, del inglés 2-(4-

carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide] se revierten los efectos del NO (García-Mata y Lamattina, 2001). (Revisado por Qiao y Fan, 2008).

Bajo condiciones de estrés salino, el tratamiento con SNP resulta en un mayor crecimiento y viabilidad de plántulas de arroz (Uchida *et al.*, 2002), promueve la germinación y el crecimiento de la raíz de plantulas de lupino amarillo (Kopyra y Gwozdz, 2003), e incrementa el crecimiento y el peso seco de plántulas de maíz (Zhang *et al.*, 2006). Además, plantas mutantes *AtNOa1* de *Arabidopsis* son más sensibles al cloruro sódico que las plantas silvestres (Guo *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2007a). Estas mutantes presentan niveles más elevados de H₂O₂, pero cuando son tratadas con SNP se reduce el daño oxidativo provocado por el cloruro sódico (Zhao *et al.*, 2007b). Se ha sugerido que el NO incrementa la tolerancia frente al estrés salino induciendo la expresión de genes que se requieren para la homeostasis del Na⁺ y la adquisición del K⁺. (Revisado por Qiao y Fan, 2008).

Existen diversos trabajos que demuestran el papel protector del NO frente a otros estreses abióticos tales como las temperaturas extremas, la radiación UV, el estrés mecánico, los herbicidas y los metales pesados (revisado por Qiao y Fan, 2008).

En condiciones de estrés abiótico se produce acumulación de ABA y la inducción de genes regulados por esta hormona. El ABA induce tolerancia frente a diferentes estreses como la sequía, la salinidad y las bajas temperaturas a través de dos procesos en los que se encuentra implicada, como molécula señal, el NO. Por un lado, el ABA induce el cierre de los estomas, lo que a su vez reduce la pérdida de agua por transpiración, y por otro, induce la activación de las defensas frente al daño oxidativo. En células guarda, el ABA induce la síntesis de NO y de H₂O₂, que al igual que el NO, también está involucrado en el cierre estomático. Diversos trabajos demuestran que la síntesis de NO inducida por ABA es dependiente de la producción de H₂O₂, ya que al eliminar el H₂O₂ mediante el uso de antioxidantes o inhibiendo su síntesis, no se observa producción de NO en la células guarda, ni tampoco cierre estomático. De forma similar, al eliminar el NO mediante un secuestrador se compromete la inducción del cierre estomático por H₂O₂ o ABA. Los datos indican que la generación de NO inducida por ABA en células guarda requiere actividad tipo NOS y, en *Arabidopsis*, también la isoforma NIA1 de la NR. El NO estimula la actividad de MAPK y la producción de cGMP, dos eventos que se requieren para que se produzca el cierre estomático (consultar el apartado 1.2.4). (Revisado por Neill *et al.*, 2007; Qian y Fan, 2008).

El estrés por hipoxia también provoca un incremento en los niveles de NO en los tejidos de la planta, que ha sido detectado por quimioluminiscencia (Rockel *et al.*, 2002; Perazzoli *et al.*, 2004) y EPR (Dordas *et al.*, 2003b y 2004). En el apartado 1.5.3 se hablará del papel del NO y de las Hb de clase 1 en la resistencia a corto plazo frente a condiciones de hipoxia, como puede ser el encharcamiento del suelo.

1.4.4. Regulación de la expresión génica por óxido nítrico.

EL NO está implicado, a nivel molecular, en la regulación de la expresión génica (revisado por Grün *et al.*, 2006). Los estudios transcriptómicos indican que el NO regula genes relacionados con una amplia diversidad de procesos celulares. En 2003, Polverari y colaboradores investigaron los cambios en los perfiles de expresión de *A. thaliana*, tras su tratamiento con un donador de NO (SNP), mediante cDNA-AFLP (del inglés, amplification fragment length polymorphism). De un total de 2500 transcritos comprobados, 120 se vieron afectados tras el tratamiento con el donador de NO (Polverari *et al.*, 2003). En un estudio posterior se utilizó un “microarray” de genoma completo de *A. thaliana* en el que estaban incluidos aproximadamente 24000 genes. Tras el tratamiento de las raíces de *Arabidopsis* con SNP, se comprobó la inducción de 324 genes y la represión de 80 genes (Parani *et al.*, 2004). Estudios más concretos han demostrado que el NO está implicado en la homeostasis del hierro, puesto que se ha demostrado que el tratamiento de hojas de *Arabidopsis* con SNP provoca la inducción de la expresión de ferritina (una proteína encargada del almacenamiento del hierro) (Murgia *et al.*, 2002), y por otra parte, se ha demostrado que el NO regula la síntesis de glutatión (GSH) en raíces de *Medicago truncatula*. El tratamiento de la raíces de alfalfa con dos donadores de NO, SNP y nitrosoglutatión (GSNO) provoca la inducción de los genes γ -*ecs* y *gshs*, que codifican dos enzimas (γ -glutamina sintasa y glutatión sintasa, respectivamente) implicadas en la ruta biosintética del GSH. Mientras que el GSH esta presente en la planta entera, el homoglutatión (hGSH) es un tiol característico de raíces y nódulos de leguminosas. El tratamiento con donadores de NO no tiene ningún efecto sobre la expresión de *hgshs*, que codifica la enzima homoglutatión sintasa, responsable de la síntesis de hGSH. Estos resultados sugieren que estos dos tioles deben realizar funciones diferentes en leguminosas (Inocenti *et al.*, 2007).

1.5. Modulación de los niveles del óxido nítrico.

Como se ha comentado en el apartado 1.4, dependiendo de su concentración y localización, se han descrito propiedades tanto citotóxicas como citoprotectoras y estimulantes para el NO en plantas, lo que sugiere la importancia de conocer tanto los mecanismos de síntesis como los de modulación para controlar el nivel, la reactividad, y las funciones de señalización de esta molécula.

1.5.1. Reactividad química.

Las reacciones químicas que se producen como consecuencia de la elevada reactividad del NO constituyen el primer mecanismo de eliminación de NO del medio. El NO reacciona con O₂ para formar dióxido de nitrógeno, que se degrada para formar nitrito y nitrato en solución acuosa (Neill *et al.*, 2003). Tanto en células animales como vegetales, el NO se produce al mismo tiempo que las ROS, de manera que el NO reacciona rápidamente con el radical superóxido para formar otra molécula altamente reactiva, el peroxinitrito, que es considerada la RNS más tóxica en animales (Stamler *et al.*, 1992), aunque parece que las plantas son resistentes a este radical (Delledonne *et al.*, 2001), que incluso podría presentar propiedades señalizadoras. Por lo tanto, el nivel de NO puede estar modulando los niveles de ROS en las células y viceversa. (Revisado por Neill *et al.*, 2008).

1.5.2. Óxido nítrico y glutatión.

El NO puede reaccionar con el grupo tiol del residuo de cisteína que contiene el tripéptido glutatión (GSH) (γ glutámico-cisteína-glicina). La concentración de glutatión en células vegetales suele ser 2-3 mM por lo que la formación de GSH S-nitrosilado (GSNO) puede influir mucho en las concentraciones de NO libre dentro de éstas. De hecho, el GSNO es considerado un reservorio y donador de NO (Feechan *et al.*, 2005), y por lo tanto un agente S-nitrosilante. La enzima GSNO reductasa, que cataliza la oxidación del GSNO a GSSG (glutatión disulfuro) y amonio (Díaz *et al.*, 2003), puede ser clave a la hora de controlar la disponibilidad de NO y la S-nitrosilación de proteínas. Se ha demostrado que existe una correlación entre el nivel de expresión de GSNO reductasa y el contenido endógeno de S-nitrosotioles durante la interacción planta patógeno, de manera que la acción de dicha enzima protege a la planta modulando el nivel de los S-nitrosotioles, cuya presencia en elevadas concentraciones, compromete la respuesta de resistencia promovida por la planta frente a los patógenos (Feechan *et al.*,

2005; Rustérucci *et al.*, 2007). (Revisado por Besson-Bard *et al.*, 2008; Perazzolli *et al.*, 2006).

1.5.3. Óxido nítrico y hemoglobinas vegetales.

La presencia de Hbs en plantas fue descrita por primera vez en nódulos de soja en 1939 por Kubo. Desde su descubrimiento, se ha demostrado que las Hbs están presentes en todo el reino vegetal. Actualmente se distinguen tres grupos filogenéticos de Hb vegetales, según el análisis de sus secuencias y la afinidad por el oxígeno (Smaghe *et al.*, 2009). Las Hbs de clase 1 (Hbs-1) presentan una afinidad muy elevada por el oxígeno (debido a una constante de disociación muy baja) y se expresan en condiciones de estrés metabólico (revisado por Dordas, 2009). Las Hbs-1 son Hbs no simbióticas (nsHbs), puesto que su presencia en la planta no se asocia con la presencia de un simbionte. Dentro de las Hbs de clase 2 (Hbs-2) se encuentran las hemoglobinas simbióticas (leghemoglobinas, Lbs) y otras nsHbs. Estas Hbs presentan menor afinidad por el oxígeno que las Hbs-1. Las Lbs se encuentran en concentraciones elevadas dentro de los nódulos de leguminosas y no leguminosas (*Causarina*, *Myrica* y *Alnus*) donde cumplen una doble función, facilitando el transporte de oxígeno a los bacteroides y evitando la inactivación de la nitrogenasa (consultar el apartado 2.6.2). En *Arabidopsis* la expresión de nsHbs de clase 2 se induce en respuesta al tratamiento con bajas temperaturas y citoquininas (revisado por Dordas, 2009). Las Hbs de clase 3 (Hbs-3), son hemoproteínas que presentan una estructura truncada con respecto a las otras Hbs. En *A. thaliana* se ha identificado un gen (*GLB3*) que codifica una proteína similar a las Hbs truncadas de bacterias, y parece que está presente de manera general en plantas (Watts *et al.*, 2001). En *M. truncatula* se han identificado dos genes (*MtTrHb1* y *MtTrHb2*) que codifican dos proteínas homólogas a Hbs truncadas (Vieweg *et al.*, 2005).

Para estudiar la relación entre las Hbs-1 y el NO *in vivo*, varios grupos han recurrido a aumentar o suprimir la expresión de dichas Hbs. De esta manera se ha demostrado que una de las funciones conocidas de estas Hbs es el mantenimiento del estado energético de la célula en plantas que se encuentran sometidas a hipoxia, (revisado por Dordas, 2009; Perazzolli *et al* 2006).

La expresión de las Hbs-1 se induce drásticamente en condiciones de hipoxia, lo que es esencial para la supervivencia de la planta (Perazzolli *et al.*, 2006). Aquellas líneas que sobreexpresan Hbs de clase 1 resisten mejor la hipoxia que las líneas control.

Además, bajo condiciones hipóxicas se induce la producción de NO, cuya acumulación es inversamente proporcional a los niveles de Hbs-1. Todos estos datos han permitido sugerir que las Hbs-1 regulan los niveles de NO y por lo tanto, directa o indirectamente, también regulan los procesos dependientes de NO en células vegetales (revisado por Dordas, 2009). Un ejemplo sería la formación del aerénquima en tallos y raíces. Esta estructura se forma por un proceso, inducido por etileno, de muerte celular selectiva y desintegración, lo que da lugar a espacios vacíos que facilitan la difusión de gas. Se ha demostrado que suspensiones de células de maíz que tienen suprimida la Hb-1 producen niveles más elevados de etileno y NO. En raíces de alfalfa que sobreexpresan la Hb-1 de cebada no se observan indicios de la formación del aerénquima después de varias horas de exposición a hipoxia, mientras que en raíces control sí se observan. Estos resultados indican que el NO actúa directa o indirectamente sobre la síntesis de etileno. La expresión selectiva de Hbs-1 en la raíz podría regular la formación del aerénquima modulando los niveles de NO, que tendría un efecto directo en el proceso de muerte celular. (Revisado por Igamberdiev *et al.*, 2005).

Se ha propuesto la existencia de un ciclo que implica al NO y las nsHbs en la resistencia a corto plazo frente a condiciones de hipoxia, como puede ser el encharcamiento del suelo (revisado por Dordas, 2009; Igamberdiev *et al.*, 2005; Perazzolli *et al.*, 2006). La secuencia de eventos que componen este ciclo se resume en la Figura 1.4. La inducción de la reducción de nitrato por la cNR o la PM-NR da lugar a la acumulación de nitrito, que es reducido hasta NO por la intervención de diferentes sistemas dependientes de NAD(P)H (consultar apartado 1.3). En este ciclo la Hb-1 actúa como parte de un sistema NO dioxigenasa y, en su forma oxigenada, $\text{Hb}(\text{Fe}^{2+})\text{O}_2$, oxida el NO para producir de nuevo nitrato. En conjunto, todas estas reacciones están oxidando NAD(P)H, por lo que mantienen el estado redox de la célula en condiciones hipóxicas, ayudando así en el mantenimiento de la glucólisis. Como consecuencia de la oxidación del NO por parte de la oxihb, se produce metaHb, $\text{Hb}(\text{Fe}^{3+})$, que debe ser reducida a $\text{Hb}(\text{Fe}^{2+})$ para mantener el ciclo. En este paso, puesto que las Hbs carecen del dominio ferredoxina-NADP⁺ reductasa, junto con la Hb intervendría otra proteína, como por ejemplo la monodihidroascorbato reductasa (MDHAR), que está implicada en la reducción de la metaHb mediada por ascorbato (Igamberdiev *et al.*, 2006), o en nódulos de leguminosas, una enzima reductasa específica (FLbR, del inglés, Ferric Lb Reductase) (Becana y Klukas, 1992), también podrían intervenir reductores endógenos como el NAD(P)H y el ascorbato (Becana y Klukas, 1992; Perazzolli *et al.*, 2004). Este

ciclo, aparte de detoxificar NO y permitir el mantenimiento del estado redox y energético de la célula durante las condiciones de hipoxia, supone una ruta alternativa a las rutas clásicas de fermentación que operan en condiciones hipóxicas.

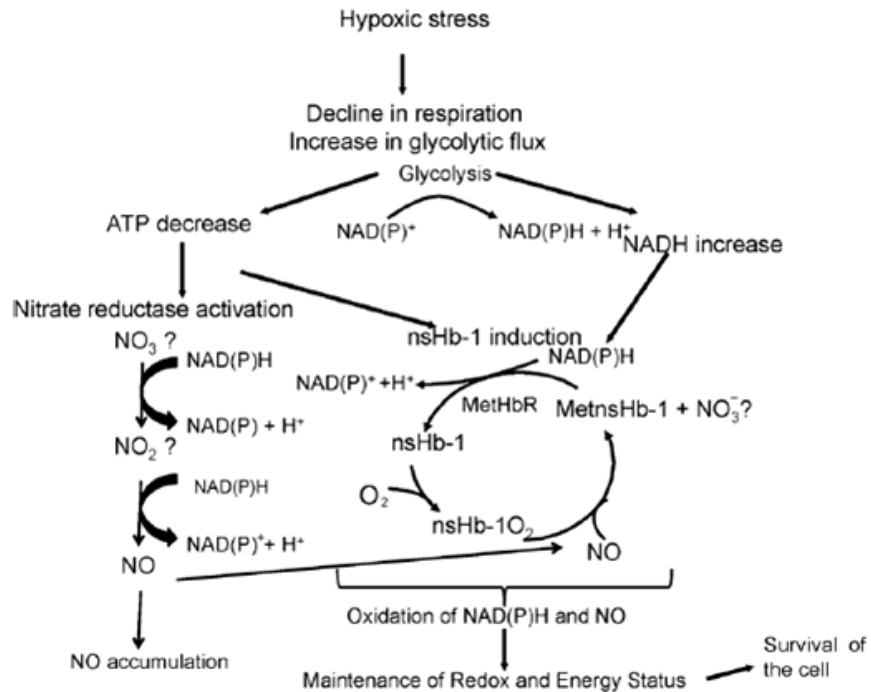


Figura 1.4. Ciclo nsHb/NO y su implicación en la tolerancia frente a condiciones hipóxicas (Dordas, 2009).

Recientemente, se demostró el papel de las Hbs-1 en la protección frente al estrés nitrosativo, mediante la modulación de los niveles de NO, durante la interacción planta-microorganismo (Nagata *et al.*, 2008; Sasakura *et al.*, 2006; Shimoda *et al.*, 2005 y 2009). En el apartado 4.3.1 se hablará en detalle sobre este aspecto..

2. La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa.

2.1. La fijación biológica de dinitrógeno.

El nitrógeno (N) es un elemento fundamental para todos los seres vivos ya que es componente de biomoléculas imprescindibles para la vida, como las proteínas y los ácidos nucleicos. La principal reserva de N se encuentra en la atmósfera terrestre en forma de dinitrógeno (N₂). Sin embargo, el N₂ atmosférico es inerte, debido a la fuerza de su triple enlace, y no puede ser utilizado por la mayoría de los seres vivos, a

excepción de un grupo de procariontas, los diazotrofos, que tienen la capacidad de reducirlo a amonio a través de un proceso conocido como fijación, en vida libre o en simbiosis con algunas plantas. La capacidad de fijar N_2 está ampliamente distribuida entre los procariontas y es compatible con ambientes muy variados y una gama amplia de características fisiológicas. Se estima que en total se fijan aproximadamente 275 millones de toneladas métricas (Tm) de N_2 al año, de los que 30 se deben a causas naturales como descargas eléctricas o erupciones volcánicas, 70 proceden de la fijación industrial por el proceso Haber-Bosch (que se utiliza para la producción de fertilizantes nitrogenados), y 175 de la fijación biológica (de Felipe, 2006). La fijación de N_2 es un proceso muy importante del ciclo del nitrógeno ya que repone el contenido total de N en la biosfera y compensa las pérdidas que ocurren por la desnitrificación (Dixon y Kahn, 2004) (Figura 2.1).

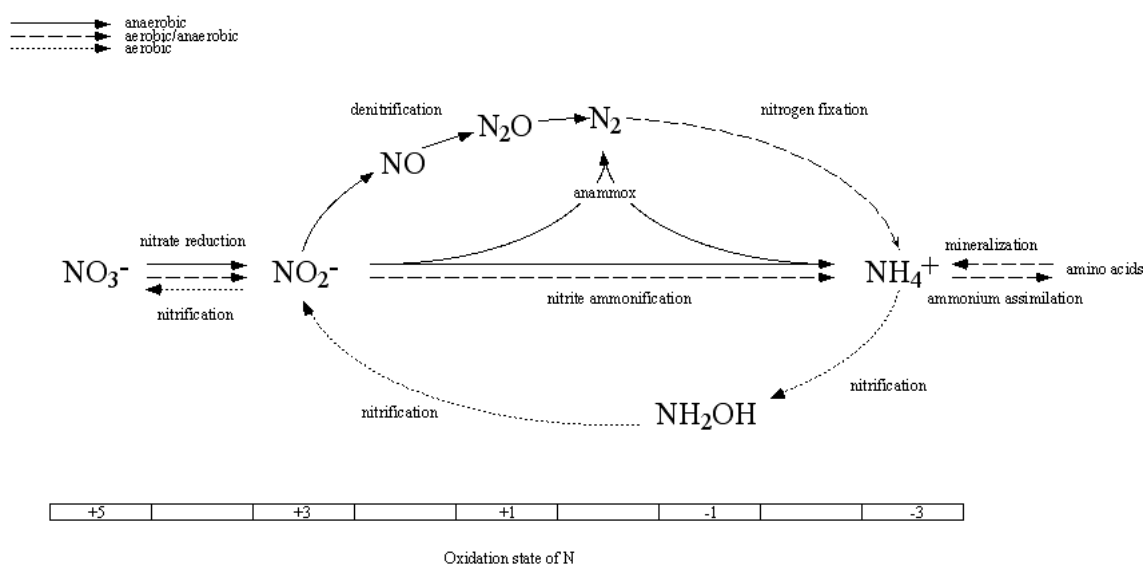


Figura 2.1. Ciclo biológico del N (van Spanning *et al.*, 2005).

Después del agua, el N es el principal nutriente limitante para el desarrollo de las plantas. Por esta razón, en el periodo entre 1950 y 1990 se incrementó 10 veces en España el uso de fertilizantes nitrogenados, que junto con otras acciones industriales y antrópicas, han alterado las condiciones básicas del ciclo natural del N y han contribuido a la contaminación por nitratos de los ecosistemas terrestres y acuáticos creando graves problemas ecológicos y para la salud humana (de Felipe, 2006). No todos los fertilizantes aplicados a los sistemas agrícolas son asimilados por los cultivos. Algunos son barridos de los campos por la lluvia o el agua de riego y son lixiviados, acumulándose y dando lugar a la contaminación de las aguas superficiales y

subterráneas. La acumulación excesiva de fertilizantes nitrogenados provoca una serie de efectos negativos relacionados con la salud humana, como la metahemoglobinemia, afecciones respiratorias, e incluso se ha relacionado con la aparición de cáncer (de Felipe, 2006; Velázquez *et al.*, 2006). En las aguas superficiales, el exceso de N puede causar eutrofización, o enriquecimiento excesivo de nutrientes, cuyo resultado es un aumento de la producción primaria (fotosíntesis) con importantes consecuencias sobre la composición, estructura y dinámica del ecosistema. La eutrofización produce de manera general un aumento de la biomasa y un empobrecimiento de la diversidad. Por otra parte el N acumulado en los suelos o aguas superficiales puede retornar a la atmósfera en forma de óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N₂O), gases con efecto invernadero que contribuyen a la destrucción de la capa de ozono. Además, el NO puede ser químicamente oxidado hasta dióxido de nitrógeno (NO₂), que a su vez se puede hidratar formando los ácidos nitroso y nítrico (HNO₂ y HNO₃), que caen a la tierra como constituyentes de la lluvia ácida.

Actualmente, se están explorando prácticas agrícolas alternativas que sostengan una productividad elevada a la vez que disminuyan el impacto negativo causado por el uso de los fertilizantes. En este contexto es donde tienen gran importancia los biofertilizantes microbianos como alternativa, todavía parcial, a los fertilizantes químicos. La fijación biológica de N₂ aporta la mayor parte del N fijado a los ecosistemas terrestres y se encuentra dentro de las prácticas agrícolas respetuosas con el medio ambiente. De los 175 millones de Tm de N que se fijan anualmente por vía biológica, 35 proceden de la fijación en vida libre y 140 de la fijación simbiótica (de Felipe, 2006).

Considerando todo lo expuesto anteriormente, hoy se considera a la fijación simbiótica de N₂ como un proceso de enorme importancia económica, ecológica y agrícola. Este proceso tiene lugar gracias a la asociación mutualista que establecen bacterias del orden *Rhizobiales* y plantas de la familia *Fabaceae*.

Las fabáceas (*Fabaceae*) o leguminosas (*Leguminosae*), son una familia de árboles, arbustos y hierbas, perennes o anuales, de distribución cosmopolita que consta de alrededor de 20.000 especies distribuidas en tres subfamilias: *Cesalpinioideae*, que consta de numerosas especies tropicales, *Mimosoideae*, que incluye especies arbóreas, y *Papilionoideae*, que es la mayor subfamilia y la que incluye las especies de mayor interés agronómico. La gran importancia económica de esta familia se debe a que muchos de sus miembros se han utilizado desde la antigüedad como alimento de los

seres humanos y de los animales. Actualmente, las leguminosas son la fuente proteica más importante para los países en desarrollo y la segunda fuente de alimentos a nivel mundial, además de su gran relevancia como forrajeras y componentes de piensos para alimento animal. Por otro lado las leguminosas, en asociación con bacterias fijadoras, mejoran la fertilidad de suelos lo que les confiere una gran eficacia a la hora de la fitorrecuperación de suelos forestales y revegetación (Carpena *et al.*, 2006), además de preparar los suelos agrícolas para ser utilizados con otros cultivos, por medio de la rotación de cultivos.

Las principales responsables de la fijación simbiótica de N₂ son las bacterias pertenecientes al orden *Rhizobiales*, conocidas comúnmente como rizobios. Los rizobios son α -Proteobacterias, Gram-negativas, que pertenecen a un número diverso de géneros: *Rhizobium*, *Ensifer* (antes *Sinorhizobium*), *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Blastobacter*, *Methylobacterium*, *Devosia*, *Phyllobacterium* y *Ochrobactrum* (Velázquez *et al.*, 2006). Los rizobios inducen la formación de nódulos, que son los órganos donde tiene lugar el proceso de fijación de N₂. La mayoría de los rizobios forman nódulos en las raíces de sus leguminosas hospedadoras, *Azorhizobium* los ocasiona tanto en las raíces como en los tallos de *Sesbania rostrata*, y *Phyllobacterium* los originan en las hojas de las plantas de las familias *Myrsinaceae* y *Rubiaceae*. Aparte de los rizobios, existen otras bacterias capaces de fijar nitrógeno en simbiosis con leguminosas, como son las del género *Burkholderia* y *Ralstonia*, incluidas en el grupo de la β -proteobacterias (Velázquez *et al.*, 2006).

En el interior de los nódulos las bacterias se diferencian en formas especializadas, denominadas bacteriodes, que reducen el N₂ atmosférico a amonio, una forma nitrogenada asimilable por la planta. La asociación entre la planta y la bacteria supone una complementación nutricional recíproca. Mientras que la planta recibe N₂ fijado en forma de amonio, la bacteria dispone de fotosintatos y aminoácidos como fuentes de carbono, energía y nitrógeno.

2.2. El proceso de nodulación.

El establecimiento de una simbiosis efectiva es un proceso complejo en el que es imprescindible el intercambio de señales específicas entre los simbioses, hecho responsable, en parte, de la alta especificidad de hospedador característica del proceso de nodulación.

La comunicación entre los simbioses comienza con la liberación por parte de la planta de una serie de compuestos contenidos en sus exudados de semilla y raíz, principalmente flavonoides, ácidos aldónicos y betaínas (Morón *et al.*, 2006). La naturaleza y cantidad de estos compuestos exudados es dependiente de la especie vegetal y del estado de desarrollo y fisiológico de la planta. El papel de estas sustancias en la inducción, en su rizobio específico, de la expresión de los genes de nodulación, constituye el primer determinante de especificidad en la interacción. La activación de los genes de nodulación da lugar a la expresión de un conjunto de enzimas encargadas de la producción de los factores Nod, o de nodulación. Los factores Nod son moléculas señal que van a tener un papel fundamental en el inicio del desarrollo del nódulo y en la invasión bacteriana. Están compuestos por un esqueleto básico de quitina (*N*-acetil-*D*-glucosamina) al que se une un ácido graso a través del N del extremo no reductor. Diferentes modificaciones adicionales pueden aparecer en esta estructura básica según la especie de rizobio, así como variaciones en la longitud y el grado de saturación del ácido graso (revisado por Oldroy y Downie, 2008).

El correcto reconocimiento de un factor Nod específico requiere la presencia de los receptores LysM-RLK (del inglés, Lysin Motive Receptor-Like Kinase) específicos de la superficie de las células del pelo radical, y va a determinar la especificidad de la interacción entre el rizobio y su planta hospedadora (revisado por Oldroy y Downie, 2008). Tras la percepción de los factores Nod, se produce la transducción de la señal que conduce a una oscilación de los niveles de calcio en la zona perinuclear de los pelos radicales. Dichos picos en la concentración intracelular de calcio podrían ser los responsables de la inducción de la expresión de diversos genes observada durante los primeros estadios de la nodulación, de ahí que las proteínas que codifican se denominen nodulinas tempranas o ENOD (Early Nodulin). Por otra parte, los factores Nod también tienen la capacidad de inducir la reorganización del esqueleto de actina, la formación de pelos radicales y/o la deformación de los ya existentes, así como la formación del cordón de preinfección en las células del córtex externo, a través del cual se produce el crecimiento del cordón de infección (revisado por Oldroy y Downie, 2008; Morón *et al.*, 2006).

La infección bacteriana comienza con la adhesión del rizobio a la epidemis de la raíz, generalmente a las células del pelo radical (Figura 2.2). La adhesión se ve facilitada por la unión entre las lectinas características de la pared celular de la planta hospedadora con polisacáridos específicos en la superficie de su correspondiente

rizobio. En ese momento, la curvatura del pelo radical atrapa a los rizobios (Figura 2.2), que proliferan produciendo un aumento en la concentración de los factores Nod en el foco de infección. Entonces se produce una inversión en el crecimiento de la punta del pelo radical dando lugar a la formación de un canal intracelular por el que penetran los rizobios formando una columna (Figura 2.2). La iniciación del canal de infección es la principal etapa de selección de la especie bacteriana apropiada, en lo que participa: un elevado grado de especificidad de los factores Nod, una elevada concentración de factores Nod y la presencia de los polisacáridos apropiados en la superficie de la bacteria. Como resultado se seleccionará un solo tipo de bacteria, resultando en una infección clónica (Oldroy y Downie, 2008).

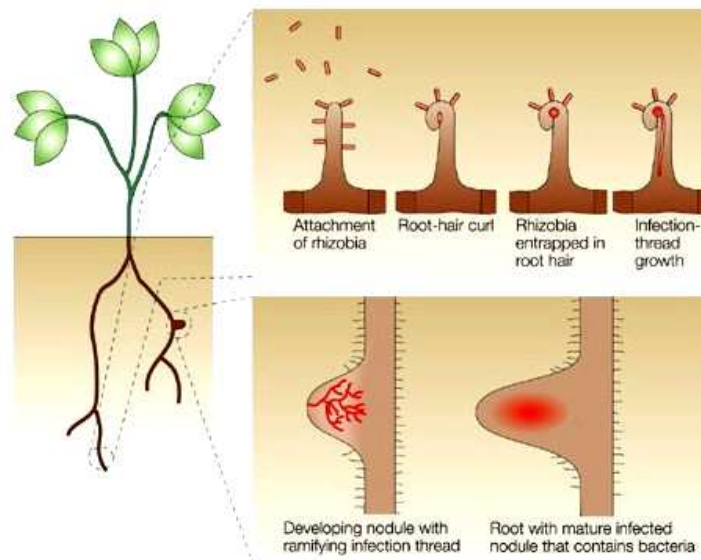


Figura 2.2. Proceso de nodulación (Oldroy y Downie, 2004).

En muchos sistemas simbióticos, simultáneamente a la formación del cordón de preinfección, los factores Nod inducen divisiones de las células del córtex, con la correspondiente formación del primordio nodular, en cuyo interior se desarrollan las estructuras nodulares (Morón *et al.*, 2006; Oldroy y Downie, 2008). Sin embargo, la activación de la nodulación también puede ocurrir en ausencia de factores Nod. En los últimos años se ha demostrado la gran importancia que tienen las hormonas vegetales en el proceso de formación del nódulo, de hecho, los cambios en el córtex asociados con la formación del meristemo del nódulo están dirigidos por una modulación de los niveles hormonales (revisado por Ferguson y Mathesius, 2003).

El crecimiento dirigido de los cordones de infección transporta a los rizobios hasta las células del primordio nodular. Allí los cordones de infección se ramifican y,

mientras continúa el desarrollo del nódulo (Figura 2.2), se produce la liberación de las bacterias en el citoplasma de las células vegetales. Esta liberación es un proceso endocitótico mediante el cual las bacterias quedan rodeadas de una membrana peribacteroidea (MPB) que deriva del retículo endoplasmático y aparato de Golgi de la célula vegetal, quedando así confinadas en una vesícula denominada simbiosoma. Finalmente se produce la diferenciación de las bacterias en formas especializadas, los bacterioides. Simultáneamente con la aparición de simbiosomas, el primordio nodular se convierte en nódulo maduro.

En líneas generales, los nódulos contienen dos zonas, una interna o zona de infección y otra externa o córtex. La zona de infección es muy diferente según se trate de nódulos determinados o indeterminados. En leguminosas de climas tropicales, como es el caso de la soja (*Glycine max*) la división de células del córtex externo da lugar a nódulos de forma esférica o nódulos determinados (Figura 2.3b), en los que la diferenciación de las células infectadas tiene lugar de modo sincrónico (Franssen *et al.*, 1992). En leguminosas de climas templados, la división de las células del córtex interno da lugar a nódulos de forma alargada conocidos como nódulos indeterminados. La existencia de un meristemo persistente en estos nódulos origina un gradiente de etapas de desarrollo (Figura 2.3a): meristemo en el extremo apical (I), la zona de invasión (donde ocurre la división de las células y la infección de éstas por los rizobios que llegan desde los canales de infección) (II), la zona de fijación de N_2 (donde las células contienen bacterioides completamente diferenciados) (III), y el tejido senescente cercano a la raíz (IV) (Vasse *et al.*, 1990). (Revisado por Minchin *et al.*, 2008).

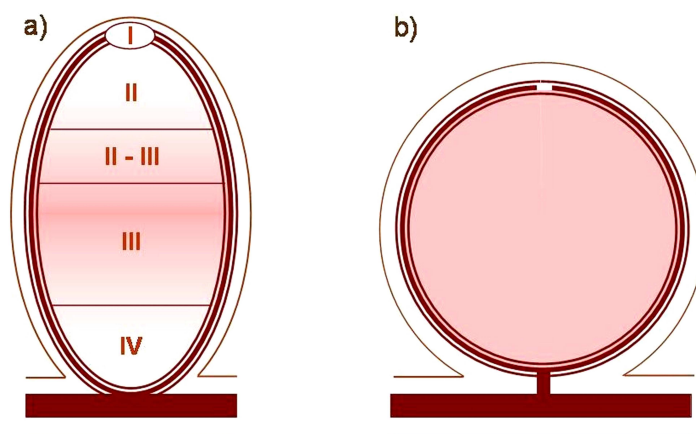


Figura 2.3. Representación esquemática de un nódulo indeterminado (a) y de un nódulo determinado (b) (adaptado de Hadri *et al.*, 1998).

En el córtex se pueden distinguir varias zonas, cuyo grado de diferenciación e incluso, su presencia, varía según la especie de leguminosa. Próximo a la zona de infección se encuentra el córtex interno (o paréquima nodular), en el que se distingue una zona de células pequeñas, a veces, con grandes espacios intercelulares, y otra zona de células muy empaquetadas. El córtex medio contiene células grandes de pared gruesa pero no lignificada. Detrás de éste, en algunos casos, se distingue una capa de células con paredes engrosadas que constituyen la endodermis o esclerénquima. La última capa del nódulo, el córtex externo, contiene células grandes poco empaquetadas, y espacios intercelulares grandes. En algunos casos detrás de éste también se distingue una peridermis. (Revisado por Minchin, 1997; Minchin *et al.*, 2008).

2.3. La nitrogenasa.

La enzima clave de la fijación de N_2 es la nitrogenasa. Esta enzima pudo tener una aparición muy temprana, ya que se cree que estuvo implicada en los comienzos de la vida, en la detoxificación de diferentes sustratos con triples enlaces presentes en la sopa primigenia (Olivares, 2006).

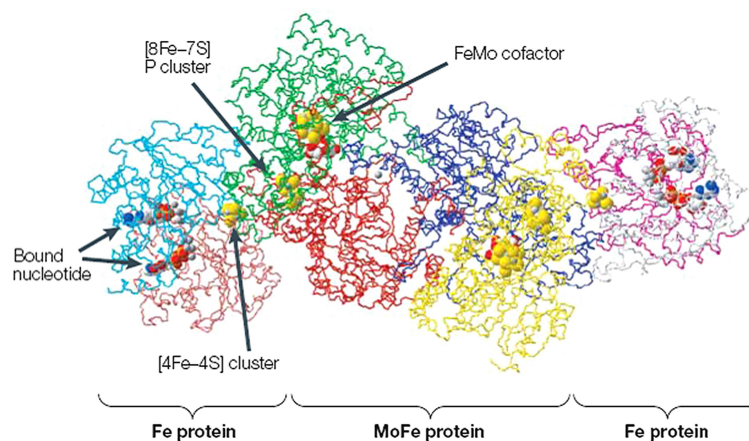
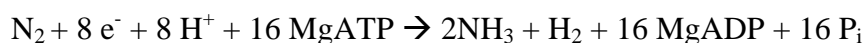


Figura 2.4. Estructura del complejo nitrogenasa de *Azotobacter vinelandii* (Dixon y Kahn, 2004). Las subunidades de los dos dímeros de Fe-proteína aparecen en color azul y marrón, y en color rosa y gris. Para la MoFe-proteína, las subunidades α aparecen en color verde y amarillo, y las subunidades β , en rojo y azul.

Casi todos los diazotrofos tienen una nitrogenasa que consta típicamente de una ferroproteína (Fe-proteína) o nitrogenasa reductasa y de una molibdoferroproteína (MoFe-proteína) o nitrogenasa. Cuando en el medio no hay disponibilidad de molibdeno, algunos diazotrofos, como *Azotobacter vinelandii* o *Rhodobacter*

capsulatus, inducen la síntesis de nitrogenas alternativas que contienen vanadio o hierro en lugar de molibdeno (Eady, 1996, revisado por Dixon y Kahn, 2004). La Fe-proteína es un homodímero de aproximadamente 60 kDa, y está codificada por el gen *nifH*. El núcleo activo de la proteína es el grupo [4Fe-4S] que une las dos subunidades del dímero (Figura 2.4). La MoFe-proteína es un tetradímero $\alpha_2\beta_2$ de aproximadamente 220 kDa, las subunidades α están codificadas por el gen *nifD* y las subunidades β están codificadas por el gen *nifK*. Esta proteína contiene dos tipos de centros metálicos: el cofactor homocitrato-hierro-molibdeno (FeMoco), que es el lugar donde ocurre la reducción del sustrato, y el grupo [8Fe-7S] o grupo P (Figura 2.4).

La reacción estequiométrica de la reducción de N_2 , en condiciones óptimas, es la siguiente:



Esta ecuación química refleja la principal característica de la fijación biológica de N_2 , su elevado coste energético, debido a la gran estabilidad del triple enlace del N_2 .

El mecanismo enzimático requiere la reducción de la Fe-proteína por donadores de electrones como ferredoxina o flavodoxina, la transferencia (dependiente de la hidrólisis de MgATP, magnesio-adenosina-trifosfato) a la MoFe-proteína de electrones, y finalmente, la transferencia interna de electrones en la MoFe-proteína desde el grupo P al FeMoco. Cada paso de transferencia electrónica requiere un ciclo de asociación entre la Fe- y MoFe-proteína para formar un complejo. Una vez oxidada y con el MgADP (magnesio-adenosina-difosfato) acoplado, la Fe-proteína se disocia, se vuelve a reducir y a intercambiar el MgADP por MgATP. Este ciclo se repite hasta que se hayan acumulado los electrones (y protones) suficientes (en el caso del N_2 son 8 e^-) para que los sustratos puedan ser reducidos (Figura 2.5).

Una parte importante del poder reductor que se utiliza para fijar N_2 se pierde en forma de hidrógeno a causa de una reacción colateral e inevitable catalizada por la nitrogenasa. Esto representa una fuente de ineficiencia energética del proceso de fijación, y es especialmente relevante en las simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. Algunos rizobios poseen un sistema hidrogenasa (*hup*) capaz de reoxidar ese hidrógeno y recuperar parte del poder reductor utilizado en su síntesis, mejorando la eficiencia energética del sistema simbiótico (revisado por Imperial *et al.*, 2006).

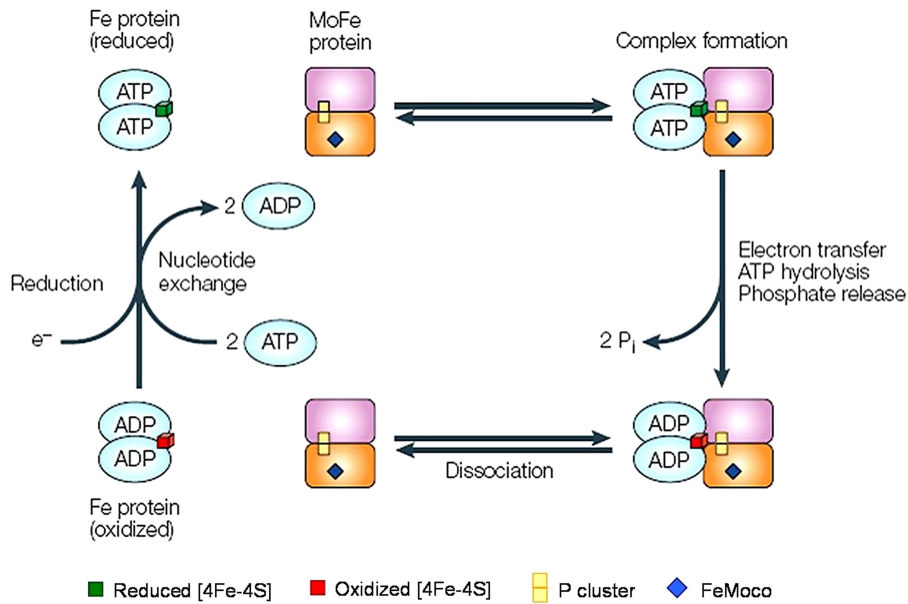


Figura 2.5. Representación esquemática del ciclo de la Fe-proteína (Dixon y Kahn, 2004).

2.4. Genes implicados en la fijación de dinitrógeno.

La caracterización de los genes de la fijación de N_2 en rizobios se realizó tomando como prototipo la bacteria diazotrofa de vida libre *Klebsiella pneumoniae*. Utilizando fragmentos específicos de los genes *nifH* y *nifD* de *K. pneumoniae*, Ruvkun y Ausubel (1980) demostraron que estos genes estaban bien conservados en otros organismos diazotrofos, incluidos los rizobios.

Los genes responsables de la fijación simbiótica de N_2 , en un sentido amplio, pueden dividirse en genes *nod*, *nif*, y *fix* (Fischer, 1994) y suelen localizarse en plásmidos de elevado peso molecular (pSym), excepto en *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* donde su localización es cromosómica, puesto que estas bacterias carecen de plásmidos. Los productos de los genes *nod*, actúan en etapas tempranas de la formación del nódulo (consultar el apartado 2.2). Entre los genes *nif* se incluyen genes estructurales de la nitrogenasa, genes que se requieren para la biosíntesis de la nitrogenasa y genes reguladores. Los genes *fix* son aquellos que, junto con los genes *nif*, son esenciales para la fijación de N_2 en bacterias simbióticas, pero que no tienen su homólogo en *K. pneumoniae*. Entre los genes *fix* se encuentran genes relacionados con el desarrollo y el metabolismo de bacteroides, genes que fueron nombrados como *fix* antes de conocer su función, y que deberían ser renombrados, y genes que fueron identificados originalmente en el contexto de la fijación de N_2 , pero que, además,

intervienen en otros procesos no relacionados con ésta, e incluso están presentes en procariotas que no son diazotrofos (Fischer, 1994).

La mayoría de los genes *nif* y *fix* están organizados en operones que varían de unas especies de rizobios a otras. En *B. japonicum*, los genes *nif* y *fix* están organizados en tres grupos, tal y como se presenta en la Figura 2.6. El Grupo I contiene los genes estructurales de la nitrogenasa, entre otros. En el Grupo II se encuentra el operón *fixRnifA* y *fixA*, y el Grupo III contiene *fixK₂*, *fixLJ*, y los operones *fixNOQP* y *fixGHIS*. El gen *fixK₁*, estaría situado aparte en el Locus IV. Además de éstos, existen otros genes implicados en la fijación de N₂ que se encuentran situados cerca o incluso dentro de esta zona del cromosoma, como *rpoN₁*, *groESL₃* y *ndp* (Fischer, 1994). En los dos siguientes apartados se hablará las funciones conocidas de los genes *nif* y *fix*, y se presenta un resumen de las mismas en la Tabla 1.1.

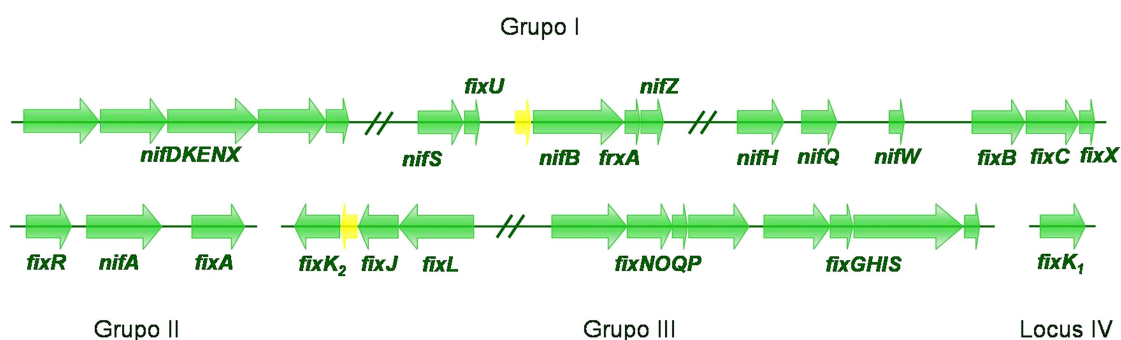


Figura 2.6. Organización de los genes *nif* y *fix* en *B. japonicum* (adaptado de Fisher, 1994 y Kaneko *et al.*, 2002).

Gene	Description	Gene	Description
<i>nifD</i>	Nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain	<i>fixX</i>	Probable ferredoxin
<i>nifK</i>	Nitrogenase molybdenum-iron protein beta chain	<i>fixR</i>	Oxidoreductase
<i>nifE</i>	Nitrogenase molybdenum-cofactor synthesis protein	<i>fixA</i>	Electron transfer flavoprotein beta chain
<i>nifN</i>	Nitrogenase molybdenum-cofactor synthesis protein	<i>fixK₂</i>	Transcriptional regulatory protein Crp family
<i>nifX</i>	Iron-molibdenum cofactor processing protein	<i>fixJ</i>	Two-component response regulator
<i>nifS</i>	Nitrogenase metalloclusters biosynthesis protein	<i>fixL</i>	Two-component oxygen-sensor histidine kinase
<i>nifB</i>	FeMo cofactor biosynthesis protein	<i>fixN</i>	Cytochrome-c oxidase
<i>nifZ</i>	Iron-sulfur cofactor synthesis protein	<i>fixO</i>	Cytochrome-c oxidase
<i>nifH</i>	Dinitrogenase reductase protein	<i>fixQ</i>	<i>cbb₃</i> oxidase, subunit IV
<i>nifQ</i>	Molybdenum processing protein	<i>fixP</i>	<i>cbb₃</i> oxidase, subunit III
<i>nifW</i>	Nitrogenase stabilizing/protective protein	<i>fixG</i>	Iron-sulfur cluster-binding protein
<i>nifA</i>	<i>nif</i> -specific regulatory protein	<i>fixH</i>	FixH protein
<i>fixB</i>	Electron transfer flavoprotein alpha chain	<i>fixI</i>	E1-E2 type cation ATPase
<i>fixC</i>	Flavoprotein	<i>fixS</i>	FixS protein
<i>fixU</i>	Nitrogen fixation protein	<i>fixK₁</i>	Transcriptional regulatory protein Crp family

Tabla 1.1. Resumen de la función conocida de los genes *nif* y *fix* en *B. japonicum* según la información publicada en la Rhizobase (<http://www.kazusa.or.jp/rhizobase>).

2.4.1. Genes *nif*.

Hasta la fecha, se han encontrado 10 genes *nif* con su correspondiente homólogo en *K. pneumoniae*, entre ellos los genes estructurales *nifD*, *nifK* y *nifH* (comentados en el apartado 2.3). Los genes *nifB*, *nifE* y *nifN* son genes requeridos para la biosíntesis del cofactor FeMo. Además, en *Azotobacter vinelandii* se ha purificado una proteína NifS, con actividad cisteína desulfurasa, necesaria para la formación de los grupos metálicos de hierro y azufre que forman parte de la nitrogenasa (Zheng *et al.* 1993), sin embargo, en *B. japonicum*, *nifS* no es indispensable para el funcionamiento de la nitrogenasa, puesto que una cepa mutada en ese gen conserva un 30% de la actividad de esta enzima (Ebeling *et al.*, 1987, revisado por Kaminski *et al.*, 1998), y posiblemente otra enzima pueda sustituir la función de NifS en *B. japonicum*. NifX, identificada en *B. japonicum* (Hennecke, 1990), está anotada como proteína implicada en el procesamiento del cofactor FeMo (Kaneko *et al.*, 2002). La función de NifW no se conoce todavía, pero sí se sabe que es totalmente necesaria para la fijación de N₂ en *Azorhizobium caulinodans* en vida libre y en simbiosis, a diferencia de lo que ocurre en *K. pneumoniae* y *A. vinelandii*, donde sólo se requiere para que la MoFe-proteína alcance su máxima actividad. Kim y Burgess (1996), demostraron que en *A. vinelandii*, NifW se une a la MoFe-proteína para formar un complejo de gran peso molecular, pero sólo en extractos celulares que están expuestos a la presencia de oxígeno, lo cual ha permitido sugerir a estos autores que NifW puede participar en la protección de la MoFe-proteína frente al oxígeno (revisado por Kaminski *et al.*, 1998). Según Kaneko *et al.* (2002), el gen *nifW* codifica una proteína estabilizadora y protectora de la nitrogenasa. Por último el gen *nifA* codifica el activador transcripcional específico de los operones *nif*, del que se hablará en profundidad en el apartado 2.5.2.

2.4.2. Genes *fix*.

Los genes *fixABCX* se identificaron por primera vez en *Sinorhizobium meliloti* (Dusha *et al.*, 1987; Earl *et al.*, 1987). También se han encontrado homólogos de estos genes en *B. japonicum* (Fuhrmann *et al.*, 1985; Gubler *et al.*, 1986), *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Grönger *et al.*, 1987), bv. *trifolii* (Michiels y Vanderleyden, 1993) y *A. caulinodans* (Arigoni *et al.*, 1991). Las cepas mutantes en alguno de estos cuatro genes en *R. meliloti* o *B. japonicum* son incapaces de fijar N₂ en condiciones simbióticas, y en el caso de *A. caulinodans*, también en condiciones de vida libre (revisado por Kaminski *et al.*, 1998). Todavía no se ha asignado una función bioquímica

definitiva para estos genes, pero sus características sugieren que, en conjunto, pueden codificar una cadena de transporte electrónico para la nitrogenasa. La eliminación del transporte electrónico hacia la nitrogenasa conduciría a la inestabilidad de sus dos componentes principales, lo que explicaría la ausencia de actividad nitrogenasa en los mutantes (Fischer, 1994).

Se han localizado dos genes que codifican proteínas similares a ferredoxinas en *S. meliloti* (*fdxN*) y *B. japonicum* (*frxA*), aunque parece que sólo FdxN es necesaria para la fijación simbiótica de N₂ (Ebeling *et al.*, 1988; Klipp *et al.*, 1989). FdxN podría estar involucrada en la transferencia de electrones hacia la nitrogenasa puesto que se ha demostrado que la proteína FdxN de *S. meliloti* puede donar electrones *in vitro* a la nitrogenasa de *Rhodobacter capsulatus* (Riedel *et al.*, 1995, revisado por Kaminski *et al.*, 1998). Recientemente, se ha identificado en *B. japonicum* un gen homólogo a *fdxN*, que es esencial para la fijación simbiótica de N₂, lo que permite proponer que la ferredoxina codificada por dicho gen puede ser el donador de electrones de la nitrogenasa en *B. japonicum* (Hauser *et al.*, 2007)

Los genes *fixNOQP* se han descrito en *S. meliloti* (Boistard *et al.*, 1991), *B. japonicum* (Preisig *et al.*, 1993), *A. caulinodans* (Mandon *et al.*, 1993 y 1994) y *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Hynes *et al.*, 1992). Cuando se deleta este operón, las cepas resultantes de *S. meliloti* o *B. japonicum* son incapaces de fijar N₂ en simbiosis, mientras que en *A. caulinodans* se produce una reducción del 50% de la actividad nitrogenasa tanto en vida libre como en simbiosis. Este operón codifica la citocromo *c* oxidasa de tipo *cbb₃* que se expresa específicamente en condiciones microaeróbicas o anaeróbicas (Preisig *et al.* 1993). Se hablará más en detalle de ella en el apartado 2.6.3.

Los genes *fixHGIS* se han identificado en *S. meliloti*, varios miembros del género *Bradyrhizobium*, *A. caulinodans* y *R. leguminosarum* bv. *viciae* y bv. *phaseoli*. Cepas mutantes de *S. meliloti* en los genes *fixG*, *fixH* o *fixI* son incapaces de fijar N₂, sin embargo en *A. caulinodans*, mutaciones en los genes *fixG* o *fixI* sólo reducen la fijación de N₂, tanto en simbiosis como en vida libre (Fischer, 1994). Se ha sugerido que el operón *fixHGIS* puede intervenir en la captación y en el metabolismo del cobre, elemento necesario para la citocromo *c* oxidasa de tipo *cbb₃* (Preisig *et al.*, 1996b).

Por último, el gen *fixR*, se encuentra situado en un operón junto con *nifA*, y en *B. japonicum* no es esencial para la fijación de N₂ (Thöny *et al.*, 1987). La proteína FixR de *B. japonicum*, podría estar involucrada en la activación e inactivación dependiente del estado redox de la proteína NifA (Fischer, 1994).

2.5. Regulación de la fijación de dinitrógeno.

Una de las principales características de la fijación biológica de N₂ ya se ha comentado en el apartado 1.4 y es su elevado coste energético. Pero además, otra de las características de este proceso es que la nitrogenasa es una enzima extremadamente sensible al oxígeno. La sensibilidad de la nitrogenasa al oxígeno es debida en gran parte a la Fe-proteína, debido a la superficie expuesta de su grupo [4Fe-4S], que une las dos subunidades del dímero (Dixon y Kahn, 2004). Por estos motivos, la fijación biológica de N₂ es un proceso estrechamente regulado en todos los diazotrofos. Los factores que controlan la fijación de N₂ en los diazotrofos van a estar relacionados con su fisiología y ecología. Los fijadores en vida libre reducen N₂ a amonio para su propio metabolismo, por lo que tiene que haber un estrecho acoplamiento entre fijación de N₂ y asimilación de nitrato, siendo la concentración de oxígeno y la disponibilidad de N los principales factores que regulan el proceso. En los diazotrofos simbióticos el factor predominante que regula los genes de la fijación es la concentración de oxígeno (o el ambiente redox) dentro del nódulo. Dado que el bacteroide fijador de N₂ se comporta como un exportador de amonio a la célula vegetal, resulta lógico que la expresión de los genes de la fijación de N₂ no se vea afectada por la disponibilidad de N contrariamente a lo que ocurre en fijadores en vida libre (Dixon y Kahn, 2004).

En Proteobacterias, en general, los genes responsables de la fijación de nitrógeno se encuentran regulados por NifA, un miembro de la familia EBP (del inglés, Enhancer-Binding Protein) (Morett *et al.*, 1993). La proteína NifA fue descrita por primera vez, como un activador transcripcional de los genes *nif*, en *Klebsiella pneumoniae*, y el respectivo gen *nif* fue el primero en ser clonado y secuenciado (Fischer, 1994). En los diazotrofos simbióticos, la transcripción de los genes requeridos para la fijación está controlada por las cascadas reguladoras FixLJ-FixK, y RegSR-NifA (Dixon y Kahn, 2004). Debido a la gran plasticidad de estos sistemas reguladores, incluso entre distintos rizobios, a continuación sólo se procederá a describir en profundidad el modelo de regulación descrito para *B. japonicum* (Figura 2.7).

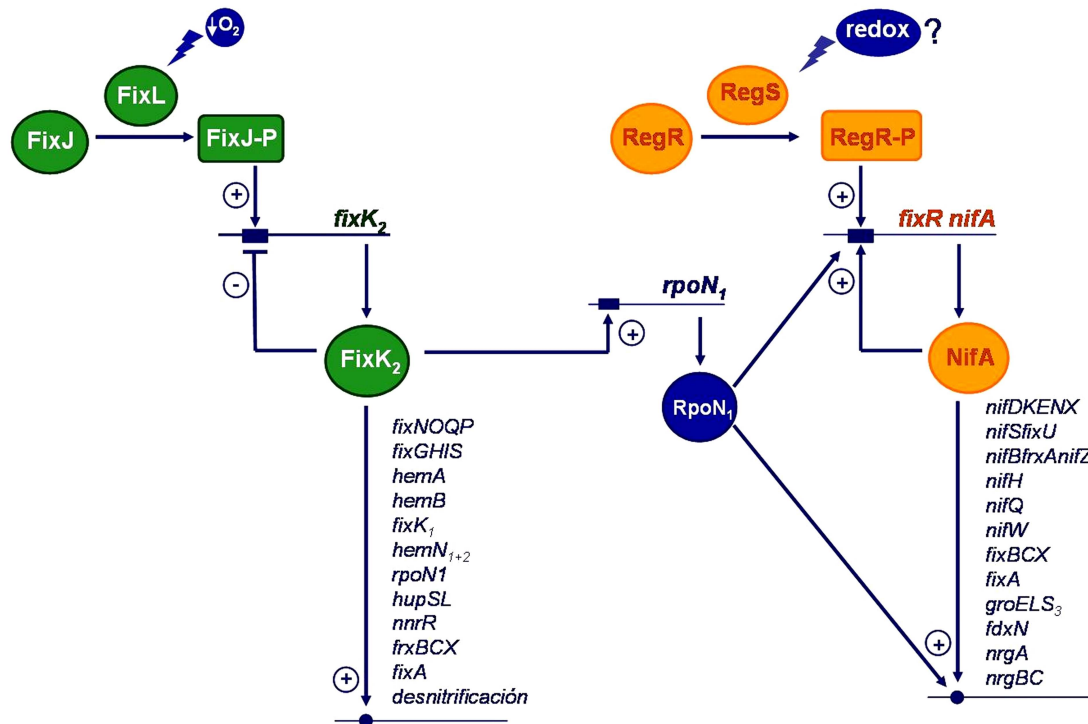


Figura 2.7. Representación esquemática de las dos cascadas reguladoras que controlan los genes requeridos para la fijación de nitrógeno en *B. japonicum* (adaptado de Dixon y Kahn, 2004, Fischer, 1994 y Sciotti *et al.*, 2003).

2.5.1. Sistema FixLJ-FixK₂.

FixL y FixJ constituyen un sistema sensor-regulador de dos componentes implicado en la activación de genes que se expresan en condiciones limitantes de oxígeno (Anthamatten *et al.*, 1992; Gilles-González y González, 1993).

La proteína FixK₂ se incluye en la clase I de la familia de proteínas reguladoras Fnr-Crp (del inglés, fumarate and nitrate reductase-cAMP receptor protein), representada por la proteína Fnr de *Escherichia coli* y que agrupa a proteínas relacionadas con la regulación por oxígeno de diversos procesos celulares (Fischer, 1994). FixK₂ se incluye en el clado FixK de la familia Fnr-Crp, rama que se caracteriza por carecer tanto del motivo de cisteínas del extremo N-terminal como de la cisteína del dominio central de la proteína. Puesto que los reguladores de tipo FixK carecen de mecanismo sensor de la concentración de oxígeno, su actividad depende del sistema regulador de dos componentes denominado FixLJ (Figura 2.7). FixL contiene en su extremo N-terminal el dominio PAS (las siglas se corresponden con las iniciales de las tres proteínas eucarióticas donde fue encontrado este dominio: PER, ARNT y SIM). En el dominio PAS se localiza, de forma invariable, una histidina ligada a un grupo hemo con gran

afinidad por el oxígeno (Gilles-González *et al.*, 1994). En aerobiosis, el oxígeno se une al grupo hemo y FixL es inactiva (Dunham *et al.*, 2003; Tuckerman *et al.*, 2002). La variabilidad en los residuos aminoacídicos del dominio PAS confiere a FixL una gran versatilidad ya que, además de oxígeno, puede unirse a monóxido de carbono y óxido nítrico (revisado por Gilles-González y González, 2005).

En ausencia de oxígeno, FixL se autofosforila por la actividad quinasa de su extremo C-terminal (Gong *et al.*, 1998). La proteína FixL fosforilada activa, a su vez, a la proteína FixJ mediante la transferencia de un grupo fosfato a un aspartato (Tuckerman *et al.*, 2001 y 2002). En *B. japonicum* la proteína FixJ regula directamente la expresión del gen *fixK₂* (Figura 2.7). Además de ser activado por el sistema FixLJ, el gen *fixK₂* es reprimido (directa o indirectamente) por su propio producto (autoregulación negativa; Nellen-Anthamatten *et al.*, 1998). En condiciones microaeróbicas FixK₂ induce la expresión de genes reguladores (*fixK₁*, *nnrR* y *rpoN₁*; Anthamatten *et al.*, 1992; Mesa *et al.*, 2003; Kaneko *et al.*, 2002), genes implicados en la respiración microaeróbica (*fixNOQP* y *fixGHIS*; Preisig *et al.*, 1993 y 1996b), en la biosíntesis de grupos hemo (*hemA*, *hemB*, *hemN₁* y *hemN₂*; Page *et al.*, 1995; Chauchan y O'Brian, 1993), en el metabolismo del hidrógeno (genes *hup*; Durmowicz *et al.*, 1998), y genes implicados en el proceso de desnitrificación (Figura 2.7), del que se hablará con profundidad en el apartado 3 de esta introducción. Recientemente, el análisis del transcriptoma de las mutantes *fixJ* y *fixK₂* ha permitido identificar nuevos genes regulados por el sistema FixLJ-FixK₂ (Mesa *et al.*, 2008).

2.5.2. Sistema RegSR/NifA.

Además del control mediado por la cascada reguladora FixLJ-FixK₂, en *B. japonicum*, se ha descrito otro sistema en respuesta a bajas concentraciones de oxígeno, el sistema RegSR/NifA (Figura 2.7). Esta cascada reguladora es activada a concentraciones de oxígeno mucho más limitantes (<2%) que la cascada iniciada por la proteína FixL.

RegSR pertenece a la familia de sistemas reguladores de dos componentes de respuesta a potencial redox descrita en bacterias. Esas proteínas se denominan RegSR en *B. japonicum* y *Rhodopseudomonas palustris*, RegBA en *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodovulum sulfidophilum* y *Roseobacter denitrificans*, PrrBA en *Rhodobacter sphaeroides*, ActSR en *S. meliloti* y *Agrobacterium tumefaciens* y RoxSR en *Pseudomonas aeruginosa* (Emmerich *et al.*, 2000, Baek *et al.*, 2008, Comolli *et al.*,

2002; Rey *et al.*, 2006). En *B. japonicum*, RegR, actúa sobre el operón *fixR-nifA*, que es el responsable de la síntesis de la proteína NifA (Bauer *et al.*, 1998). Recientes análisis del transcriptoma de una cepa mutante *regR* de *B. japonicum*, han propuesto la existencia de nuevos genes regulados por RegR (Lindemann *et al.*, 2007). El operón *fixR-nifA* se expresa a un nivel basal en condiciones aeróbicas, sin embargo, cuando la concentración de oxígeno disminuye (tal y como ocurre en un cultivo anaeróbico o en el interior del nódulo), la expresión de dicho operón se activa. Este patrón de expresión se debe a la presencia de dos promotores solapados, *fixRp₁* y *fixRp₂*. RegR activa la transcripción del operón a partir del promotor *fixRp₂* de forma constitutiva en condiciones aeróbicas. En condiciones microaeróbicas, la proteína NifA, junto con el factor sigma σ^{54} de la ARN polimerasa, incrementa su propia síntesis mediante la activación del promotor *fixRp₁*. Es en este punto, a través del factor σ^{54} , es cuando las dos cascadas reguladoras se conectan, puesto que la expresión de dicho factor, codificado por el gen *rpoN₁*, es dependiente de FixK₂.

Las dos cascadas que controlan la expresión de los genes relacionados con la fijación simbiótica de N₂ en *B. japonicum* responden manera dispar a la concentración de oxígeno, lo que debe tener implicación en una expresión ordenada, temporal y espacialmente, de los genes simbióticos durante el proceso de infección y formación del nódulo. Estos genes no se expresan cuando *B. japonicum* se encuentra en el suelo, en presencia de oxígeno. Sin embargo, durante la migración por el canal de infección dentro del tejido radical, la bacteria empieza a someterse a una limitación de oxígeno que conduce a la inducción de los genes dependientes de FixLJ-FixK₂, cuyos productos son los responsables de que la bacteria adapte su metabolismo respiratorio al nuevo ambiente microaeróbico. Cuando la concentración de oxígeno dentro del nódulo disminuye hasta un nivel compatible funcionalmente con NifA y con la actividad nitrogenasa, los genes *nif* y *fix* dependientes de NifA son activados (Dixon y Kahn, 2004; Sciotti *et al.*, 2003).

La proteína reguladora NifA de *B. japonicum* contiene 582 aminoácidos y presenta un peso molecular de 63 kDa. NifA es una proteína citoplasmática perteneciente a la familia EBP (Morett *et al.*, 1993). Como otros miembros de esta familia, NifA presenta un dominio central AAA⁺ ATPasa de 240 aminoácidos, flanqueado por un dominio regulador de 194 aminoácidos hacia su extremo N-terminal y un dominio de unión a ADN de 78 aminoácidos hacia su extremo C-terminal (Figura 2.8). El dominio central (catalítico) está implicado en la unión con el factor σ^{54} de la

ARN-polimerasa y el dominio C-terminal presenta un motivo de unión a ADN hélice-giro-hélice, que se requiere para el reconocimiento de los sitios UAS (del inglés, upstream activator sequences). Estos dos últimos dominios se encuentran unidos por el IDL (del inglés, Interdomain Linker) de 36 a 38 aminoácidos en el cual se encuentra un motivo invariable que contiene dos residuos distales de cisteína (Cys-X₄-Cys). La presencia de estos residuos de cisteína parece estar correlacionada con la sensibilidad de esta proteína frente al oxígeno. Todas las cisteínas conservadas son las encargadas de unir covalentemente iones metálicos como Fe₂⁺ mediante los cuales la proteína es capaz de sensar variaciones de oxígeno en el medio y potencial redox (Dixon y Kahn, 2004; Fischer *et al.*, 1994).



Figura 2.8. Representación de la estructura modular de la proteína reguladora NifA (adaptado de Dixon y Kahn, 2004 y Fischer, 1994).

Aparte de regular genes y operones implicados en el proceso de fijación de N₂ de una manera directa como es el caso de los genes *nif* y *fix*, NifA también regula genes implicados de manera indirecta en la fijación de N₂, como es el caso de los genes *groESL₃* que codifican proteínas chaperonas, o genes que no intervienen en dicho proceso como son los genes *nrgA*, *nrgBC* (Fischer, 1994; Nellen-Anthamatten *et al.*, 1998; Sciotti *et al.*, 2003). Con el objeto de conocer e identificar nuevos genes regulados por la proteína NifA, se han utilizado diferentes aproximaciones bioquímicas y genéticas que han permitido la identificación de 13 promotores dependientes de NifA+RpoN y 27 genes asociados a los mismos (Nienaber *et al.*, 2000). Como se ha comentado anteriormente, el análisis del transcriptoma de las mutantes *nifA* y *rpoN* de *B. japonicum* ha permitido identificar nuevos genes regulados por este sistema, entre los que es importante destacar el gen *fdxN* responsable de la síntesis de la ferredoxina simbiótica (Hauser *et al.*, 2007).

2.6. Regulación de la concentración de oxígeno en nódulos.

La nitrogenasa es una enzima extremadamente sensible al oxígeno y es por esto que la mayoría de los diazotrofos han desarrollado una gran diversidad de estrategias

fisiológicas para proteger sus nitrogenasas del oxígeno. Sin embargo, los bacteroides necesitan oxígeno para respirar y obtener la energía necesaria para satisfacer la gran demanda energética requerida por el proceso de fijación de N₂. Además, existe un riesgo potencial de producción de ROS en la zona de infección (Matamoros *et al.*, 2003), de manera que un incremento en la entrada de oxígeno en los nódulos podría superar la protección antioxidante, que es óptima para un ambiente reductor microaeróbico, provocando un daño celular a gran escala y la inactivación de la nitrogenasa (Minchin *et al.*, 2008). En el caso de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, el nódulo es un órgano especializado que reúne las condiciones microaeróbicas adecuadas para asegurar el funcionamiento de la nitrogenasa y la respiración de los bacteroides, y donde el movimiento y la concentración de oxígeno se encuentra regulado por varios mecanismos.

2.6.1. La barrera de difusión de oxígeno.

Existen numerosas evidencias acerca de la presencia de una barrera de difusión de oxígeno (BDO) en nódulos. En esta barrera parecen participar distintos mecanismos en diferentes zonas del nódulo, como son la presencia de oclusiones en los espacios intercelulares del córtex medio, un mecanismo osmótico en el córtex interno, y un mecanismo de control de la difusión de oxígeno más fino que ocurre en la zona de infección (revisado por Minchin, 1997 y Minchin *et al.*, 2008).

En 1989, VandenBosch y colaboradores, mediante el uso de diferentes anticuerpos monoclonales (MAC204, MAC236 y MAC265), detectaron la presencia de oclusiones en los espacios intercelulares de nódulos de soja y lupino. Cada uno de los anticuerpos utilizados reconocía diferentes espítospos contenidos en una glucoproteína de 95 kDa, que formaba una matriz de glucoproteína (MGP) (Rae *et al.*, 1991; VandenBosch *et al.*, 1989). Además, la expresión del antígeno reconocido por MAC265 era particularmente intensa en los espacios intercelulares del córtex medio de nódulos de guisante, y la oclusión de estos espacios intercelulares debida a la presencia de la MGP incrementaba con el aumento de la presión de oxígeno (James *et al.*, 1991). Estas observaciones se confirmaron posteriormente mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Iannetta *et al.*, 1993). También se ha demostrado la presencia de antígenos reconocidos por MAC236 y MAC265 en nódulos pertenecientes a un extenso número de especies de leguminosas dentro las tres subfamilias (James *et al.*, 1994). Aunque la MPG sea la más estudiada, también se ha demostrado la presencia

de otros materiales en las oclusiones, como pueden ser las lectinas en cacahuete y alfalfa, proteínas ricas en prolina en guisante, e isoflavonas dipreniladas en lupino, entre otros compuestos (revisado por Minchin, 1997 y Minchin *et al.*, 2008). Además, se han localizado proteínas ricas en hidroxiprolina, codificadas por la nodulina temprana *ENOD2*, en las paredes celulares y en los espacios intercelulares de nódulos de judía (Bonilla *et al.*, 1997) y alfalfa (Wycoff *et al.*, 1998), lo que sugiere que forman parte del material que ocluye dichos espacios (revisado por Minchin, 1997). Sin embargo, no se observan cambios en la concentración y la expresión de *ENOD2* en nódulos de alfalfa sometidos a diferentes presiones de oxígeno, y todavía no se ha estudiado el efecto de los cambios de la presión de oxígeno en la expresión de los otros materiales que forman parte de las oclusiones (revisado por Minchin *et al.*, 2008).

Aparte de la presencia de oclusiones intercelulares, se ha propuesto que la BDO también opera a través de un mecanismo osmótico por el cual se produce un rápido colapso de las células del córtex interno para reducir el tamaño de los espacios intercelulares e incrementar la BDO (revisado por Minchin, 1997 y Minchin *et al.*, 2008). Este fenómeno se ha observado en nódulos de lupino y soja (Iannetta *et al.*, 1995; Serraj *et al.*, 1995). En los sistemas biológicos, el movimiento de agua suele estar asociado al movimiento de iones, de manera que se ha detectado movimiento de iones por medio de microanálisis de rayos X en nódulos de soja congelados (Minchin *et al.*, 1995). Trabajos posteriores han demostrado que cuando los nódulos de soja reciben tratamientos que normalmente disminuyen la permeabilidad del nódulo se produce un aumento de la razón $[K^+]_{\text{cortex}} : [K^+]_{\text{zona de infección}}$, mientras que tratamientos que aumentan la permeabilidad del nódulo se asocian con una disminución de esta razón (Wei y Layzell, 2006). Por otro lado, muchas enzimas relacionadas con la asimilación de carbono y N, como la anhidrasa carbónica (CA) y la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), se localizan en el córtex interno y en la zona de infección, por lo que varios autores han sugerido que pueden estar implicadas en el funcionamiento de la BDO (revisado por Minchin *et al.*, 2008). En nódulos de alfalfa, la expresión de uno de los genes (*MscA1*) que codifican la CA se correlaciona de manera inversa con la presión de oxígeno presente en el exterior del nódulo (Gálvez *et al.*, 2000). Además, se ha detectado actividad CA en nódulos de varias leguminosas, y se ha inmunolocalizado la proteína *MscA1* en la zona de infección y en el córtex interno de nódulos determinados e indeterminados (Atkins *et al.*, 2001). Ambos autores han sugerido que el malato producido por la enzima PEPC puede ser un soluto implicado en la osmoregulación y

proponen que la CA produciría bicarbonato (HCO_3^-), sustrato necesario para la producción de malato via PEPC (revisado por Minchin *et al.*, 2008).

Existen datos consistentes que demuestran la existencia de una BDO relacionada con la zona de infección. Por un lado se han propuesto modelos matemático basados en la respiración mitocondrial y en la difusión de oxígeno por medio de la leghemoglobina (revisado por Minchin *et al.*, 2008). También se ha detectado la existencia de oclusiones de glicoproteínas, lectinas e isoflavonas dipreniladas en los espacios intercelulares de las células infectadas. Todos estos materiales podrían estar involucrados en reacciones cruzadas de oxidación para dar lugar a una matriz rígida, de manera que tales reacciones estarían catalizadas por H_2O_2 , ROS que se ha detectado en pequeñas concentraciones en las células infectadas (revisado por Minchin *et al.*, 2008). Además, en respuesta a tratamientos que inducen el cierre de la BDO, se observa un aumento de la carga de adenilatos en la fracción vegetal y un descenso de la misma en los bacteriodes, por lo que se ha sugerido que los adenilatos actúan como moléculas señal del control de la difusión de oxígeno en células infectadas, posiblemente mediante la activación de bombas de iones, lo que a su vez, estaría relacionado con los cambios de la concentración de K^+ en el córtex (Wei y Layzell, 2006) (revisado por Minchin *et al.*, 2008).

2.6.2. La leghemoglobina.

La leghemoglobina (Lb) es una hemoproteína monomérica de 16 kDa, que presenta una homología elevada con la mioglobina. La Lb está constituida por un grupo hemo (protoporfirina IX, un anillo tetrapirrólico que contiene un átomo de Fe) y la apoproteína, que en este caso es una globina. Hasta la fecha, está establecido que la globina es sintetizada en los ribosomas de las células infectadas (Jensen *et al.*, 1981), sin embargo la procedencia del grupo hemo no es tan clara y todavía es objeto de debate. El ácido δ -aminolevulíco (ALA) es el precursor de todos los tetrapirroles celulares. La ruta de síntesis de ALA en rizobios es diferente a la que se ha descrito para la planta. En 1986, Gerinot y Chelm demostraron que las plantas de soja inoculadas con una cepa de *B. japonicum* que no expresa el gen *hemA*, que codifica la enzima δ -aminolevulíco sintasa son capaces de sintetizar Lb. Posteriormente, Sangran y O'Brian (1991) demostraron que en dichas mutantes, la planta suministra el ácido δ -aminolevulíco a los bacteriodes, donde tiene lugar la síntesis del grupo hemo. Estos resultados demostraron por primera vez que los dos simbioses cooperan en la misma

ruta metabólica (revisado por Becana *et al.*, 1995). En trabajos posteriores se han caracterizado otros genes implicados en la síntesis del grupo hemo en *B. japonicum*, como *hemB* (que codifica la ALA deshidratasa; Chauhan y O'Brian, 1993), *hemH* (que codifica la ferroquelatasa; Frustaci y O'Brian, 1992), y *hemN₂* (que codifica la coproporfirinógeno III deshidrogenasa, Fischer *et al.*, 2001), y además se ha demostrado que estos genes sí son esenciales para la fijación simbiótica de N₂. En 1998, Santana y colaboradores demostraron que en nódulos hay más transcritos de la enzima coproporfirinógeno III oxidasa (que interviene en los pasos finales de la ruta de síntesis de grupo hemo en plantas) en comparación con raíces de soja, y que varias enzimas implicadas en la síntesis del grupo hemo (entre ellas coproporfirinógeno III oxidasa) presentan una actividad más elevada en las células infectadas de soja y guisante, por lo que sugieren la implicación de la planta en la síntesis del grupo hemo (Santana *et al.*, 1998). Estos autores también sugieren que el hecho de que rizobios que presentan mutaciones en alguno de los genes *hem* sean incapaces de desarrollar nódulos funcionales se podría deber a que el grupo hemo se requiere como señal para la inducción de genes de la planta necesarios en las últimas etapas del desarrollo y función de los nódulos.

La Lb es la proteína predominante en nódulos (~300 µM, y en los nódulos muy activos su concentración es 2-3 mM; Davies *et al.*, 1999) y su principal función es actuar de tampón frente al oxígeno y transportarlo a través del citosol de las células infectadas hasta la membrana de los simbiosomas (MPB) a concentraciones compatibles con la actividad nitrogenasa y la respiración de los bacteroides. Esta proteína es esencial para que ocurra la fijación simbiótica de N₂ puesto que se ha demostrado que el silenciamiento de la expresión de la Lb en nódulos de *Lotus japonicus* (por medio de ARN de interferencia, LbRNAi) provoca incremento de la concentración de oxígeno, disminución de la razón ATP/ADP, ausencia de la nitrogenasa de los bacteroides y ausencia de fijación de N₂ (Ott *et al.*, 2005). Recientemente, un análisis transcriptómico de los nódulos procedentes de plantas LbRNAi ha revelado que muchos genes, tanto de la bacteria como de la planta, se encuentran regulados de manera diferente en comparación con los nódulos procedentes de las plantas control. Entre éstos, se encuentran los genes *fix* y *nif* de la bacteria (consultar apartado 2.4) y genes implicados en el metabolismo primario y secundario de la planta (Ott *et al.*, 2009).

La Lb presenta una afinidad por el oxígeno muy elevada y se une de forma reversible a éste. Para que la Lb pueda liberar el oxígeno a disposición de la cadena

respiratoria de los bacteroides, es necesario que la oxidasa del bacteriote tenga una mayor afinidad por el oxígeno que la propia Lb. De manera que la Lb se oxigena a nivel del plasmalema y transporta el oxígeno hacia la membrana del simbiosoma, donde tiene lugar la liberación del mismo. Esta liberación ocurre gracias al gradiente de oxígeno que existe entre la membrana del simbiosoma y los bacteroides, que respiran el oxígeno de manera muy activa (consultar el apartado 2.6.3) (revisado por Becana *et al.*, 1995).

Para que la Lb se pueda unir al oxígeno es necesario que se encuentre en su forma reducida (Lb^{2+}). Cuando esta forma se oxida (Lb^{3+}), posiblemente debido a la presencia de ciertos metabolitos en el nódulo como nitrito, superóxido o peróxido de hidrógeno, es incapaz de unirse al oxígeno. En nódulos, tanto la autooxidación de la LbO_2 , como la respiración de los bacteriotes y mitocondrias pueden originar superóxido o peróxido de hidrógeno. Se han sugerido distintos mecanismos por los que la Lb^{3+} se puede reducir, como son la presencia de una enzima reductasa específica (FLbR, Ferric Lb Reductase), o de las flavinas en presencia de NADH y NAD(P)H. (revisado por Becana y Klukas, 1992 y Becana *et al.*, 1995).

Tal y como se ha comentado, existe un patrón secuencial en la inducción de los genes relacionados con la fijación de N_2 en respuesta a un descenso gradual de la concentración de oxígeno en el nódulo (Sciotti *et al.*, 2003). En este sentido se ha demostrado que los genes que codifican la Lb se inducen en etapas tempranas de la interacción simbiótica, días antes de que comience la fijación de N_2 . La expresión de la Lb en etapas tempranas de la simbiosis puede estar relacionada con su función como transportadora de oxígeno, o con nuevas funciones desconocidas hasta el momento (Downie, 2005). De hecho, sólo el 20-35% de la Lb presente en el nódulo se encuentra unida a oxígeno (Appleby, 1984; Becana y Klukas, 1992), lo que sugiere que la Lb restante puede estar cumpliendo otras funciones en el nódulo. Estudios *in vitro* han demostrado que la Lb puede unirse tanto NO como peroxinitrito (Herold y Puppo, 2005a y 2005b). En el apartado 4.3.1 se hablará en profundidad de este aspecto.

2.6.3. La cadena respiratoria del bacteriote.

La oxidación de los ácidos orgánicos, procedentes de la planta hospedadora, en los bacteriotes produce el ATP necesario para la reducción de N_2 mediante el proceso de fosforilación oxidativa acoplado a la cadena de transporte de electrones que utiliza oxígeno como aceptor final de electrones. Como consecuencia de la presencia de la BDO y de la Lb, la concentración de oxígeno disponible para la respiración bacteriotal es

extremadamente baja (entre 3 y 22 nM; Witty y Minchin, 1990; Hunt y Layzell, 1993), por lo que los bacteroides expresan una cadena de transporte de electrones específica para el estado simbiótico, cuya oxidasa terminal de tipo *cbb₃* presenta una elevada afinidad por oxígeno.

La citocromo *c* oxidasa de hemo-cobre *cbb₃* está ampliamente distribuida en Proteobacterias pero su presencia no se restringe a ese grupo. Los genes que codifican el complejo *cbb₃* fueron aislados inicialmente en especies de rizobios y denominados *fixNOQP* por su requerimiento en la fijación simbiótica de N₂ (Batut *et al.*, 1989; Mandon *et al.*, 1994; Preisig *et al.*, 1993). Desde entonces se han identificado genes homólogos en bacterias no fijadoras de N₂ y se han denominado *ccoNOQP*.

El gen *fixN* codifica la subunidad catalítica, FixN, que es una proteína de aproximadamente 61 kDa asociada a la membrana. Presenta 14 α -hélices hidrofóbicas, 12 de ellas transmembrana, con 12 residuos de histidina conservados (Zufferey *et al.*, 1996b y 1998). Esta organización es similar a la que presenta la subunidad I de las oxidosas de hemo-cobre. La oxidasa de tipo *cbb₃* carece de subunidades II y III típicas, las cuales son sustituidas por los citocromos de tipo *c*, FixO y FixP. FixO lleva asociado un grupo hemo *c* y FixP, dos. FixO y FixP son proteínas transmembrana de 27 y 31 kDa, respectivamente. FixP es la subunidad que media en el transporte de electrones entre el complejo *bc₁* y el núcleo estructural de la oxidasa, formado por las subunidades FixN-FixO. El papel de la proteína de 6 kDa, FixQ, no se conoce y es prescindible para la actividad de la oxidasa (Preisig *et al.*, 1993, Zufferey *et al.*, 1996a).

En los bacteroides de *B. japonicum*, se ha demostrado la presencia de la oxidasa *cbb₃*, con una afinidad muy elevada por el oxígeno ($K_m = 7$ nM). Esta oxidasa es la responsable de mantener la respiración y garantizar la óptima utilización del oxígeno dentro del bacteroide (Preisig *et al.*, 1993; Preisig *et al.*, 1996a). El estudio de la capacidad de mutantes respiratorias de *B. japonicum* para formar simbiosis efectivas (fenotipo Fix⁺), permitió establecer cuales de los genes que codifican los componentes de las cadenas respiratorias en vida libre eran esenciales para la fijación de N₂. De esta forma se demostró que el complejo *bc₁*, (genes *fbcFH*) es uno de los componentes de la cadena respiratoria de los bacteroides (Thöny-Meyer *et al.*, 1989). El complejo *bc₁* cedería los electrones a la oxidasa *cbb₃*. Las cepas mutantes de *B. japonicum*, obtenidas mediante inserciones en los genes *fixN*, *fixO* o *fixP*, inoculadas en plantas de soja son incapaces de fijar N₂ (Preisig *et al.*, 1993). Una cepa mutante con una delección en el gen *fixQ* presenta

un fenotipo Fix⁺ (Zufferey *et al.*, 1996), por lo que FixQ no parece ser una subunidad esencial para la formación del complejo.

La regulación de la expresión del operón *fixNOQP* de *B. japonicum*, se ha estudiado mediante la construcción de fusiones de los promotores de dichos genes al gen informador *lacZ*. Tras el análisis de la expresión génica en mutantes alteradas en los genes *fixL*, *fixJ* y *fixK₂*, se observó una clara inhibición de la expresión de dichos genes en condiciones microaeróbicas (Preisig *et al.*, 1993, 1996a). Se ha demostrado que FixK₂ es esencial para la activación del operón *fixNOQP* mediante experimentos de transcripción *in vitro* mediante la proteína FixK₂ purificada (Mesa *et al.*, 2005), por lo que se propone a la proteína FixK₂ como el regulador transcripcional de la expresión de los genes *fixNOQP* de *B. japonicum* en respuesta a condiciones limitantes de oxígeno. Dicho regulador forma parte de la cascada reguladora FixLJ-FixK₂ de *B. japonicum* (consultar el apartado 2.5.1).

3. Desnitrificación.

3.1. Introducción a la desnitrificación.

La desnitrificación es un proceso clave en el ciclo biogeoquímico del N en la biosfera, ya que es el mecanismo mediante el cual se devuelve a la atmósfera el N₂ fijado (Figura 2.1). Este proceso es el mecanismo principal para eliminar el exceso de nitratos que, como consecuencia del abuso en la utilización de fertilizantes nitrogenados en la práctica agrícola, contaminan los ecosistemas terrestres y acuáticos. Como se ha mencionado en el apartado 2.1, la contaminación de acuíferos por nitratos y nitritos es un grave problema con repercusiones en la salud pública ya que el consumo de agua contaminada por nitratos o nitritos origina la aparición de cáncer de aparato digestivo y de metahemoglobinemia. El óxido nítrico y el óxido nitroso, productos intermediarios de la desnitrificación, tienen también un enorme impacto sobre la contaminación atmosférica, ya que son gases que se liberan a la atmósfera e intervienen en la formación de la lluvia ácida, en el calentamiento global de la atmósfera, y en la destrucción de la capa de ozono de la misma. La desnitrificación tiene, por tanto, un gran impacto en la agricultura, medioambiente y salud humana (Delgado y Bedmar, 2006).

La desnitrificación es una forma alternativa de respiración por la que, en condiciones limitantes de oxígeno, los microorganismos pueden utilizar el nitrato y sus óxidos de nitrógeno derivados (NO_x) como aceptores de electrones en una cadena de transporte hasta la formación de N₂. La reducción de los NO_x está acoplada a la producción de ATP, lo que permite a la célula crecer en ausencia de oxígeno.

La capacidad de desnitrificar está muy extendida en los procariotas y abarca a bacterias que pertenecen taxonómicamente a varias subclases de Proteobacterias, y a las Arqueobacterias (Zumft, 1997). Aunque la desnitrificación es una característica propia de las bacterias anaerobias facultativas, y se considera que sólo ocurre en ausencia de oxígeno, se han descrito algunas especies del género *Paracoccus* capaces de desnitrificar en condiciones aeróbicas (Stouthamer *et al.*, 1997). Igualmente, se ha demostrado la existencia de genes implicados en la desnitrificación en bacterias nitrificantes (Cebren y Garnier, 2005; DiSpirito *et al.*, 1985). Además, algunos hongos, como los del género *Fusarium* tienen también capacidad de desnitrificar (Kobayasi *et al.*, 1995; Takaya 2002).

La reducción anaeróbica del nitrato ocurre en dos etapas sucesivas: respiración y desnitrificación. En anaerobiosis, el nitrato (NO₃⁻) puede sustituir al oxígeno como aceptor final de electrones para dar lugar a la formación de nitrito (NO₂⁻), a partir del cual se inicia la desnitrificación, proceso mediante el cual el nitrito se transforma primero en óxido nítrico (NO), luego en óxido nitroso (N₂O) y, posteriormente en N₂:



Estas reacciones tienen lugar secuencialmente por la actuación de las enzimas nitrato reductasa (Nap/Nar), nitrito reductasa (CuNir/cd₁Nir), óxido nítrico reductasa (qNor/cNor) y óxido nitroso reductasa (Nos), codificadas por los genes *nap/nar*, *nirK/nirS*, *cnor/qnor* y *nos*, respectivamente. Aunque la reducción de nitrato inicia la desnitrificación, se considera que la reducción de nitrito a NO es, en sentido estricto, la reacción clave que define el proceso, ya que la reducción de nitrato también puede ocurrir en microorganismos no desnitrificantes. De hecho, *Escherichia coli*, una de las bacterias donde más se ha estudiado la fisiología, bioquímica y genética de la respiración del nitrato, es incapaz de desnitrificar.

3.1.1. Nitrato reductasas.

La reducción del nitrato en bacterias se lleva a cabo con tres fines diferentes: como fuente de N para su crecimiento (asimilación), para la obtención de energía cuando el nitrato actúa como aceptor final de electrones (respiración), y para la disipación del exceso de poder reductor y optimizar el crecimiento en ciertas condiciones metabólicas (desasimilación). En estos tres procesos intervienen, respectivamente, tres tipos de nitrato reductasas diferentes: la nitrato reductasa citoplásmica asimilatoria (Nas), la nitrato reductasa respiratoria de membrana (Nar) y la nitrato reductasa periplásmica (Nap).

La reducción asimilatoria del nitrato da lugar a nitrito, el cual se reduce posteriormente a amonio, que, vía glutamina sintetasa/glutamato sintasa, da lugar a la formación de aminoácidos y proteínas. Existen dos tipos de nitrato reductasas asimilatorias: las que dependen de NADH y las que dependen de ferredoxina o flavodoxina. El primer grupo está constituido por proteínas formadas por dos subunidades codificadas por los genes *nasA* y *nasC*, y se han identificado en bacterias tales como *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Rhodobacter capsulatus*. Dentro del segundo grupo, se encuentran las nitrato reductasas de *Azotobacter vinelandii* y *Synechococcus* sp., entre otras. Estas enzimas están formadas por una única subunidad de 75 a 85 kDa, a excepción de *A. Vinelandii*, que es un polipéptido de 105 kDa. (Revisado por Moreno-Vivián y Flores, 2007).

La nitrato reductasa respiratoria de membrana se ha estudiado ampliamente en *E. coli* y está formada por tres subunidades, α , β y γ . La subunidad α corresponde a NarG, de 140 kDa, que contiene un cofactor de molibdeno y es la subunidad catalítica. La subunidad β corresponde a la proteína NarH, de 60 kDa, que se asocia en el citoplasma junto a NarG, y ambas se unen a la subunidad γ ; NarI, por el dominio transmembrana de ésta, localizado en su región C-terminal. Las proteínas Nar están codificadas por el operón *narGHJI*. Los genes *narG*, *narH* y *narI* codifican las distintas subunidades, y el gen *narJ* codifica una chaperona implicada en el proceso de maduración de la enzima. El operón *narGHJI* está conservado en distintas especies, de este modo aparecen organizaciones génicas similares en *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas stutzeri* y *B. subtilis*, entre otros. *E. coli* posee el operón *narZYWV* que codifica una nitrato reductasa, enzima con función similar a la

del producto del operón *narGHJI*. (Revisado por Richardson *et al.*, 2007; van Spanning *et al.*, 2005).

Mientras que la nitrato reductasa respiratoria de membrana se expresa únicamente en condiciones limitantes de oxígeno, la nitrato reductasa periplásmica (Nap) puede ser activa en presencia de oxígeno. Las enzimas Nap se han estudiado en *P. denitrificans*, *Paracoccus pantotrophus*, *E. coli*, *Rhodobacter sphaeroides* y *Pseudomonas putida*, entre otros microorganismos. Las enzimas Nap son heterodímeros formados por una subunidad catalítica de 90 kDa (NapA) y un citocromo *c* con dos grupos hemo y tamaño molecular de 15 kDa (NapB), codificadas por los genes *napA* y *napB*, respectivamente. Además de las subunidades estructurales, se ha identificado la proteína NapC, que es otro citocromo *c*, de 25 kDa con cuatro grupos hemo y unido a la membrana, codificada por el gen *napC*. La proteína NapC es la encargada de transferir electrones a la subunidad NapB. Los genes *napA*, *napB* y *napC* se encuentran agrupados con otra serie de genes que codifican proteínas adicionales necesarias para la síntesis y actividad enzimática, operones cuya organización difiere entre diferentes taxones. Un primer tipo corresponde al operón *napFDAGHBC*, presente en *Magnetospirillum magnetotacticum*, de la subdivisión α de las Proteobacterias, y en *E. coli*, y *Haemophilus influenzae*, entre otros, de la subdivisión γ . Un segundo tipo, corresponde al operón *napEFDABC*, descrito en miembros de la subdivisión α , como *R. sphaeroides*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Sinorhizobium meliloti*, y en la subdivisión γ , como *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas* sp. G-179. Un tercer tipo, corresponde al operón *napFGDABC*, como el que se ha descrito en las γ proteobacterias *Vibrio cholerae* y *Yersinia pestis*. Se han postulado una serie de hipótesis acerca del papel fisiológico de esta enzima. Se ha demostrado que la enzima participa en la desnitrificación aeróbica y en los procesos de control del balance redox intracelular, disipando el exceso de poder reductor que se genera en ciertas condiciones metabólicas, como el crecimiento fototrófico, o el metabolismo de fuentes de carbono muy reducidas. Además de esta función, se ha descrito que la enzima puede desempeñar una función similar a la de Nar, acoplando la reducción del nitrato a la producción de ATP, lo que ocurre en *Pseudomonas* sp. G-179 (posiblemente una especie de *Rhizobium*) (Bedzyk *et al.*, 1999) y en *Bradyrhizobium japonicum* (Delgado *et al.*, 2003). Se puede obtener más información sobre la fisiología, bioquímica y genética de las enzimas Nap en las revisiones de van Spanning *et al.* (2005), González *et al.* (2006) y Richardson *et al.* (2007).

3.1.2. Nitrito reductasas.

En bacterias desnitrificantes se han caracterizado dos tipos de nitrito reductasas: una enzima homodimérica con grupos hemo *c* y hemo *d*₁ (NirS, tipo *cd*₁) y una enzima homotrimérica con átomos de cobre (NirK, tipo Cu). Ambas, son proteínas periplásmicas, reciben electrones desde un citocromo *c* y/o de una pseudoazurina, y catalizan la reducción monoeléctrica de nitrito a NO.

Las nitrito reductasas de cobre son complejos homotriméricos de 108 kDa (3 x 36 kDa) que contienen tres centros de cobre azul-verde de tipo I implicados en la transferencia de electrones desde un donador al sitio activo de la enzima, y tres centros de cobre tipo II que forman el centro activo. Esta enzima está codificada por un único gen, al que se denomina *nirK*. Este gen se ha clonado y secuenciado en *Alcaligenes xylooxidans*, *Achromobacter cycloclastes*, *R. sphaeroides*, *Pseudomonas aureofaciens*, y algunas especies de rizobios como *Pseudomonas* sp. G-179 (Bedzyk *et al.*, 1999), *Rhizobium sullae* (Toffanin *et al.*, 1996), *S. meliloti* (Barnett *et al.*, 2001), y *B. japonicum* (Velasco *et al.*, 2001). El gen *nirK* suele localizarse aislado en el genoma, sin formar parte de ningún operón, y sin que en las proximidades se hallen genes relacionados con la desnitrificación. (Revisado por Rinaldo y Cutruzzolá, 2007; van Spanning *et al.*, 2005).

En contraste con la sencilla organización de *nirK*, los genes que codifican las nitrito reductasas tipo *cd*₁ forman parte de operones complejos en los que se encuentran genes implicados tanto en la síntesis como en el procesamiento de los grupos hemo que formarán el centro activo de la enzima. El número y organización de los genes *nir* difiere según las distintas especies. Los mejores caracterizados son los de *P. aeruginosa*, *P. denitrificans* y *P. stutzeri*. Las nitrito reductasas tipo *cd*₁ son homodímeros (120 kDa en su forma dimérica), y cada monómero presenta un dominio de unión a un grupo hemo *c* y a un hemo *d*₁ que actúa como centro activo de la enzima. (Revisado por Rinaldo y Cutruzzolá, 2007; van Spanning *et al.*, 2005).

3.1.3. Óxido nítrico reductasas.

Actualmente, se han caracterizado tres óxido nítrico reductasas (Nors) en bacterias: cNor, qNor y qCu_ANor. Las Nors mejor estudiadas son las cNor de bacterias Gram-negativas como *P. stutzeri*, *P. denitrificans* y *Paracoccus halodenitrificans*. En general, la cNor utiliza, como donadores de electrones, citocromos *c* de membrana o solubles y proteínas azules de cobre (azurinas y pseudoazurinas). La qNor puede utilizar

ubihidroquinona (QH₂) y menahidroquinona (MQH₂), en Arqueas desnitrificantes y bacterias del suelo, y también en microorganismos patógenos tales como *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Corynebacterium diphtheriae*, que no desnitrifican. Tanto en *Neisseria* como en la cianobacteria *Synechocystis*, la qNor tiene un papel detoxificante. Un tercer tipo de Nor se ha encontrado en la bacteria Gram-positiva *Bacillus azotoformans*. Esta Nor, denominada qCu_ANor, utiliza como donadores de electrones MQH₂ y el citocromo soluble *c*₅₅₁. Se ha sugerido que la función de la MQH₂ como donador de electrones a la qCu_ANor está relacionada con destoxicación, por lo que se asemeja a lo que ocurre con la qNOR, sin embargo, el citocromo *c*₅₅₁ interviene en una ruta de función bioenergética, como en el caso de cNor.

La enzima cNor se ha purificado y caracterizado en *P. stutzeri*, *P. denitrificans* y *R. sphaeroides*. En todos los casos se trata de una enzima unida a membrana, compuesta por dos subunidades, una de 17 kDa con un citocromo *c*, y una de 53 kDa, que contiene dos citocromos *b* y un átomo de hierro no hémico, llamadas NorC y NorB, respectivamente. Los electrones se transfieren del citocromo *c* al citocromo *b* y, finalmente, al centro activo, donde se reducen dos moléculas de NO al mismo tiempo. Los genes responsables de la síntesis de las enzimas cNor están agrupados en operones, cuya organización presenta ciertas diferencias entre los organismos desnitrificantes. La organización característica la encontramos en *Nitrosomonas europaea* y *R. sphaeroides*, que presentan el operón *norCBQD*. Los genes *norC* y *norB* codifican las subunidades NorC y NorB, respectivamente. El gen *norQ* codifica una proteína citoplasmática que contiene un motivo de unión a ATP, y *norD* codifica una proteína de función desconocida. Algunos desnitrificantes, como *P. denitrificans*, presentan en su organización génica, además, los genes *norE* y *norF*, cuyos productos están implicados en la maduración o en la estabilidad de la enzima Nor.

Las enzimas qNor se encuentran en diversos grupos taxonómicos, incluyendo Proteobacterias, como es el caso de *Ralstonia*, bacterias Gram-positivas, como en varias especies de *Bacillus*, y en Arqueobacterias tales como *Pyrobaculum aerophilum* y *Sulpholobus solfataricus*. La más estudiada ha sido la de *Ralstonia eutropha*. La enzima consiste en una subunidad (NorB) de 75 kDa que comprende dos regiones transmembrana y un dominio periplásmico.

Más información sobre las enzimas Nor se recoge en la revisiones de Hendriks *et al.* (2000), Zumft (2005), van Spanning *et al.* (2005) y de Vries *et al.* (2007).

3.1.4. Óxido nitroso reductasas.

El último paso de la desnitrificación es la reducción de óxido nitroso a N_2 , reacción que cataliza la enzima óxido nitroso reductasa (Nos). La enzima se ha caracterizado bioquímicamente en *P. stutzeri*, *Paracoccus pantotrophus* y *P. denitrificans*. En todos los casos, la enzima, de localización periplásmica, es un homodímero compuesto por dos subunidades de 65 kDa, que contiene cobre en su centro activo.

Los genes que codifican la enzima Nos están organizados en operones cuyo representante típico es el operón *nosRZDFYLX* de *P. stutzeri*, *P. denitrificans* y *S. meliloti*. NosZ es la subunidad catalítica, y los productos de los genes *nosR* y *nosX* presentan cierta identidad con las proteínas NirI y NirX de *P. denitrificans*, respectivamente. NosX parece implicada en el procesamiento de iones cobre y NosR, en la activación de la transcripción del promotor de los genes *nos* de *P. stutzeri*. El cobre es poco soluble en condiciones de limitación de oxígeno, por lo que requiere proteínas que sean capaces de captarlo en el interior celular, procesarlo hasta su estado activo y ensamblarlo a la proteína. Estas funciones corresponden a los productos de los genes *nosDFYL*. Se han publicado varias revisiones sobre la enzima Nos por Zumft (2005), van Spanning *et al.* (2005) y Zumft y Körner (2007).

3.2. Desnitrificación en el orden *Rhizobiales*.

Aunque en 1938, Rajagopalan observó la capacidad de los rizobios para desnitrificar, fue Evans, en 1954, el primero en demostrar la presencia de un sistema activo de reducción de nitrato en *B. japonicum*. Más tarde, Kennedy y colaboradores (1975) detectaron actividad nitrato reductasa tanto en el citosol como en las membranas de *B. japonicum*. Sin embargo, la capacidad de desnitrificar no está muy extendida entre los rizobios, ya que sólo *B. japonicum* y *A. caulinodans* son los únicos capaces de crecer cuando se cultivan en condiciones limitantes de oxígeno y presencia de nitrato como aceptor final de electrones. Se ha sugerido que la capacidad de desnitrificar puede constituir una ventaja competitiva para la permanencia y distribución en el suelo y para la capacidad de colonización de aquellas bacterias que la posean (Delgado y Bedmar, 2006).

Dentro de los rizobios, se han caracterizado genes que codifican enzimas de la desnitrificación en *R. sllae* (antes *R. hedysari*) (Toffanin *et al.*, 1996), *R. etli* (Bueno *et*

al., 2005), *S. meliloti* (Holloway *et al.*, 1996; Galibert *et al.*, 2001) y *B. japonicum* (Bedmar *et al.*, 2005).

R. sulae induce la formación de nódulos en simbiosis con la leguminosa *Hedysarum coronarium*. La cepa HCNT1 de *R. sulae* contiene una CuNir codificada por el gen *nirK*. La expresión de este gen sólo requiere condiciones limitantes de oxígeno, y es independiente de la presencia de un NO_x (Casella *et al.*, 1986). La reducción de nitrito en esta bacteria produce una disminución en el crecimiento debido a la acumulación de NO, lo que sugiere que *R. sulae* HCNT1 no contiene ninguna enzima Nor (Casella *et al.*, 1986). Además, cuando los genes *nor* se utilizan como sonda de hibridación no se detectan señales de hibridación en el ADN total de la cepa HCNT1, lo que confirma que tal cepa carece de dichos genes (Toffanin *et al.*, 1996). Las cepas mutantes en el gen *nirK* mantienen la capacidad de nodular y de fijar N₂ en simbiosis. Se ha sugerido que la enzima NirK puede estar implicada en la transición de la bacteria a una forma viable, aunque no cultivable, en condiciones limitantes de oxígeno (Toffanin *et al.*, 2000), lo que le permitiría sobrevivir en condiciones de estrés (Casella *et al.*, 2006).

R. etli forma simbiosis fijadoras de N₂ con judía (*Phaseolus vulgaris*). El análisis de la secuencia del genoma de *R. etli* CFN42 revela la existencia de los genes *norCBQD* y *nirK*, que codifican enzimas de tipo cNor y CuNir, respectivamente (<http://www.kazusa.or.jp/rhizobase>). Esta cepa carece de los genes *nap* y *nos*, por lo que es incapaz de crecer en microaerobiosis con nitrato como único aceptor de electrones, y carece de actividad nitrato reductasa (Bueno *et al.*, 2005). Sin embargo, *R. etli* CFN42 crece con nitrito como aceptor final de electrones, y una mutante en el gen *nirK* es incapaz de crecer en presencia de nitrito. Puesto que la mutante expresa una actividad Nir reducida y un consumo de nitrito disminuido, se ha propuesto que la enzima NirK puede estar implicada en la respiración y en la detoxificación del nitrito en *R. etli* (Bueno *et al.*, 2005).

En el genoma de *S. meliloti* 1021, concretamente en el plásmido simbiótico pSymA, se han localizado genes que presentan homología con los genes *nap*, *nir*, *nor* y *nos* de otras bacterias desnitrificantes (<http://www.kazusa.or.jp/rhizobase>). No obstante, *S. meliloti* 1021 no crece en microaerobiosis con nitrato o nitrito como aceptores finales de electrones. Las cepas mutantes en los genes *nos* forman simbiosis efectivas con *Medicago sativa*, lo que demuestra, por primera vez, que la desnitrificación no es

esencial para la fijación del N₂ en la simbiosis *Medicago sativa*-*S. meliloti* 1021 (Holloway *et al.*, 1996).

Finalmente, se han descrito cepas de *Mesorhizobium loti* que contienen genes de la desnitrificación, algunas sólo contienen genes *nir*, otras sólo genes *nor* y, unas terceras, sólo genes *nos* (Monza *et al.*, 2006).

3.3 Desnitrificación en *Bradyrhizobium japonicum*.

B. japonicum es el único rizobio en el que se han aislado y caracterizado los genes de la desnitrificación *napEDABC* (Delgado *et al.*, 2003), *nirK* (Velasco *et al.*, 2001), *norCBQD* (Mesa *et al.*, 2002) y *nosRZDFYLX* (Velasco *et al.*, 2004), implicados en la síntesis de las enzimas nitrato reductasa periplásmica (Nap), nitrito reductasa (Nir), óxido nítrico reductasa (Nor) y óxido nitroso reductasa (Nos), respectivamente (revisado por Bedmar *et al.*, 2005; Delgado y Bedmar, 2006; Delgado *et al.*, 2007) (Figuras 3.1 y 3.2).

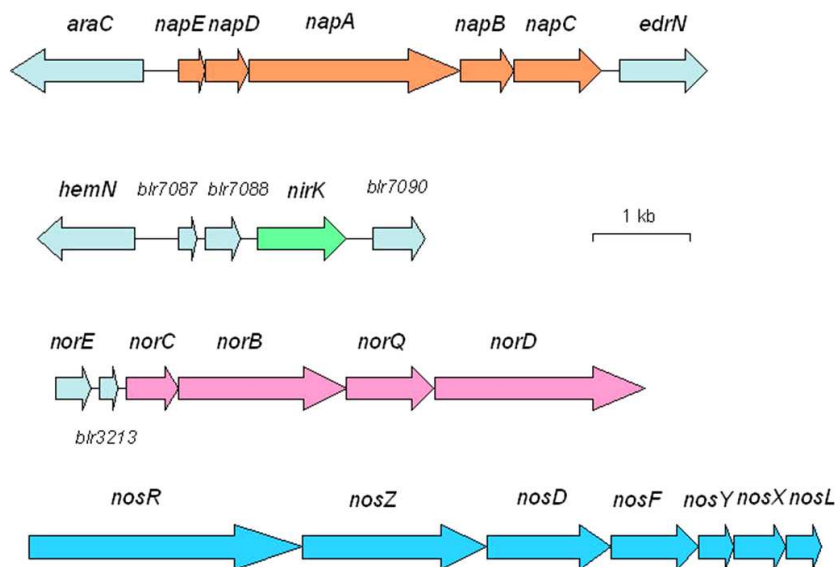


Figura 3.1. Organización de los genes *nap*, *nir*, *nor* y *nos* en *B. japonicum*. (<http://www.kazusa.or.jp/rhizobase>).

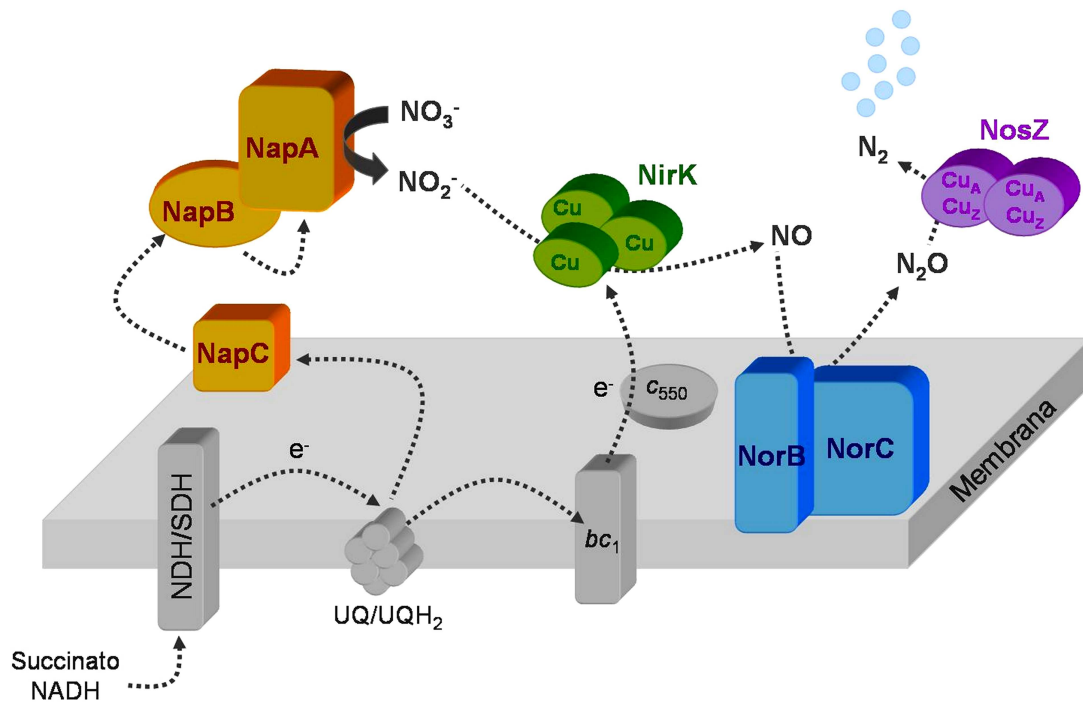


Figura 3.2. Representación esquemática de la localización de las proteínas implicadas en el proceso de la desnitrificación en *B. japonicum* (adaptado de Bueno *et al.*, 2008).

3.3.1. Nitrato reductasa periplásmica.

En una serie de experimentos de secuenciación al azar de fragmentos de ADN capaces de codificar péptidos de localización periplásmica, se identificó una región del cromosoma de *B. japonicum* cuya secuencia presentaba homología con la de los genes *nap* de otros microorganismos. De esta forma, se identificaron los genes *napE*, *napD*, *napA*, *napB* y *napC* (Figura 3.1), que codifican proteínas de 6.6, 11.8, 94.5, 16.9 y 23.9 kDa, respectivamente. De acuerdo con el análisis de las secuencias de aminoácidos deducidas de la secuencia de nucleótidos, NapA es la subunidad catalítica, que contiene un cofactor de molibdopterina y guanina y un centro [4Fe-4S], NapB es un citocromo con dos grupos hemo *c* que recibe electrones de NapC, un citocromo de membrana con cuatro grupos hemo *c* (Figura 3.2). NapE es una proteína transmembrana de función desconocida, y NapD es una proteína soluble que podría participar en la maduración del complejo NapAB (Delgado *et al.*, 2003).

Una mutación en el gen *napA* dio lugar a una cepa que carece de la proteína NapA, consecuentemente, la cepa no expresó actividad nitrato reductasa y fue incapaz de crecer microaeróbicamente con nitrato. Por tanto, la enzima nitrato reductasa periplásmica es la responsable del crecimiento de *B. japonicum* en condiciones desnitrificantes (Delgado *et al.*, 2003).

La secuenciación del genoma de *B. japonicum* (Kazusa *et al.*, 2002) ha permitido confirmar los datos previos obtenidos sobre los genes de la desnitrificación, y comprobar la ausencia de secuencias homólogas a las de los genes *nar*. En *B. japonicum*, por tanto, la Nap es la única enzima responsable de la respiración del nitrato y la que inicia la desnitrificación (Delgado *et al.*, 2003).

3.3.2. Nitrito reductasa.

En *B. japonicum* se ha identificado el gen *nirK* (Figura 3.1) que codifica una proteína de 34.4 kDa y cuya identidad con otras nitrito reductasas de tipo Cu oscila entre el 78 % de *Alcaligenes faecalis* y el 68 % de *R. sphaeroides*. La secuencia en el extremo N-terminal posee el motivo (S/T)RRXFLK característico de metaloproteínas periplásmicas que se exportan mediante el sistema Tat (del inglés, twin arginine translocation). Una cepa deficiente en *nirK* es incapaz de crecer en microaerobiosis con nitrato, carece de actividad nitrito reductasa y acumula nitrito en el medio (Velasco *et al.*, 2001). Estudios recientes de nuestro grupo de investigación han demostrado que el citocromo soluble *c*₅₅₀ de *B. japonicum* es el intermediario en el transporte electrónico entre el complejo *bc*₁ y la nitrito reductasa respiratoria NirK (Figura 3.2, Bueno *et al.*, 2008).

3.3.3. Óxido nítrico reductasa.

Los genes *nor* de *B. japonicum* se identificaron mediante hibridación con los genes *norCB* de *P. denitrificans* y la secuenciación del ADN correspondiente reveló que se organizan en los genes *norCBQD*, que codifican proteínas de 17, 40.5, 28.8 y 70 kDa, respectivamente. La secuencia primaria de NorC y NorB presentan entre el 49% y el 85% de identidad con las secuencias de las enzimas Nor de *P. stutzeri*, *P. aeruginosa*, *P. denitrificans*, *R. sphaeroides*, *Pseudomonas* sp. G-179 y *Alcaligenes faecalis*. NorC es un citocromo *c* asociado a la membrana, capaz de unirse a la proteína NorB que, a su vez, es homóloga a la subunidad I (FixN) de la oxidasa terminal *cbb*₃ de distintas bacterias (Figura 3.2). Los productos de los genes *norQ* y *norD* tienen funciones desconocidas, aunque se han implicado en el ensamblaje y maduración de la enzima. La inactivación de uno de los genes *norC* o *norB*, mediante técnicas de mutagénesis dirigida, dio lugar a cepas mutantes incapaces de crecer en microaerobiosis con nitrato como fuente de energía. El análisis de grupos hemo *c*, mediante la técnica de detección

de actividad peroxidasa intrínseca del grupo hemo, reveló la ausencia de un citocromo *c* de 17 kDa en las membranas de la cepa mutante *norC* (Mesa *et al.*, 2002).

3.3.4. Óxido nitroso reductasa.

Los genes *nos* de *B. japonicum* se identificaron mediante hibridación de su ADN genómico con el gen *nosZ* de *P. stutzeri*. El aislamiento y secuenciación de la región de ADN que mostraba hibridación con la sonda permitió establecer la existencia de siete marcos abiertos de lectura, que se identificaron como los genes *nosRZDFYLX*. Los genes *nosR*, *nosZ*, *nosD*, *nosF*, *nosY*, *nosL*, y *nosX* (Figura 3.1) codifican proteínas de 85, 72, 49, 33, 28, 19, y 38.5 kDa, respectivamente. La secuencia primaria de NosZ presenta entre un 50% y un 77% de identidad con las secuencias NosZ de otros organismos desnitrificantes, entre ellos *P. stutzeri*, *R. eutropha*, *P. denitrificans*, *S. meliloti*, *Achromobacter cycloclastes* y *P. fluorescens*. NosZ contiene dos centros de cobre, Cu_A y Cu_Z, de los que el último actúa como centro catalítico (Figura 3.2). Las proteínas NosDFY constituyen un transportador de tipo ABC que cataliza el transporte de cobre al interior de la célula. NosL se ha identificado como una chaperona. NosX posee, en su extremo N-terminal, un motivo de argininas que sugiere que NosX puede plegarse en el citoplasma y adquirir sus cofactores antes de su transporte al periplasma. El gen *nosR* codifica una proteína reguladora con seis regiones transmembrana en cuyo extremo C-terminal se localizan dos agrupaciones de cisteínas, similares a las de algunas ferredoxinas bacterianas que se unen a centros de tipo [4Fe-4S] (Velasco *et al.*, 2004).

Las cepas de *B. japonicum* mutadas en los genes *nosR* y *nosZ* no crecieron de manera similar a la cepa parental cuando se cultivaron en condiciones desnitrificantes. Es posible que el ATP necesario para el crecimiento de las células se obtenga durante el proceso de reducción del nitrato. Sin embargo, la enzima óxido nitroso reductasa no fue activa en las cepas mutadas, ya que, cuando se cultivaron microaeróbicamente con nitrato, se acumula óxido nitroso (Velasco *et al.*, 2004).

3.3.5. Regulación de la desnitrificación.

Como en muchos otros desnitrificantes, la expresión de los genes de la desnitrificación en *B. japonicum* ocurre en condiciones limitantes de oxígeno y presencia de nitrato, o un NO_x derivado de él (revisado por Bedmar *et al.*, 2005 y

Delgado *et al.*, 2007). Además, los genes *napEDABC* requieren, molibdeno para su expresión (Bonnard *et al.*, 2005).

Las cepas de *B. japonicum* con mutaciones en los genes *fixL*, *fixJ* y *fixK₂* no fueron capaces de crecer aneróticamente con nitrato, lo que sugiere que, de alguna manera, el sistema FixLJ-FixK₂ puede estar implicado en la regulación de la expresión de algunos de los genes, o de todo el proceso, de la desnitrificación (Nellen-Anthamatten *et al.*, 1998). Posteriormente, la utilización de fusiones transcripcionales entre las regiones promotoras de cada uno de los genes *nap*, *nir*, *nor* y *nos* y el gen informador *lacZ* ha demostrado que la expresión microaeróbica de tales genes depende del sistema regulador FixLJ-FixK₂ (Figura 3.3) (Bedmar *et al.*, 2005; Delgado *et al.*, 2003; Mesa *et al.*, 2002; Robles *et al.*, 2006; Velasco *et al.*, 2001, 2004). En la región promotora de todos los genes de la desnitrificación de *B. japonicum* se han localizado secuencias homólogas a la caja FixK (5'-TTGAT-N₄-GTCAA-3'), a las que FixK₂ podría unirse para activar la transcripción. De hecho, estudios de transcripción *in vitro* han demostrado que FixK₂ activa la transcripción de los genes *nap* y *nirK*. Por el contrario, no se ha podido demostrar que FixK₂ transcriba directamente los genes *nor* (Bueno *et al.*, enviado para su publicación)

En *B. japonicum*, se ha identificado el gen *nnrR*, de 710 pares de bases cuyo producto, la proteína NnrR de 236 aminoácidos, comparte el 47%-78 % de identidad con otros reguladores transcripcionales de la familia Fnr-Crp (Mesa *et al.*, 2003). NnrR carece del motivo de cisteína, característico de las proteínas tipo Fnr que responden a redox, y presenta, en su dominio C-terminal, el motivo HXXSR de unión a ADN, por lo que se incluye en el grupo NnrR (del inglés, nitrite and nitric oxide respiratory regulator) de la familia Fnr-Crp. Una cepa de *B. japonicum* mutante en el gen *nnrR* fue incapaz de crecer en microaerobiosis con nitrato como aceptor final de electrones, y careció de actividad nitrato y nitrito reductasa (Mesa *et al.*, 2003).

La activación microaeróbica de *nnrR* está controlada por FixK₂, y en su región promotora se encuentra una secuencia de tipo FixK. La utilización de fusiones transcripcionales entre las regiones promotoras de cada uno de los genes *nap*, *nir*, y *nor* y el gen informador *lacZ* ha demostrado que la máxima expresión de tales genes depende de la proteína NnrR (Mesa *et al.*, 2003, Robles *et al.*, 2006). De hecho, se ha demostrado recientemente, mediante calorimetría, que NnrR se une al promotor de los genes *nor* (Robles *et al.*, enviado para publicación). Sin embargo, NnrR no se une a los

promotores de los genes *nirK* y *napE*, descartando un control directo de NnrR sobre estos genes (Robles *et al.*, *enviado para publicación*) (Figura 3.3).

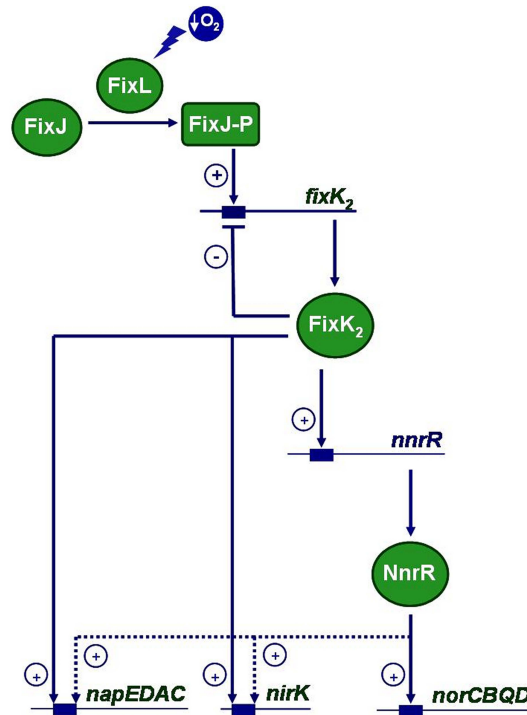


Figura 3.3. Regulación de los genes de la desnitrificación por el sistema FixLJ-FixK₂-NnrR de *B. japonicum* (adaptado de Mesa *et al.*, 2003, Robles *et al.*, 2006 y Robles *et al.*, *enviado para publicación*).

Recientemente, se ha demostrado que la proteína NifA se requiere para que ocurra la máxima expresión de los genes de la desnitrificación en *B. japonicum*. En este estudio se demuestra que una cepa que tiene mutado el gen *nifA* presenta un defecto del crecimiento en condiciones desnitrificantes, además de presentar menor actividad nitrato y nitrito reductasa. En las mismas condiciones, en dicha cepa se observa una disminución notable de la expresión de las fusiones transcripcionales entre las regiones promotoras de cada uno de los genes *nap*, *nir* y *nor* y el gen informador *lacZ*, así como los niveles de transcritos del gen *nirK*. El análisis de grupos hemo *c* demostró que en ausencia de NifA, disminuyen los niveles de los citocromos NapC y NorC (Bueno *et al.*, *en prensa*).

3.4. Desnitrificación en nódulos de soja.

La capacidad de desnitrificar es de gran interés en las asociaciones simbióticas que se establecen entre los rizobios y sus leguminosas específicas, ya que esta habilidad permite a los bacteroides sobrevivir durante períodos de anoxia. Se ha estimado que la

tensión de oxígeno en la región de los nódulos infectada por los bacteroides oscila de 3 a 22 nM y se ha demostrado que en este ambiente microaeróbico la oxidasa terminal *cbb₃* de elevada afinidad por el oxígeno, codificada por el operón *fixNOQP*, es la encargada de producir el ATP necesario para mantener la actividad de la nitrogenasa. Dado que los bacteroides poseen la maquinaria enzimática necesaria para desnitrificar, este proceso podría generar ATP en condiciones en las que el oxígeno disponible para la *cbb₃* sea limitante. Tales condiciones podrían ocurrir como consecuencia de una disminución de la concentración de oxígeno en los bacteroides provocada por un estrés abiótico (encharcamiento, salinidad, sequía, etc.), lo que daría lugar a la disminución de la difusión de oxígeno hacia el interior del nódulo y, consecuentemente, de la capacidad de producción de ATP (revisado por Delgado *et al.*, 2007).

Otro papel fisiológico que se le podría atribuir a la desnitrificación en bacteroides podría ser el de mecanismo de detoxificación, mediante la eliminación de compuestos, como el nitrito y el NO, de elevado poder citotóxico. Estos compuestos, que pueden producirse por la bacteria como intermediarios de la reducción de nitrato y la desnitrificación en los bacteroides, o por la planta como productos de la cNR o enzimas tipo NOS, pueden dañar a la nitrogenasa (Trinchant y Rigaud, 1980 y 1982; Sasakura *et al.*, 2006; Shimoda *et al.*, 2009) o unirse a la Lb y formar complejos LbNO afectando de esta forma a la fijación de N₂ (Kanayama *et al.*, 1990). Además, el óxido nitroso es inhibidor competitivo de la nitrogenasa, ya que es sustrato de la misma, que puede reducirlo a N₂ (revisado por Delgado *et al.*, 2007)

Mediante el empleo de fusiones transcripcionales *nirK-lacZ*, *norC-lacZ* y *nosZ-lacZ*, y detección histoquímica *in situ* de la actividad β -galactosidasa, se demostró que los genes de la desnitrificación se expresan en nódulos de plantas de soja (Mesa *et al.*, 2004) (Figura 3.4). En plantas cultivadas dependiendo exclusivamente de la fijación de N₂ existe expresión de actividad β -galactosidasa, lo que sugiere que la propia microaerobiosis del nódulo permite la expresión de los genes de la desnitrificación. Sin embargo, la adición de nitrato potásico a la solución nutritiva de las plantas no incrementa la expresión de actividad β -galactosidasa de las fusiones. Estos resultados sugieren que, al contrario de lo observado en vida libre, donde el nitrato es necesario para la máxima expresión de los genes de la desnitrificación, en simbiosis es la limitación de oxígeno, y no la presencia de nitrato, el principal factor implicado en la expresión de dichos genes (Mesa *et al.*, 2004).

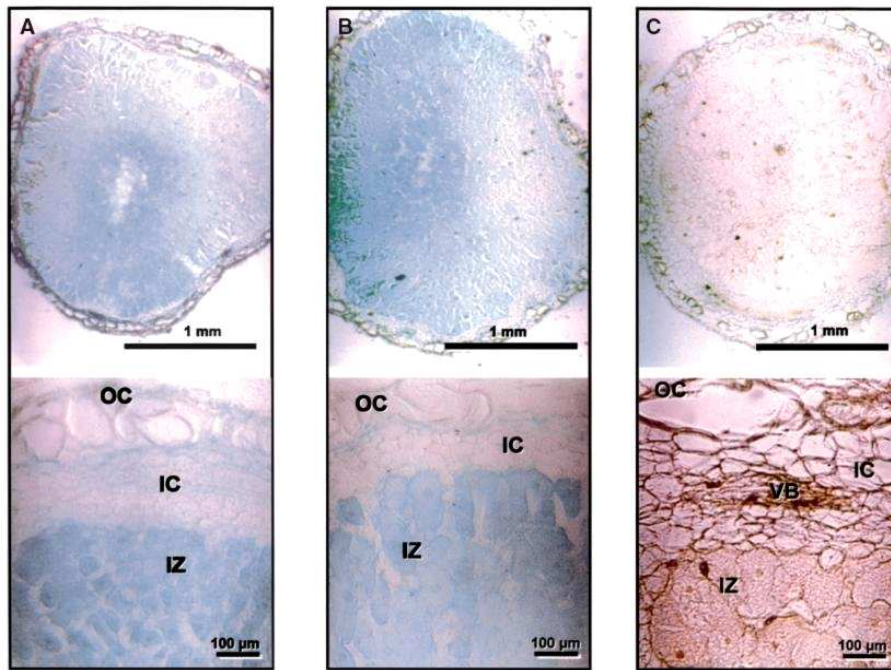


Figura 3.4. Detección *in situ* de la actividad β -galactosidasa en cortes longitudinales de nódulos de plantas de soja inoculadas con *B. japonicum* USDA110 que contiene una fusión transcripcional P_{nirK} -*lacZ*. Los nódulos se recolectaron de plantas crecidas en ausencia (A) o presencia (B) de KNO_3 4 mM. Como control (C) se muestran las secciones de nódulos tratados con nitrato e inoculados con *B. japonicum* USDA110 que contiene el plásmido pPM220. OC, córtex externo; IC, córtex interno; IZ, zona de infección; VB, haces vasculares (Mesa *et al.*, 2004).

Con el objeto de conocer el papel fisiológico de los genes de la desnitrificación en simbiosis, se llevó a cabo un estudio del fenotipo simbiótico en plantas de soja inoculadas con cepas de *B. japonicum* alteradas en los genes *nirK*, *norC* y *nosZ*, (Mesa *et al.*, 2004). Cuando las plantas de soja se inocularon con tales cepas, independientemente de la cepa utilizada para la inoculación, no se observaron diferencias significativas en nodulación, biomasa, ni contenido en nitrógeno en aquellas plantas que crecieron únicamente a expensas de la fijación biológica de N_2 . Sin embargo, cuando las plantas se cultivaron con nitrato potásico, el número y el peso fresco de los nódulos de las plantas inoculadas con las cepas mutantes *nirK* y *norC* fueron significativamente inferiores a los de la cepa parental USDA110 o la cepa mutante *nosZ*. Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en la capacidad de fijar N_2 de las diferentes mutantes estudiadas. Mediante estudios de cinética de nodulación, se demostró la deficiencia en la capacidad de nodulación de las cepas mutantes *nirK* y *norC* de *B. japonicum*. Es posible que las mutaciones en *nirK* o *norC* afecten a la viabilidad y persistencia de las cepas en el medio de enraizamiento de

las plantas, y consecuentemente afecten a las etapas iniciales del proceso de infección. De hecho, cepas deficientes en los genes *nir* de *Pseudomonas fluorescens* YT101 y *Pseudomonas* sp. RTC01, que son incapaces de crecer en microaerobiosis con nitrato y acumulan nitrito en el medio de cultivo, son menos viables que las cepas parentales (Philippot *et al.*, 1995; Ghiglione *et al.*, 2000). Así mismo, se ha demostrado en *P. fluorescens* YT101 que la presencia de actividad nitrato reductasa respiratoria lleva aparejada una mayor capacidad para colonizar la rizosfera de plantas de maíz, ya que cepas deficientes en el gen *narG* son menos persistentes en el suelo (Ghiglione *et al.*, 2002).

4. El óxido nítrico en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa.

4.1. Posibles fuentes de NO en nódulos.

Varios estudios han demostrado la presencia de una actividad tipo NOS en leguminosas, en suspensiones de células de soja (Delledonne *et al.*, 1998), en peroxisomas de hojas de guisante (Barroso *et al.*, 1999) y en raíces y nódulos de *Lupinus albus* (Cueto *et al.*, 1996). Cueto y colaboradores detectaron producción de L-citrulina a partir de L-arginina (en presencia de Ca^{2+} y NADPH) en preparaciones del citosol de raíces y nódulos de *L. albus*. La presencia de inhibidores de las NOSs de mamíferos inhibía la reacción, y al añadir concentraciones crecientes de arginina, la inhibición observada era menor. Además, en este estudio, mediante localización histoquímica, se detectó la actividad NADPH-diaforasa (que normalmente es empleada como marcador de la actividad NOS en mamíferos) en los haces vasculares de los nódulos y en las células vegetales presentes en la zona de infección. Basándose en todas estas observaciones, los autores propusieron la presencia de actividad tipo NOS en raíces y nódulos de *L. albus* (Cueto *et al.*, 1996). En dichas preparaciones también se detectó la producción de NO mediante el seguimiento de la reacción entre NO y oxiHb (Cueto *et al.*, 1996). Estudios más recientes, han demostrado que se produce menos NO en nódulos de *M. truncatula* tratados por un inhibidor de NOSs de mamíferos, lo que sugiere que una enzima tipo NOS contribuye a la producción de NO en los nódulos (Figura 4.1) (Baudouin *et al.*, 2006).

La enzima nitrato reductasa del citosol (NRc) de las células vegetales de los nódulos podría constituir otra fuente de NO en los mismos (Figura 4.1). Los estudios

que se han realizado hasta ahora han demostrado que la cNR presente en nódulos es de tipo constitutivo, al contrario de lo que ocurre con la cNR de raíz. En ausencia de nitrato se detectó actividad cNR en nódulos, pero no en raíces de soja (Kanayama *et al.*, 1999). En *Lotus japonicus*, tanto la actividad como los transcritos de la cNR se indujeron en raíces y nódulos cuando se adicionó nitrato, sin embargo, en ausencia de nitrato sólo se detectó actividad y transcritos de la cNR en los nódulos (Kato *et al.*, 2003). Estos autores sugieren que aunque se trate de la misma enzima, las diferencias de expresión entre raíz y nódulos se deben a la estructura y el ambiente microaeróbico específicos de los nódulos. Además, éstos autores localizaron, por hibridación *in situ*, los transcritos de la cNR en la zona de infección de los nódulos de *L. japonicus*, donde la concentración de oxígeno es muy baja. Sin embargo, se desconoce la implicación de la cNR en la producción de NO en los nódulos. Otras posibles fuente de NO en nódulos podrían ser las mitocondrias o la NI-NOR, aunque todavía no se sabe nada acerca de su presencia en nódulos (Figura 4.1).

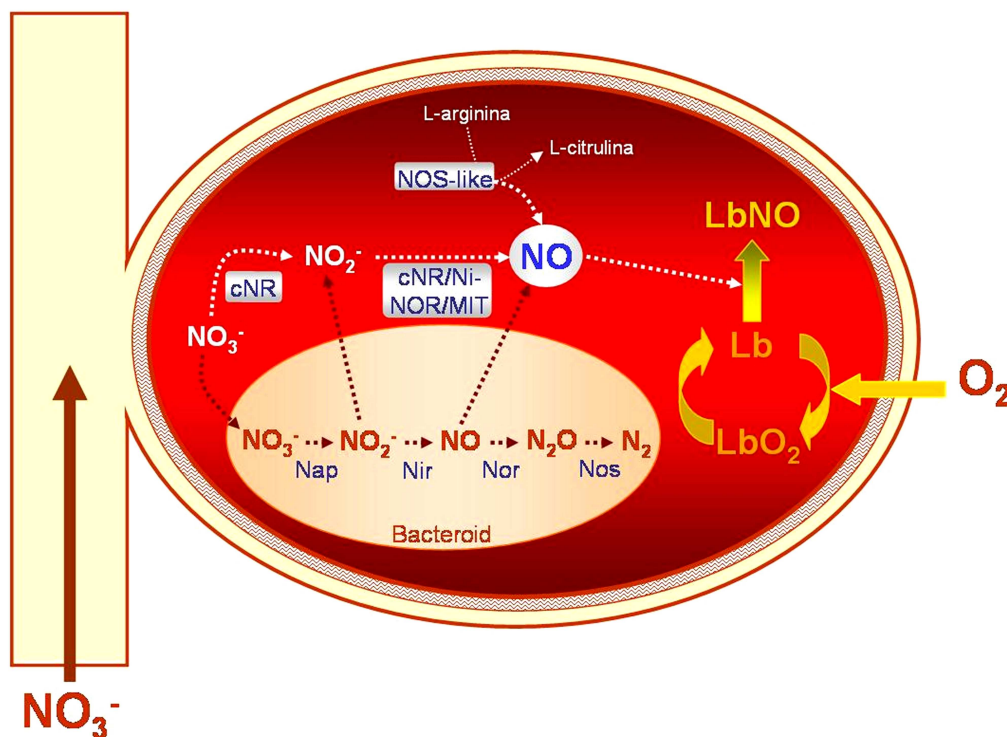


Figura 4.1. Representación esquemática de las posibles fuentes de NO en nódulos. MIT: mitocondrias.

Hasta ahora sólo se ha hablado de las fuentes de NO de los nódulos procedentes de la planta, pero el microsimbionte también puede contribuir a la producción de NO a través del proceso de desnitrificación, en el que dicho compuesto es un intermediario

(Figura 4.1). Recientemente, en nuestro grupo de investigación se ha demostrado, mediante el uso de espectroscopía UV-visible y EPR que la hipoxia y el nitrato inducen la formación de complejos nitrosil-leghemoglobina (LbNO) en nódulos de soja (Meakin *et al.*, 2007) (Figura 4.2). La contribución de la reducción anaeróbica del nitrato por los bacteroides de *B. japonicum* en la generación de LbNO se ha demostrado mediante el análisis de LbNO en nódulos producidos por una cepa mutante en el gen *napA*. En los nódulos producidos por la cepa mutante *napA* se observó una disminución considerable de los niveles de LbNO (Figura 4.2). Por otra parte, la presencia de niveles basales de LbNO en los nódulos formados por la cepa *napA* sugiere que, en condiciones hipóxicas, además de la respiración anaeróbica del nitrato, otras fuentes de NO pueden contribuir a la producción de NO en los nódulos. En nódulos de alfalfa, el empleo del fluorocromo DAF-FM DA (del inglés, 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorescein diacetate) para la detección de NO *in situ*, ha demostrado que la producción de NO se localiza en la zona de infección de los nódulos y está relacionada con la presencia de simbiosomas en las células vegetales (Baudouin *et al.*, 2006). Sin embargo, y a diferencia de lo observado en nódulos de soja, estos autores concluyen que la desnitrificación no parece ser una fuente de NO, ya que la fluorescencia emitida por los nódulos debida al NO no disminuye cuando las plantas de alfalfa se inoculan con una cepa de *S. meliloti* deficiente en actividad nitrito reductasa (*nirK*), que es la responsable de la formación de NO en los bacteroides (Baudouin *et al.*, 2006).

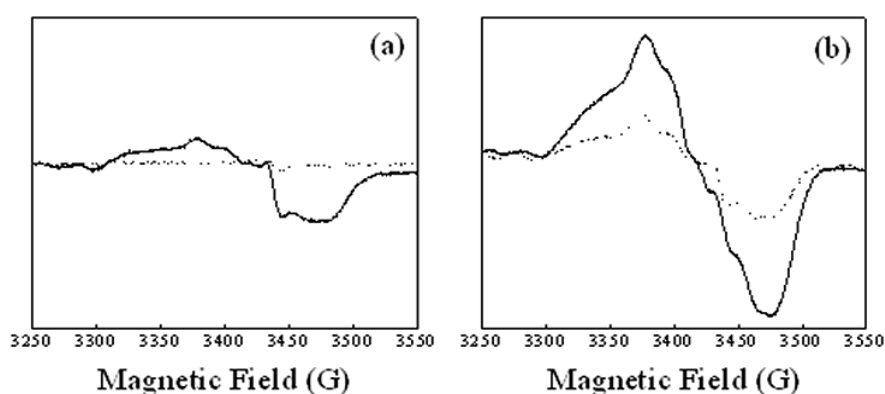


Figura 4.2. Espectros de resonancia paramagnética electrónica (EPR) de nódulos de soja procedentes de plantas inoculadas con *B. japonicum* USDA110 (línea continua) o la cepa mutante *napA* (línea discontinua), tratadas con nitrato en condiciones control (a) o sometidas a hipoxia (b) (Meakin *et al.*, 2007).

4.2. Posibles funciones del NO en nódulos.

En los últimos años, se ha demostrado la producción de NO en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa mediante el uso de diferentes aproximaciones experimentales. Uno de los métodos más utilizados para la detección de NO en la simbiosis es el empleo de indicadores fluorescentes, tales como las diaminofluoresceínas (DAFs) desarrolladas por Kojima y colaboradores (Kojima *et al.*, 1999). Utilizando un derivado permeable de estos compuestos, el DAF-FM DA, se detectó *in situ* la producción rápida y pasajera, de NO en raíces durante las etapas tempranas de la simbiosis *L. japonicus*-*M. loti* (Shimoda *et al.*, 2005). Sin embargo, utilizando un método similar, no se detectó producción de NO en las etapas tempranas de la interacción *M. truncatula*-*S. meliloti* (Baudouin *et al.*, 2006). Estos autores, sí detectaron producción de NO en nódulos maduros, concretamente observaron la fluorescencia en aquellas células vegetales de la zona de infección que contenían bacteroides. El tratamiento de los nódulos con cPTIO, un secuestrador de NO, redujo la fluorescencia drásticamente, lo que probó que dicha fluorescencia se debía específicamente a la presencia de NO (Baudouin *et al.*, 2006; Shimoda *et al.*, 2005). También se ha estudiado la presencia de NO en nódulos maduros de soja mediante la detección de complejos LbNO por medio de espectroscopía UV-visible y EPR (Kanayama *et al.*, 1990; Mathieu *et al.*, 1998; Meakin *et al.*, 2007). Este tipo de complejos produce una señal paramagnética única y característica, cuya magnitud es directamente proporcional a la cantidad de complejos presentes en el nódulo. Mathieu y colaboradores (1998) demostraron que los complejos LbNO son más abundantes en los nódulos jóvenes, y disminuyen durante la senescencia, lo que sugiere un papel del NO durante las etapas iniciales de la nodulación.

Varios autores han demostrado que el NO inhibe la actividad nitrogenasa en nódulos de soja (Trinchant & Rigaud, 1982), de *Alnus firma* (Sasakura *et al.*, 2006) y de *L. japonicus* (Shimoda *et al.*, 2009). También se ha sugerido que el NO puede afectar a la actividad nitrogenasa de una forma indirecta, uniéndose a la Lb e interfiriendo en su función como transportadora de oxígeno (Kanayama *et al.*, 1990). Se ha demostrado que la proteína FixL puede sentir NO (Gilles-González *et al.*, 1994; Gong *et al.*, 2000; Lukat-Rodgers y Rodgers, 1997; Winkler *et al.*, 1996), de la misma forma que sensa oxígeno. Por lo tanto, es posible que el NO funcione como un regulador alternativo de FixL y pueda estar implicado en procesos dependientes de la cascada reguladora FixLJ-FixK₂, como es el caso de la expresión de los genes *fix* y *nif*, responsables de la fijación de N₂ (revisado por Ferguson y Mathesius, 2003; Hérouart *et al.*, 2002).

El NO, en pequeñas concentraciones, podría actuar como señalizador de diferentes procesos en los nódulos, como ocurre en la organogénesis de raíces laterales y adventicias. De hecho, el NO parece estar implicado en el control de la formación de nódulos indeterminados, puesto que se ha observado que las plantas de alfalfa que se inoculan con cepas de *S. meliloti* que sobreexpresan un gen responsable de la síntesis de auxinas tienen mayor número de nódulos. Además, en estos nódulos se detectan, por fluorescencia con DAF-2-DA (del inglés, 4,5-Diaminofluorescein diacetate), niveles más elevados de NO. Las plantas tratadas con cPTIO e inoculadas con la misma cepa, tienen un número de nódulos menor. Estos resultados indican que las auxinas sintetizadas por el rizobio y el NO tienen un efecto positivo en la formación de nódulos indeterminados (Pii *et al.*, 2007). Recientemente, mediante el análisis del transcriptoma de nódulos de alfalfa expuestos a NO, se ha demostrado que la respuesta ocurre fundamentalmente en nódulos jóvenes, lo que apoya la hipótesis de que el NO puede estar implicado en el desarrollo nodular (Ferrarini *et al.*, 2008).

4.3. Posibles sistemas de detoxificación de NO en nódulos.

4.3.1. Papel de las hemoglobinas.

Las Hbs de clase 1 también intervienen en la modulación de los niveles de NO en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. De hecho, se ha demostrado recientemente, en raíces de *L. japonicus*, que los niveles de NO y la expresión de una Hb-1 (LjHb1) se inducen paralelamente en respuesta a estreses tales como las bajas temperaturas y la hipoxia, y en respuesta a la inoculación con su simbiote, *Mesorhizobium loti* (Shimoda *et al.*, 2005). Un estudio posterior, ha demostrado que LjHb1 controla la respuesta defensiva de la planta durante la etapa inicial de la interacción planta-rizobio, modulando el nivel de NO que se produce en las raíces (Nagata *et al.*, 2008). Cuando *L. japonicus* se inocula con una bacteria patógena no se induce la expresión de *LjHb1*, y la producción de NO en raíces no se controla, por lo que se desencadena la respuesta defensiva de la planta. La inducción de *LjHb1* se produce en respuesta a su simbiote, y puede ser crítica para que la simbiosis se desarrolle con éxito (Nagata *et al.*, 2008).

Como se ha comentado en el apartado 4.2, el NO es un potente inhibidor de la actividad nitrogenasa (Kanayama *et al.*, 1990; Sasakura *et al.*, 2006; Shimoda *et al.*, 2009; Trinchant y Rigaud, 1982). En las simbiosis entre *Alnus* y las bacterias del género *Frankia* (no rizobios) una Hb-1 (AfHb1) parece contribuir a la adaptación al estrés

mediante la protección de la actividad nitrogenasa, retirando el NO que se produce en respuesta a condiciones de bajas temperaturas (Sasakura *et al.*, 2006). Además, la sobreexpresión de *LjHb1* y *AfHb1* en nódulos produce un aumento de la actividad nitrogenasa, y tal y como se ha demostrado para otras Hbs-1, las formas oxigenadas de *LjHb1* y *AfHb1* convierten el NO en nitrato (Shimoda *et al.*, 2009)

Como se ha comentado en el apartado 4.2, en diversos estudios se ha detectado la presencia de complejos nitrosil-leghemoglobina [$\text{Lb}(\text{Fe}^{2+})\text{NO}$, LbNO] en extractos de nódulos de soja por medio de espectroscopía UV-visible (Yamasaki *et al.*, 1990; Meakin *et al.*, 2007) y en nódulos intactos por medio de EPR (Mathieu *et al.*, 1998; Meakin *et al.*, 2007). Los complejos LbNO son muy estables de forma que la Lb unida a NO queda inhabilitada para unirse al oxígeno. Por esta razón, algunos autores han sugerido que la presencia de LbNO puede resultar negativa para la nitrogenasa (Kanayama *et al.*, 1990). Sin embargo, otros autores han propuesto que la oxiLb podría actuar como un reservorio de NO, contribuyendo a la protección de la nitrogenasa, que es rápidamente inactivada por el NO y otras especies reactivas de nitrógeno (RNS, Herold y Puppo, 2005a y 2005b). Estos autores han demostrado que el NO y otras RNS pueden reaccionar *in vitro* con dos formas de Lb inactivas en cuanto a su capacidad de unirse al oxígeno, la ferrilLb [$\text{Lb}(\text{Fe}^{4+})=\text{O}$], una forma muy oxidada de Lb que resulta de la reacción de la metaLb con H_2O_2 y LbNO , para dar lugar a metaLb [$\text{Lb}(\text{Fe}^{3+})$], que puede ser reducida por la MetaLb reductasa y así regenerar la forma activa desoxiLb [$\text{Lb}(\text{Fe}^{2+})$].

Existe un riesgo potencial en los nódulos de formar peroxinitrito, que es una RNS capaz de causar la nitración de proteínas. La auto-oxidación de la Lb y otras reacciones enzimáticas que ocurren en los nódulos pueden generar radical superóxido, el cual es capaz de reaccionar con el NO y formar peroxinitrito. Se ha demostrado *in vitro* que la Lb también se puede unir y destoxificar peroxinitrito (Herold y Puppo, 2005a).

Los complejos LbNO son más abundantes en los nódulos jóvenes y disminuyen en nódulos senescentes, lo que sugiere un papel beneficioso del NO en las etapas iniciales de la nodulación (Mathieu *et al.*, 1998). Esta hipótesis estaría apoyada por la observación de que la expresión de la Lb se induce en etapas tempranas de la interacción simbiótica, de forma que esta proteína también podría participar en la modulación de los niveles de NO durante el establecimiento de la simbiosis.

En resumen, todas estas observaciones sugieren que las Hbs no simbióticas, así como las simbióticas (Lbs) pueden estar implicadas en el metabolismo, transporte y señalización del NO y otras RNS en los nódulos.

4.3.2. Papel de los bacteroides.

En los bacteroides de *B. japonicum*, la enzima óxido nítrico reductasa, que cataliza la reducción de NO a óxido nitroso y además, se expresa en los nódulos de soja (Mesa *et al.*, 2004), podría ser un sistema candidato de destoxificación de NO. Sin embargo, se ha demostrado que los nódulos de plantas inoculadas con una cepa de *B. japonicum* que tiene mutado el gen *norC* (responsable de la síntesis de una subunidad estructural de la enzima Nor), no acumulan más NO que los nódulos producidos por la cepa parental (Meakin *et al.*, 2006). Basándose en estos resultados, estos autores proponen que en nódulos de soja la enzima Nor no es la única responsable de la reducción de NO.

En bacterias, se han descrito otros mecanismos de destoxificación de NO (consultar las revisiones de Gardner, 2005 y Poole, 2005). Las enterobacterias, tales como *E. coli* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, utilizan una flavohemoglobina (Hmp) sintetizada por el gen *hmpA* y una flavorubredoxina (NorV) como mecanismos principales de destoxificación de NO. La Hmp cataliza la oxidación aeróbica de NO a nitrato utilizando NAD(P)H (Gardner *et al.*, 1998; Hausladen *et al.*, 1998; Mills *et al.*, 2001). La flavorubredoxina NorV, sin embargo, cataliza la reducción de NO en condiciones microaeróbicas o anaeróbicas (Gardner *et al.*, 2002). Además de estos sistemas, recientemente se ha sugerido que el citocromo *bd* es importante en la protección de la inhibición del crecimiento de *E. coli* mediada por NO (Mason *et al.*, 2008). También se ha propuesto que las hemoglobinas truncadas de *Mycobacterium smegmatis* y *Mycobacterium bovis* tienen actividad NO dioxygenasa y protegen a las células del NO (Lama *et al.*, 2006; Ouellet *et al.*, 2002).

Además de los sistemas mencionados anteriormente, se sabe que la enzima nitrito reductasa que contiene citocromo *c* (NrfA) de *E. coli* y *S. enterica* serovar Typhimurium destoxifica NO (Mills *et al.*, 2008; Poock *et al.*, 2002). NrfA cataliza la reducción de nitrito a amonio y utiliza 6 electrones para esta reacción, pero también cataliza la reducción anaeróbica de NO a amonio y utiliza 5 electrones (Costa *et al.*, 1990; Stach *et al.*, 2000).

En el genoma de *B. japonicum* se ha identificado un gen, que presenta homología con el gen *hmpA* de *E. coli* (<http://genome.kazusa.or.jp/rhizobase/>). También se ha identificado el gen *nirB*, que codifica una enzima nitrato reductasa asimilatoria (<http://genome.kazusa.or.jp/rhizobase/>). Las enzimas nitrato reductasa asimilatorias (NiRas) son enzimas citosólicas que contienen sirohemo en el centro activo y catalizan la reducción de nitrato a amonio. Las plantas, algas y cianobacterias contienen una NiRas que recibe los electrones de la ferredoxina y está codificada por el gen *nirA*. En hongos y bacterias heterotróficas, la reducción de nitrato a amonio se lleva a cabo por NiRas, entre las que se encuentran la NirB, que son dependientes de NAD(P)H (revisado por Moreno-Vivián y Flores, 2007). En *B. japonicum*, el gen *nirB* se encuentra en una región donde se han identificado otros genes relacionados con el proceso de asimilación del nitrato, como son *nrtABC*, que codifican un sistema de transporte de nitrato tipo ABC, y *nasA*, que codifica una nitrato reductasa asimilatoria (revisado por Moreno-Vivián y Flores, 2007).

Actualmente, en *B. japonicum* se desconoce la posible implicación de la Hmp y de la nitrato reductasa NirB como sistemas de detoxificación de NO en nódulos de soja.

OBJETIVOS

En estudios previos, realizados en el Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín, se aislaron y caracterizaron los genes *napEDABC*, *nirK*, *norCBQD* y *nosRZDFYLX* de *Bradyrhizobium japonicum*, cuyos productos se identificaron como las enzimas nitrato reductasa periplásmica (Nap), nitrito reductasa (NirK), óxido nítrico reductasa (Nor) y óxido nitroso reductasa (Nos), respectivamente. Estas enzimas llevan a cabo, de modo secuencial, la reducción del nitrato a dinitrógeno molecular, proceso conocido como desnitrificación. Posteriormente, se demostró, que la hipoxia y el nitrato inducen la formación de complejos nitrosil-leghemoglobina (LbNO) en nódulos de soja (Meakin *et al.*, 2007). También se demostró la contribución de la reducción anaeróbica del nitrato por los bacteroides de *Bradyrhizobium japonicum* en la generación de dichos complejos (Meakin *et al.*, 2007). El nitrito y el óxido nítrico, intermediarios del proceso de desnitrificación, podrían, por tanto, contribuir a la formación de los complejos LbNO. Sin embargo, al inicio de este trabajo se desconocían las posibles fuentes de NO en nódulos de soja.

En experimentos realizados por otros autores, se propuso que el NO puede inhibir la actividad de la enzima nitrogenasa (Sasakura *et al.*, 2006, Shimoda *et al.*, 2009, Trinchant y Rigaud, 1982). También se sugirió que el NO puede afectar a la actividad nitrogenasa de una forma indirecta, uniéndose a la Lb e interfiriendo en su función como transportadora de oxígeno (Kanayama *et al.*, 1990). Sin embargo, no se conocía el papel fisiológico de la producción de NO en nódulos de leguminosas. Como se ha comentado anteriormente, en nuestro grupo de investigación, se demostró que la hipoxia induce la formación de LbNO en nódulos de soja (Meakin *et al.*, 2007). En dicho estudio, las condiciones hipóxicas se impusieron de manera artificial, introduciendo las raíces de las plantas en botes cerrados llenos de solución mineral y gaseando la atmósfera con argón. Con el objeto de conocer la implicación fisiológica de la producción de NO en nódulos, se hacía necesario cultivar las plantas en condiciones fisiológicas que provocaran hipoxia en las raíces, como es el caso del encharcamiento (Bacanamwo y Purcell, 1999).

La desnitrificación en bacteroides, además de ser una fuente de NO en nódulos, puede ser un mecanismo de destoxificación de NO mediante la actividad de la enzima óxido nítrico reductasa. Sin embargo, trabajos previos de nuestro grupo demostraron que la enzima NO reductasa no es la única responsable de la destoxificación de NO en nódulos de soja (Meakin *et al.*, 2006). Por ello, al inicio de esta Tesis Doctoral, se consideró interesante identificar otros posibles sistemas de destoxificación de NO en nódulos de soja.

De acuerdo con lo expuesto, se han planteado los siguientes objetivos:

1. Estudiar la implicación de las enzimas desnitrificantes Nap, NirK y NorC en la producción de NO y de complejos LbNO en nódulos de soja en condiciones de encharcamiento.
2. Estudiar el efecto del NO sobre la expresión de los genes responsables de la fijación simbiótica de dinitrógeno en nódulos de soja en condiciones de encharcamiento.
3. Establecer el papel fisiológico de la desnitrificación en la fijación simbiótica de dinitrógeno en nódulos de soja en condiciones de encharcamiento
4. Identificar posibles mecanismos de destoxificación de NO en nódulos de soja.

CAPÍTULO 1

Production of nitric oxide and nitrosylleghaemoglobin complexes in soybean nodules in response to flooding

Cristina Sánchez¹, Andrew J. Gates², Georgina E. Meakin², Toshiki Uchiumi³, Lourdes Girard⁴, David J. Richardson², Eulogio J. Bedmar¹ and María J. Delgado^{1*}

¹Estación Experimental del Zaidín, CSIC, P. O. Box 419, 18080-Granada, Spain; ²School of Biological Sciences, University of East Anglia, Norwich, NR4 7TJ, UK; ³Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University, Kagoshima 890-0065, Japan; ⁴Programa de Genómica Funcional de Procariotes, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos, 62271, México.

Manuscrito enviado para su publicación en Mol. Plant-Microbe Interact.

1. RESUMEN

En los últimos años, el óxido nítrico (NO) ha acaparado un gran interés como molécula crucial en la señalización de diversos procesos durante el desarrollo y la fisiología de las plantas. Aunque se ha detectado en nódulos de leguminosas, actualmente no se sabe mucho acerca de las fuentes y el papel que desempeña el NO en dichos órganos. En este trabajo, se ha investigado la producción de NO en nódulos de soja en respuesta a encharcamiento. También se ha estudiado la implicación de la desnitrificación, llevada a cabo por el simbionte de la soja *Bradyrhizobium japonicum*, en la producción de NO, por medio de la inoculación de las plantas con las mutantes *napA*, *nirK* y *norC*. En condiciones de encharcamiento, los niveles de complejos nitrosil-leghemoglobina (LbNO) fueron significativamente más elevados en los nódulos de las mutantes *nirK* y *norC*, en comparación con los nódulos de la cepa parental. Además, en dichas condiciones, los nódulos de las mutantes *nirK* y *norC* acumularon más nitrito y NO, respectivamente, que los nódulos de la cepa parental. Por el contrario, los niveles de LbNO, nitrito y NO en nódulos de la mutante *napA* sometidos a encharcamiento, fueron inferiores a los correspondientes de la cepa parental. Estos resultados sugieren que la acumulación de nitrito y NO, generada por las enzimas Nap y NirK, es responsable del aumento de la producción de LbNO en nódulos de soja en respuesta a encharcamiento. El encharcamiento provocó una disminución de la expresión del gen *nifH* y de la actividad nitrogenasa en nódulos de la cepa parental y de la mutante *norC*, pero no en nódulos *napA* y *nirK*. La incubación de los nódulos de la cepa parental y de la mutante *norC* con un secuestrador de NO contrarrestó el efecto observado. En condiciones de vida libre, la actividad β -galactosidasa de la fusión *nifD'*-*lacZ* disminuyó en células de la cepa mutante *norC*, las cuales también acumularon NO en el medio. Estos resultados sugieren que el NO producido por la enzima nitrito reductasa de tipo Cu (NirK) en nódulos de soja en respuesta a encharcamiento, tiene un efecto negativo sobre la expresión de la nitrogenasa. Además, se propone a la Lb como el principal mecanismo que interviene en la destoxificación del NO, producido por la desnitrificación de los bacteroides en respuesta a encharcamiento.

2. ABSTRACT

Nitric oxide (NO) has gained interest as a major signalling molecule during plant development and in response to environmental cues. Formation of NO during symbiotic interactions has been reported, but the role and sources of NO in nodules remain unclear. In this work, NO formation in soybean nodules in response to flooding was investigated. The involvement of denitrification performed by the symbiont *Bradyrhizobium japonicum*, in NO formation has also been investigated by inoculating plants with *napA*, *nirK* or *norC* deficient mutants. Levels of nitrosylleghaemoglobin (LbNO) in flooded *nirK* and *norC* nodules were significantly higher than those observed in wild-type nodules. In addition, *nirK* and *norC* nodules, accumulated more nitrite and NO, respectively, than wild-type nodules. By contrast, levels of LbNO, nitrite and NO, in flooded *napA* nodules were lower than in wild-type nodules. These results suggest that in response to flooding conditions, LbNO formation in soybean nodules is caused by nitrite and NO generated from Nap and NirK enzymes. Flooding caused a decrease of *nifH* expression and nitrogenase activity in wild-type and *norC* nodules, but not in *napA* or *nirK* nodules. Incubation of wild-type and *norC* nodules with a NO scavenger counteracted the effect of flooding. Under free-living conditions, β -galactosidase activity from a *nifD*'-*lacZ* fusion decreased in a *norC* mutant which also accumulated NO in the medium. These results suggest that NO formed by Cu-containing nitrite reductase in soybean nodules, in response to flooding, has a negative effect on expression of nitrogenase. We propose that Lb has a major role in detoxifying NO produced by bacteroidal denitrification in response to flooding conditions.

3. INTRODUCTION

Members from the order *Rhizobiales* are Gram-negative bacteria with the unique ability to establish a dinitrogen (N₂)-fixing symbiosis on legume roots, and on the stems of some aquatic legumes. Symbiotic nitrogen fixation by the legume-rhizobia couple is a process of both ecological and agricultural importance. In the nodule, maintenance of nitrogenase activity is subject to a delicate equilibrium. Firstly, a high rate of oxygen (O₂)-respiration is necessary to supply the energy demands of the N₂ reduction process, but O₂ also irreversibly inactivates the nitrogenase complex. These conflicting demands are reconciled by control of O₂ flux through a diffusion barrier in the nodule cortex which greatly limits permeability to O₂ (Minchin, 1997). Oxygen is then delivered to the bacteroids by the plant O₂-carrier, leghaemoglobin (Lb), which is present exclusively in the nodule (Appleby, 1992). As such, a very low concentration of free oxygen (3 to 30 nM) is maintained within infected nodule tissue. In response to this dramatic physiological switch, rhizobia initiate the expression of *nif* and *fix* genes involved in nitrogen fixation (Fischer, 1994).

Nitric oxide (NO) is a ubiquitous gaseous signalling molecule that plays important roles in a wide variety of plant processes, including growth, development, disease, and the abiotic stress resistance responses (Delledonne, 2005; Besson-Bard, 2008). Several studies have clearly shown the production of NO in early stages of symbiosis and in mature nodules. It has been reported that a rapid and transient NO production occurs in *Lotus japonicus* roots inoculated with *Mesorhizobium loti* (Shimoda *et al.*, 2005), and that modulation of NO levels are involved in the establishment of the symbiosis (Nagata *et al.*, 2008). Functioning nodules also produce NO and this production has been associated with the bacteroid-containing cells of the fixing zone in alfalfa nodules (Baudouin *et al.*, 2006). Furthermore, NO has shown clear involvement in the auxin-signalling pathway controlling indeterminate nodule formation (Pii *et al.*, 2007). A recent transcriptomal study of NO-responsive genes in *Medicago truncatula* revealed that NO may regulate important processes of symbiotic nodule development and functioning (Ferrari *et al.*, 2008). NO has been reported as a potent inhibitor of nitrogenase activity in soybean (Trinchant & Rigaud, 1982), *Alnus firma* (Sasakura *et al.*, 2006) and *Lotus japonicus* nodules (Shimoda *et al.*, 2009). As such, NO could also interfere with nitrogen fixation by binding to Lb which would therefore impair Lb functionality by competing with O₂ for binding sites. In this context, it has

been demonstrated that NO can bind Lb to form nitrosylleghaemoglobin (LbNO) complexes in soybean nodules (Meakin *et al.*, 2007; Mathieu *et al.*, 1998). In plants, NO is produced under various stress conditions, such as hypoxia and low temperature (Dordas *et al.*, 2009; Shimoda *et al.*, 2005). Thus, it is timely to address the role of NO in nodules under stress conditions.

The sources of NO in nodules are unclear. NO may originate from the plant root tissue or from the bacteroids. In plant cells, NO can be produced from nitrite via both non-enzymatic (Bethke *et al.*, 2004) and enzymatic pathways, i.e., those catalyzed by nitrate reductase (NR) that can reduce nitrite to NO, as well as nitrate to nitrite (Meyer *et al.*, 2005; Yamasaki & Sakihama, 2000; Yamasaki *et al.*, 1999). Nitrite is reduced to NO by the plasma membrane-bound nitrite:NO-reductase (NI-NOR; Stöhr *et al.*, 2001). Also, NO may be produced in plant root tissue from arginine via an unidentified nitric oxide synthase (NOS)-like enzyme, or via an as yet uncharacterized process that uses polyamines as substrates (Besson-Bard *et al.*, 2008). In this context, a (NOS)-like activity has been identified in nodules of *Lupinus albus* (Cueto *et al.*, 1996) and it has been suggested that a NOS may participate in NO production in *M. truncatula* nodules (Baudouin *et al.*, 2006).

Bacterial denitrification is another likely source of NO in nodules, since nitrite and NO are produced as intermediates during the reduction of nitrate to N₂. The soybean symbiont, *Bradyrhizobium japonicum*, is an α -Proteobacterium able to denitrify under both free-living and symbiotic conditions (Bedmar *et al.*, 2005). In *B. japonicum*, denitrification is dependent on the *napEDABC* (Delgado *et al.*, 2003), *nirK* (Velasco *et al.*, 2001), *norCBQD* (Mesa *et al.*, 2002) and *nosRZDYFLX* (Velasco *et al.*, 2004) genes that encode the nitrate-, nitrite-, nitric oxide- and nitrous oxide-reductase systems, respectively. Expression of the denitrification genes in *B. japonicum* has been reported in soybean root nodules, by *in situ* histochemical detection of β -galactosidase activity from transcriptional fusions of the *nirK*, *norC* or *nosZ* promoters with the reporter gene *lacZ* (Mesa *et al.*, 2004).

Recently, it has been demonstrated that the reduction of nitrate by *B. japonicum* bacteroids contributes to LbNO production within soybean nodules in response to hypoxia (Meakin *et al.*, 2007). However, the sources and role of NO in nodules remain unclear. In this work, we have demonstrated that NO produced by *B. japonicum* NirK in response to flooding conditions affects nitrogenase genes expression. We have also

found that nitrite and NO formed by *B. japonicum* Nap and NirK, respectively, are the sources of LbNO in nodules in response to flooding.

4. RESULTS

4.1. NO formation in soybean nodules induced by *napA*, *nirK* or *norC* *B. japonicum* mutants.

To investigate whether or not flooding caused an increase in NO formation within nodules, electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy was used to detect NO bound to Lb in intact nodules, UV-visible absorbance spectroscopy was used to quantify the proportion of Lb bound to NO in nodule extracts, as previously described (Meakin *et al.*, 2007), and free NO was analyzed by using the specific fluorescent probe DAF-FM.

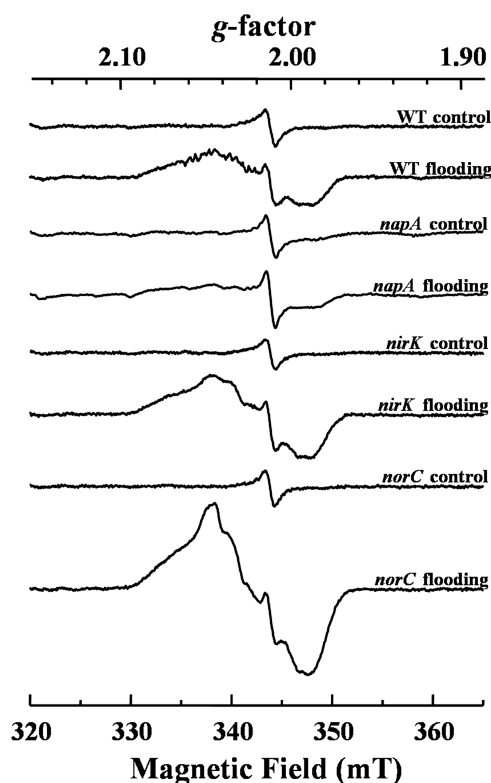


Figure 1. EPR spectra of intact nodules from plants inoculated with WT *B. japonicum* USDA110, *napA* GRPA1, *nirK* GRK308 or *norC* GRC131 strains. Plants were subjected or not (control) to flooding conditions. For each strain, a representative EPR spectrum observed from triplicate nodule samples from two or three different nodule harvests is presented.

EPR spectra of intact root nodules isolated from plants inoculated with wild-type (WT) *B. japonicum* strain USDA110 were devoid of any LbNO signal but showed a single derivative line-shape present at $g \sim 2.01$, which can be attributed to saturated radical within the nodule tissue. By contrast, WT nodules obtained under flooding conditions gave a clear LbNO signal with g -values at 2.04, (~ 2.01) and 1.99 (Figure 1). UV-visible spectra revealed that flooded WT nodule extracts contained 2-fold higher proportion of LbNO with respect to the WT control extract (Fig. 2A). Similarly, approximately 2 times more NO was detected within flooded WT nodules compared with control nodules (Fig. 2B). To investigate the contribution of Nap, NirK and Nor denitrification enzymes in LbNO formation, soybean plants were inoculated with *napA* GRPA1, *nirK* GRK308 or *norC* GRC131 deficient strains and were subjected to flooding conditions. The EPR spectrum from flooded *norC* nodules showed that the LbNO signal was significantly higher than the signal observed from flooded WT nodules (Fig. 1). Similarly, the proportion of LbNO from UV-visible spectra of *norC* nodules extract was 2-fold higher than that of WT nodules when subject to the same conditions (Fig. 2A). Fluorometric NO detection showed that *norC* nodules accumulated approximately 5 times more NO than WT nodules, when subjected to flooding (Fig. 2B). To clarify that the induction of fluorescence observed in WT and *norC* nodules was due to NO, flooded nodules were treated with an NO scavenger (c-PTIO). In the presence of c-PTIO, fluorescence was clearly suppressed (Fig. 2B), indicating that the response was representative of NO production.

The magnitude of the EPR LbNO signal from *nirK* nodules subjected to flooding was higher than that observed in WT flooded nodules (Fig. 1). Similarly, the UV-visible spectra demonstrated that levels of LbNO were about 1.5-times higher in flooded *nirK* nodules than in WT nodules (Fig. 2A). In addition, approximately 3 times more nitrite accumulated in nodules from plants inoculated with the *nirK* mutant and subjected to flooding compared to those from plants inoculated with the WT strain (Fig. 2C). However, flooding did not induce NO production in *nirK* nodules (Fig. 2B).

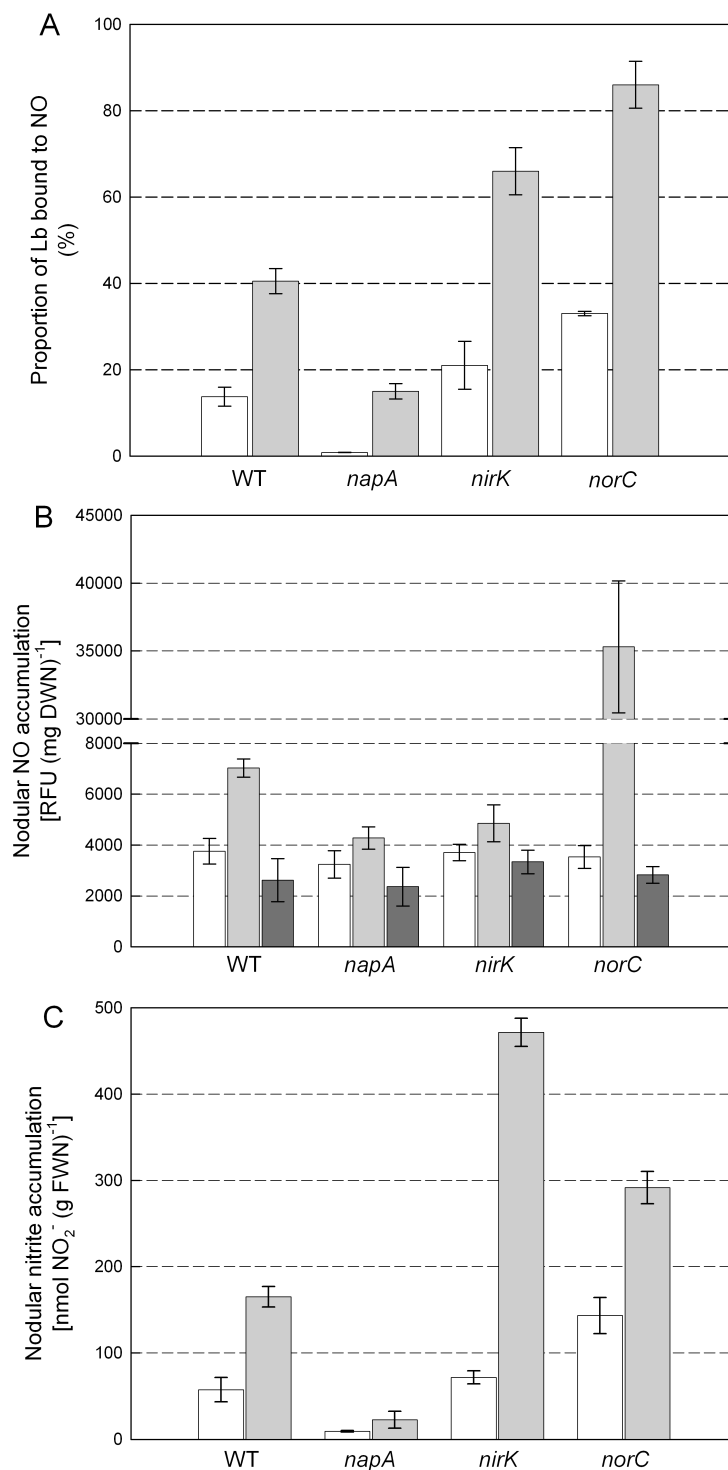


Figure 2. (A) LbNO proportion determined from the UV-visible spectra, (B) NO detection using DAF-FM and expressed as relative fluorescence units (RFU), and (C) nitrite accumulation in nodules. Plants were inoculated with WT *B. japonicum* USDA110, *napA* GRPA1, *nirK* GRK308, or *norC* GRC131 strains. Nodules were isolated from control plants (white bars) or plants subjected to flooding conditions (grey bars). In (B), flooded nodules were incubated with 2 mM of c-PTIO (black bars). Data are means \pm SE from three independent experiments assayed by using six replicates. DWN, dry weight nodule, FWN, fresh weight nodule.

A significant observation was that unlike WT, *nirK* or *norC* nodules, *napA* nodules consistently failed to give a clear LbNO EPR signal when subjected to flooding (Figs. 1 and 2A). Also, flooded *napA* nodules contained very low levels of nitrite compared to WT flooded nodules, and control levels of NO (Figs. 2B and C).

A			
NR activity [nmol NO ₂ ⁻ produced min ⁻¹ (mg protein) ⁻¹]			
Strain	Genotype	Control	Flooding
USDA110	WT	37 ± 1	81 ± 8
GRPA1	<i>napA</i>	ND	8 ± 1
GRK308	<i>nirK</i>	25 ± 2	64 ± 2
GRC131	<i>norC</i>	27 ± 2	71 ± 4

B			
Nir activity [nmol NO ₂ ⁻ consumed h ⁻¹ (mg protein) ⁻¹]			
Strain	Genotype	Control	Flooding
USDA110	WT	70 ± 8	120 ± 11
GRK308	<i>nirK</i>	69 ± 6	69 ± 4

C			
Nor activity [nmol NO consumed min ⁻¹ (mg protein) ⁻¹]			
Strain	Genotype	Control	Flooding
USDA110	WT	22 ± 3	37 ± 2
GRC131	<i>norC</i>	27 ± 4	38 ± 5

Table 1. (A) MV-dependent nitrate reductase (NR), (B) nitrite reductase (Nir) and (C) nitric oxide reductase (Nor) activities in bacteroids. Plants were inoculated with wild type (WT) *B. japonicum* USDA110, *napA* GRPA1, *nirK* GRK308, or *norC* GRC131 strains. Nodules were isolated from control plants or plants subjected to flooding conditions. Data are means ± SE from three independent experiments assayed by using three replicates.

Flooding conditions induced about 2-fold bacteroidal nitrate reductase activity in WT, *nirK* and *norC* nodules (Table 1A). As previously observed by Meakin *et al.* (2007), nitrate reductase activity was not detected in bacteroids produced by the *napA* mutant strain and isolated from control nodules (Table 1A). Bacteroids from *napA* flooded nodules exhibited some nitrate reductase activity, although at a rate 10-fold lower than in WT bacteroids (Table 1A). Wild-type levels of nitrite reductase activity were observed in *nirK* bacteroids from control plants (Table 1B) indicating that NirK is not the only enzyme involved in nitrite reduction in bacteroids. Flooding conditions induced about 1.7-fold nitrite reductase activity in WT bacteroids (Table 1B), but not in

nirK bacteroids suggesting the involvement of NirK in the activity induction observed in WT bacteroids in response to flooding conditions (Table 1B). NO reductase activity was approximately 1.7-fold higher in WT bacteroids from flooded nodules compared to control nodules (Table 1C). Wild-type levels of NO reductase activity were observed in *norC* bacteroids from nodules of either control or flooded plants (Table 1C). In support of these findings, similar rates of NO consumption by both WT and *norC* bacteroids were observed by Meakin *et al.* (2006), suggesting that Nor is not solely responsible for NO reduction in bacteroids from soybean nodules.

4.2. Nitrogenase expression in soybean nodules induced by *napA*, *nirK* or *norC* *B. japonicum* mutants.

To assess the effect of NO production within flooded nodules on the expression of the *nifH* gene (which encodes the Fe protein of nitrogenase), *nifH* transcripts were analyzed by using quantitative real time-PCR. RNA was isolated from nodules of soybean plants that were inoculated with *B. japonicum* USDA110, *napA* GRPA1, *nirK* GRK308 or *norC* GRC131 strains. As shown in figure 3, *nifH* mRNA level decreased about 5-times in WT nodules from plants subjected to flooding conditions compared to that from control plants. Similar to that observed in WT nodules, *nifH* expression decreased about 6-fold in *norC* nodules subjected to flooding compared to *norC* control nodules (Fig. 3). When WT or *norC* nodules harvested from flooded plants were treated with the NO scavenger, c-PTIO, *nifH* expression was enhanced about 3-fold compared to that observed in the absence of c-PTIO (Fig. 3). In contrast to WT or *norC* nodules, *nifH* expression was not affected by flooding in *napA* or *nirK* nodules (Fig. 3).

The transcriptional level of other nitrogenase related genes was also assessed in nodules of soybean plants inoculated with *B. japonicum* USDA110 and exposed to flooding conditions. Table 2 shows that, similarly to *nifH* transcripts, levels of *nifD* transcripts significantly decreased in WT flooded nodules. However, in flooded nodules similar transcription levels of *fixA* and *nifS* genes were observed compared to those detected in nodules isolated from control plants (Table 2).

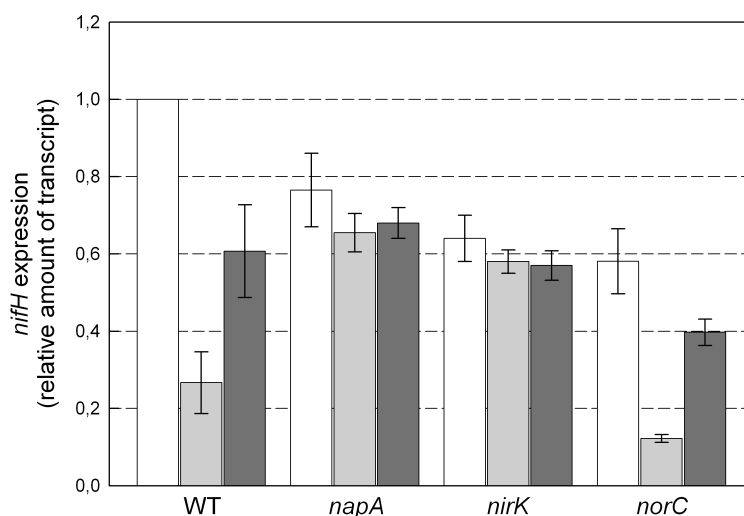


Figure 3. Expression of *nifH* in nodules by quantitative reverse transcription-PCR. Plants were inoculated with WT *B. japonicum* USDA110, *napA* GRPA1, *nirK* GRK308, or *norC* GRC131 strains. Nodules were isolated from control plants (white bars) or plants subjected to flooding conditions (grey bars). Flooded nodules were incubated with 2 mM of c-PTIO (black bars). Data are means \pm SE from three independent RNA samples assayed by using three replicates.

Gene	Description	Relative amount of transcript	
		Control	Flooding
<i>nifH</i>	Dinitrogenase reductase protein	1.000 \pm 0.000	0.266 \pm 0.080
<i>nifD</i>	Nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain	2.713 \pm 0.023	0.801 \pm 0.231
<i>fixA</i>	Electron transfer flavoprotein beta chain	0.250 \pm 0.066	0.275 \pm 0.056
<i>nifS</i>	Nitrogenase metalloclusters biosynthesis protein	0.021 \pm 0.002	0.024 \pm 0.002

Table 2. Expression of *nifH*, *nifD*, *fixA* and *nifS* by quantitative reverse transcriptase-PCR in nodules from plants inoculated with *B. japonicum* USDA110. Nodules were isolated from control plants or plants subjected to flooding conditions. Data are means \pm SE from three independent RNA samples assayed by using three replicates.

In addition, we examined the nitrogen-fixing activity of the nodules by analyzing the acetylene reduction activity (ARA). Since it has been previously demonstrated that the Lb concentration measured fluorimetrically correlated with nitrogenase activity (LaRue and Child, 1979), in this work, nitrogen-fixing activity of the nodules was also analyzed by measuring Lb content in the nodules. As shown in Table 3, nitrogenase

activity as well as Lb content decreased about 2-times by flooding in WT and *norC* nodules, but not in *napA* or *nirK* nodules.

Strain	Genotype	ARA [nmol C ₂ H ₂ h ⁻¹ (g FWN) ⁻¹]		Lb content [mg Lb (g FWN) ⁻¹]	
		Control	Flooding	Control	Flooding
USDA110	WT	115 aA	65 bB	5.90 bA	3.24 bB
GRPA1	<i>napA</i>	133 aA	112 aA	6.96 aA	5.17 aB
GRK308	<i>nirK</i>	126 aA	124 aA	6.48 abA	5.17 aB
GRC131	<i>norC</i>	138 aA	69 bB	5.57 bA	3.34 bB

Table 3. Acetylene reduction activity (ARA) and leghaemoglobin (Lb) content in nodules. Plants were inoculated with the WT USDA110, *napA* GRPA1, *nirK* GRK308 or *norC* GRC131 strains. Nodules were isolated from control plants or plants subjected to flooding conditions. Values in a column followed by the same lower-case letter and values in a row followed by the same capital letter are not significantly different as determined by the Tukey HSD test at $P \leq 0.05$ ($n=10$). FWN, fresh weight nodule.

4.3. *nifD* expression in *nirK* and *norC* *B.japonicum* mutants.

In order to demonstrate the involvement of NO in the expression of genes responsible for the synthesis of nitrogenase, a translational *lacZ* fusion with the promoter region of the *nifD* gene (which encodes the α -subunit of MoFe protein of nitrogenase) was used in regulatory studies performed under free-living conditions. It has been previously reported that cells of a *B. japonicum* mutant strain with a null mutation in the *nirK*, or *norC* genes accumulated nitrite, and nitric oxide, respectively, when cultured under nitrate respiring conditions (Velasco *et al.*, 2001, Robles *et al.*, unpublished data). The effect of nitrite and NO on expression of *nifD* was investigated by analyzing β -galactosidase activity in cells of WT *B. japonicum* 1042 strain, and *nirK* 0110, and *norC* 0410 mutants that contain a chromosomally integrated translational *nifD*'-'*lacZ* fusion (Fig. 4A). After aerobic growth, cells of strains 1042, 0110 and 0410 showed basal levels of β -galactosidase activity (Fig. 4A). When cells were incubated under anaerobic conditions, an increase of about 10-fold of β -galactosidase activity was observed in WT and *nirK* cells compared with the activity detected in cells grown in air, respectively (Fig. 4A). Under nitrate respiring conditions β -galactosidase activity in the *norC* mutant strain 0410 was about 3-fold lower than that detected in either WT or *nirK* cells (Fig. 4A). Under our experimental conditions, NO accumulated in *norC* cells and nitrite in *nirK* cells growth medium (Fig. 4B).

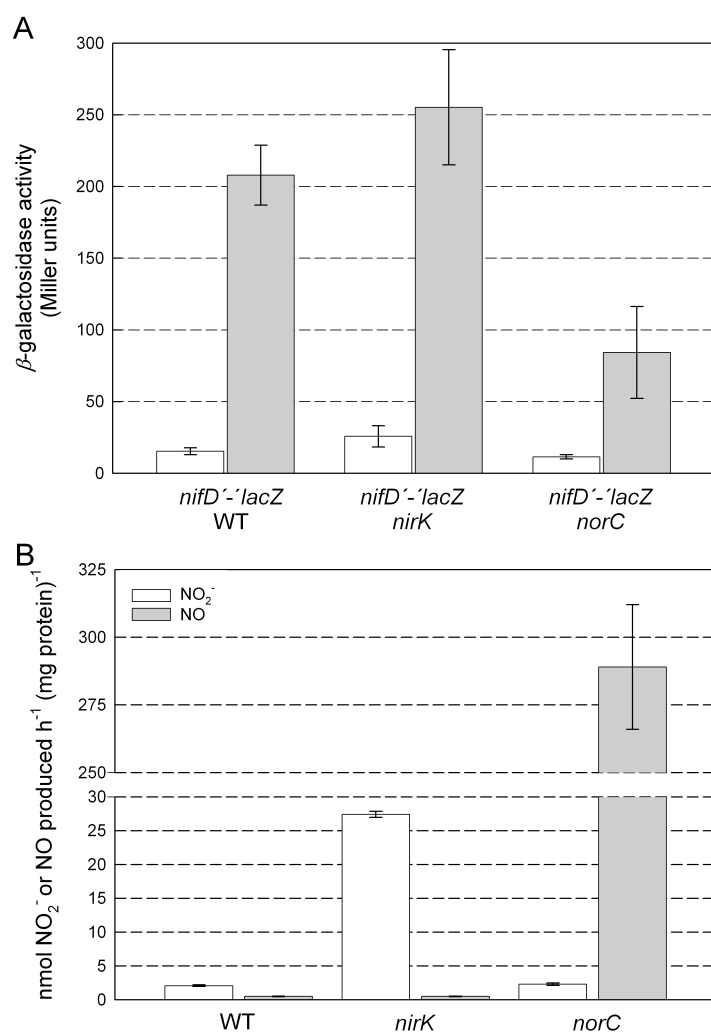


Figure 4. (A) β -galactosidase activity from a *nifD*⁻-*lacZ*, translational fusion in WT *B. japonicum* 1042, *nirK* 0110 and *norC* 0410 strains, and (B) nitrite and nitric oxide produced by WT *B. japonicum* USDA110, *nirK* GRK308 and *norC* GRC131 strains. Cells were incubated in YEM medium supplemented with 10 mM KNO₃ under aerobic (white bars) or anaerobic (grey bars) conditions. Data are means with standard error from at least two different cultures, assayed in triplicate.

Under free-living denitrifying conditions, MV-dependent nitrate reductase and nitrite reductase activities were about 10 times higher compared to those observed under aerobic conditions (Table 4A and B). 88% and 93% of nitrate reductase and nitrite reductase activities detected in anaerobic growth cells correspond to Nap and NirK enzymes, respectively. Nitric oxide reductase activity was also induced about 5-fold in cells grown under nitrate respiring conditions compared to aerobically grown cells and 75% of such activity was due to Nor encoded by *norCBQD* genes (Table 4C). The

strong induction of NirK and Nor activities under denitrifying conditions might explain the absence of significant levels of nitrite and NO in the growth medium of WT cells after 4 days incubation.

A NR activity [nmol NO ₂ ⁻ produced min ⁻¹ (mg protein) ⁻¹]			
Strain	Genotype	Aerobic	Anaerobic
USDA110	WT	6 ± 1	53 ± 3
GRPA1	<i>napA</i>	5 ± 1	6 ± 1

B Nir activity [nmol NO ₂ ⁻ consumed h ⁻¹ (mg protein) ⁻¹]			
Strain	Genotype	Aerobic	Anaerobic
USDA110	WT	126 ± 24	1671 ± 225
GRK308	<i>nirK</i>	151 ± 9	117 ± 12

C Nor activity [nmol NO consumed min ⁻¹ (mg protein) ⁻¹]			
Strain	Genotype	Aerobic	Anaerobic
USDA110	WT	47 ± 4	257 ± 23
GRC131	<i>norC</i>	43 ± 6	63 ± 2

Table 4. (A) MV-dependent nitrate reductase (NR), (B) nitrite reductase (Nir) and (C) nitric oxide reductase (Nor) activities in free-living cells. *B. japonicum* USDA110, *napA* GRPA1, *nirK* GRK308 and *norC* GRC131 strains were incubated in YEM medium supplemented with 10 mM KNO₃ under aerobic or anaerobic conditions. Data are means ± SE from three independent experiments assayed by using three replicates.

5. DISCUSSION

Several studies have reported direct or indirect evidence for the production of NO in mature nodules (Shimoda *et al.*, 2005; Baudouin *et al.*, 2006; Pii *et al.*, 2007). Recently, Meakin *et al.* (2007) demonstrated that hypoxic conditions cause an increase in LbNO formation within soybean nodules. From the studies above, the question of the possible role of NO in nodules is raised. A direct inhibition of nitrogenase activity by NO has been demonstrated in soybean nodules (Trinchant & Rigaud, 1982). It has been also reported that artificial application of an NO donor (SNAP, *S*-nitro-*N*-acetylpenicillamine) decreased nitrogen fixation activity in *Lotus japonicus* (Shimoda *et al.*, 2009) and *Alnus firma* root nodules (Sasakura *et al.*, 2006). However, the authors did

not establish the physiological conditions which provoke the impairment of nitrogenase activity by NO, as the effect of NO on nitrogenase gene expression was not fully explored. In order to establish the biological relevance of NO formation within nodules, soybean plants were subjected to a physiological stress typical for soybean crops, i.e., flooding which provokes hypoxic stress caused by water-logging on the soil (Bacanamwo & Purcell, 1999; Bailey-Serres & Voesenek, 2008).

A combination of EPR and UV-visible spectroscopies has been used in this work to detect NO bound to Lb in nodules. The EPR signal has been previously established by incubating purified, dithionite-reduced soybean leghaemoglobin *a* (*Lba*) with nitrite (Meakin *et al.*, 2007) or with an NO donor (Mathieu *et al.*, 1998). By using these approaches we have demonstrated that flooding conditions increase the formation of LbNO complexes in soybean nodules.

Several mechanisms by which NO could be produced during plant-rhizobia interactions have been proposed (Pauly *et al.*, 2006). The denitrification pathway is one candidate since nitrite and NO are intermediates of nitrate reduction to N₂. In fact, it has been suggested that nitrate reduction by *B. japonicum* bacteroids contributes to the formation of LbNO complexes in soybean nodules in response to hypoxia (Meakin *et al.*, 2007). In agreement with these findings, here we have found that in soybean nodules where denitrification pathway is disrupted, by inoculating plants with a *napA* deficient mutant, LbNO formation in response to flooding conditions is abolished. Furthermore, we have also demonstrated that nitrite produced by Nap, which accumulates in *nirK* nodules, as well as NO produced by NirK, which formation increases in *norC* nodules, are mainly responsible for the increase of LbNO complexes in soybean nodules in response to flooding. In contrast to our observations, it has been recently suggested that denitrification pathway is not involved in NO production in *M. truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis (Baudouin *et al.*, 2006). Therefore, it may be possible that bacterial denitrification plays a role in NO production within nodules when roots are subjected to specific physiological conditions such as flooding stress.

The presence of basal levels of LbNO detected by UV-visible spectroscopy as well as free NO in *napA* flooded nodules suggests the involvement of other sources of NO, independent of the denitrification pathway, possibly arising from the action of plant enzymes such as nitrate reductase or NOS. NOS-like activity in lupine nodules has been reported by Cueto *et al.* (1996), and recent studies have suggested that NOS contributes

to NO production in *M. truncatula* nodules (Baudouin *et al.*, 2006), but whether a plant NOS is present and functional in soybean nodules is unknown.

The involvement of Nap, NirK and Nor enzymes in LbNO formation in soybean nodules in response to flooding conditions has also been investigated by analyzing MV-dependent nitrate, nitrite and nitric oxide reductase activities in bacteroids from nodules of plants inoculated with the WT *B. japonicum* strain, USDA110 and *napA* GRPA1, *nirK* GRK308 or *norC* GRC131 mutant strains. Levels of MV-dependent nitrate reductase activity in bacteroids of *B. japonicum* cells lacking the functional *napA* gene demonstrated that 100% and 90% of activity detected in WT bacteroids from control and flooded nodules, respectively, was due to *B. japonicum* periplasmic nitrate reductase (Nap) enzyme. However, the presence of WT levels of nitrite reductase activity in *nirK* bacteroids from control plants suggests that another way exists by which nitrite may be reduced in bacteroids in the absence of NirK. In *B. japonicum*, the published genome sequence (Kaneko *et al.*, 2002) reveals the presence of a *nirB* gene, which may encode an assimilatory nitrite reductase that reduces nitrite to ammonium (Lin & Stewart, 1998). However, whether this enzyme is active in *nirK* bacteroids has yet to be addressed. In bacteroids from flooded nodules, 58% of nitrite reductase activity corresponded to NirK suggesting that this enzyme may be responsible for the nitrite accumulation and LbNO formation observed in flooded *nirK* nodules. Although no differences of NO reductase activity were observed between *norC* and WT bacteroids from flooded nodules, a significant increase in NO formation was observed in *norC* nodules compared to WT nodules indicating that NorC is involved in NO reduction in nodules under flooding stress conditions.

Since *nifH* expression decreased in nodules where NO production was induced, and this situation occurred in WT and *norC* flooded nodules, we propose that NO produced through denitrification is involved in the decrease of *nifH* expression under flooding conditions. Supporting this hypothesis, nodule treatment with the NO scavenger, c-PTIO, prevented such decrease. Since nitrite was also proposed as an inhibitor of nitrogenase activity (Trinchant & Rigaud, 1982), it was interesting to analyze *nifH* transcription in flooded *nirK* nodules. Although a significant increase of nitrite and LbNO complexes were detected in *nirK* flooded nodules compared to WT nodules, *nifH* transcription was not affected. This result rules out nitrite as a possible inhibitor of *nifH* gene expression. In *napA* or *nirK* flooded nodules, where NO production from denitrification is blocked, *nifH* expression was unaffected. These

observations strongly support the hypothesis that NO produced, under flooding conditions, by NirK is involved in the decrease of *nifH* expression.

Because NO is cytotoxic, its accumulation by loss of NO reductase activity is a lethal event in denitrifiers (for reviews see Zumft, 1997; van Spanning *et al.*, 2005; 2007). In order to establish whether or not NO effect on *nifH* expression in nodules is a general effect in gene regulation, we analyzed expression in nodules of other genes required for nitrogen fixation such as *nifD*, encoding the α -subunit of MoFe protein of nitrogenase, *fixA*, encoding a β -chain of an electron transfer flavoprotein, and *nifS*, encoding a protein involved in biosynthesis of the metal-containing centres in nitrogenase. Since *fixA* and *nifS* expression were not affected in flooded WT nodules, where NO production was induced, we rule out the possibility that NO has a general toxic effect in gene regulation in nodules.

Flooding induced levels of LbNO complexes in *nirK* nodules compared to WT nodules. However, this stress did not affect nitrogenase activity in *nirK* nodules compared to WT nodules where nitrogenase activity was significantly decreased. Although LbNO formation was significantly enhanced by flooding in *norC* nodules, when compared with WT nodules, nitrogenase activity rates were very similar in both WT and *norC* flooded nodules. These observations lead us to suggest that increase of LbNO complexes in nodules does not impair nitrogen fixation. We propose an additional role for Lb in root nodules by scavenging NO formed either directly during denitrification by the action of NirK or indirectly via non-enzymatic reduction of accumulated nitrite within the reducing environment of the nodule and protecting nitrogenase activity. In support of our hypothesis, it has been proposed that the presence of large amounts of Lb in root nodules where only a minimum proportion is bound to oxygen and which has a high affinity for NO can act as an NO scavenger modulating NO bioactivity (Herold & Puppo, 2005). This may also be a function of non-symbiotic hemoglobins since it has been very recently shown that overexpression of class 1 non-symbiotic plant hemoglobins enhances symbiotic nitrogen fixation activity by removing NO as an inhibitor of nitrogenase (Shimoda *et al.*, 2009). Under denitrifying free-living conditions NirK and Nor enzymes are highly active and may function to detoxify nitrite and nitric oxide respectively, since *nirK* and *norC* mutant strains are defective in anaerobic growth as previously shown by Velasco *et al.* (2001) and Mesa *et al.* (2002). However, under symbiotic conditions bacteroidal nitrite reductase and NO reductase activities are about 14-, and 7-times, respectively, lower than those detected under free-

living anaerobic conditions. These observations allow us to propose that in nodules, it is Lb, and not the NirK or Nor enzymes that acts as the main system for detoxifying NO produced by bacteroidal denitrification in response to flooding conditions.

The involvement of NO produced by NirK in expression of nitrogenase genes has also been confirmed under free-living conditions by analyzing β -galactosidase activity of a *nifD*'-*lacZ* translational fusion. After incubation under anaerobic conditions, expression of *nifD* was decreased in a *norC* mutant that accumulated NO in the medium. However, nitrite accumulation in *nirK* growth medium did not affect *nifD* expression. These observations strongly support the results found under symbiotic conditions where, in WT and *norC* flooded nodules, induction of NO formation correlated well with a decrease in *nifH* expression. In contrast to symbiotic conditions, WT free-living cells grown under anaerobic conditions did not accumulate NO and consequently *nifD* expression was unaffected. The different NO reductase activity rates found in both *B. japonicum* free-living and symbiotic WT cells, might explain the discrepancy found in NO accumulation and nitrogenase expression in both *B. japonicum* forms in response to low oxygen conditions. Our observations in free-living conditions confirmed the results found under symbiotic conditions and allow us to propose that NO produced by NirK is a potential inhibitor of nitrogenase gene expression. However, the mechanism of such inhibition is still unknown. NO is supposed to be a potent inhibitor of the O₂ sensor, FixL, which is a component of the FixLJ-FixK₂ regulatory cascade which controls nitrogen fixation (Fischer, 1994; Gilles-González *et al.*, 1994; Winkler *et al.*, 1996). Alternatively, it is also possible that NO reacts directly with the nitrogen fixation regulatory protein NifA (Fischer, 1994) inactivating the protein in a similar way as it has been demonstrated for the O₂-responsive regulator FNR in *Escherichia coli* (Cruz-Ramos *et al.*, 2002; Pullan *et al.*, 2008). Since NifA is the direct transcriptional activator of nitrogen fixation genes, a possible effect of NO on the regulation of the nitrogen fixation genes via this activator would result in a widespread effect on the transcription of all targets of NifA. Surprisingly, our results show that transcription of two of these targets, *fixA* and *nifS*, is not affected by the presence of NO in hypoxic WT nodules. Recently, Mesa *et al.* (2008) have suggested that the FixK₁ regulon contains a substantial number of negatively controlled genes, most of which belong to the group of genes activated by the NifA protein. In those studies, *nifD* and *nifH* genes belong to these group of genes but not *fixA* and *nifS* genes (Mesa *et al.*, 2008). The authors propose that a decrease in the oxygen concentration to intermediate levels induces the

FixLJ-FixK₂ cascade, and consequently FixK₁, but still represses some NifA-dependent genes via FixK₁. When the oxygen concentration drops further, cells may accumulate higher levels of the active NifA protein, which would gradually override the transient repression by FixK₁. If NifA protein is inactivated by the presence of NO in hypoxic nodules, the repression will not be overcome. The mechanism involved in the down-regulation of nitrogenase genes by NO is the focus of future investigations.

6. MATERIALS AND METHODS

6.1. Bacterial strains and growth conditions.

B. japonicum USDA110 (US Department of Agriculture, Beltsville, MD), and *napA* GRPA1 (Delgado *et al.*, 2003), *nirK* GRK308 (Velasco *et al.*, 2001), and *norC* GRC131 (Mesa *et al.*, 2002) mutant derivative strains were used in this study. To monitor *nifD* expression in free-living cells, plasmid pRJ1042 (Acuña *et al.*, 1987), containing a *nifD*'-*lacZ* translational fusion, was integrated by homologous recombination into the chromosome of *B. japonicum* USDA110, GRK308 and GRC131, resulting in strains 1042, 0110, and 0410, respectively. Integration of the fusion plasmid into the chromosome was tested by hybridizations performed with digoxigenin-dUTP-labelled *lacZ* DNA as a probe. The chemiluminescence method was applied to detect hybridization bands. *B. japonicum* strains were routinely grown in peptone-salts-yeast extract (PSY) medium (Regensburger & Hennecke, 1983) at 28 °C. For determination of β -Galactosidase activity and nitrite and NO accumulation in free-living conditions, cells were grown aerobically or anaerobically for 72 h at 30 °C in yeast extract-mannitol (YEM) medium (Vincent, 1974) supplemented with 10 mM KNO₃. Anaerobic growth was performed in completely filled, rubber-stoppered serum bottles. Initial OD₆₀₀ of the cultures was about 0.3. Antibiotics were added to cultures at the following concentrations ($\mu\text{g ml}^{-1}$): chloramphenicol, 15; tetracycline, 100; spectinomycin, 200; streptomycin, 200; kanamycin, 200.

6.2. Plant growth conditions.

Soybean (*Glycine max* L. Merr., cv. Williams) seeds were surface-sterilized with 96% ethanol (v/v) for 30 s, immersed in H₂O₂ (15 %, v/v) for 8 min, then washed with sterile water and germinated in darkness at 28 °C. Selected seedlings were planted in

autoclaved pots filled with a sand-vermiculite mixture (1:1). Plants (four per pot) were inoculated at sowing with 1 ml of a single bacterial strain (10^8 cells ml^{-1}) and grown in a controlled environmental chamber under conditions previously described (Delgado *et al.*, 1998). Plants were watered four times a week, alternatively with water and with a nitrogen-free mineral solution (Rigaud & Puppo, 1975). In order to induce denitrification activity, after growth for 15 days, plants were provided with the same mineral solution supplemented with 4 mM KNO_3 . It has previously been demonstrated that treatment of plants with 4 mM KNO_3 results in denitrification activity, and it does not inhibit nodule formation or nitrogenase activity (Mesa *et al.*, 2004, Meakin *et al.*, 2007). After growth for 28 days, a set of plants was subjected to flooding by submerging pots to 1 cm above soil level in a quarter-strength mineral solution. The solution level was maintained by daily additions of solution, which was added gently to avoid aeration. Non-flooded treatments (control plants) received the quarter-strength mineral solution four times a week. Nodules were harvested from 34-day-old plants and were frozen into liquid nitrogen and stored at -80 °C, except those nodules to be used for enzyme activities and NO determination.

6.3. Bacterioid isolation.

Bacterioids were prepared as previously described (Mesa *et al.*, 2004). In brief, 1.5 g of fresh nodules was ground in 7.5 ml Tris/HCl (pH 7.5) supplemented with 250 mM mannitol. The homogenate was filtered through four layers of cheesecloth and centrifuged at 250 g at 4 °C for 5 min to remove nodule debris. The resulting supernatant was recentrifuged at 12 000 g at 4 °C for 10 min to pellet the bacterioids. The bacterioids were washed twice with 50 mM Tris/HCl (pH 7.5) and resuspended in a final volume of 2.5 ml.

6.4. Analytical methods.

For determination of methyl-viologen (MV)-dependent nitrate and nitrite reductase activities, aliquots of bacterioid or free-living cells preparations (0.2-0.4 mg protein) were added to a reaction mixture (KNO_3 , 10 mM; or NaNO_2 , 200 μM ; MV, 200 μM ; phosphate buffer pH 7.5, 10 mM) and the reaction started with the addition of sodium dithionite. The reactions were run at 30 °C for 15 min and stopped through the oxidation of the sodium dithionite by vortexing. Controls were run in parallel, but in these reactions, the sodium dithionite was oxidised at the start of the reaction. Nitrite

was estimated after diazotation by adding the sulfanilamide/naphthylethylene diamine dihydrochloride reagent (NNEDA) (Nicholas & Nason, 1957).

For determination of NO reductase activity in bacteroids and free-living cells a kinetic MV-dependent assay was used. For each assay, a 3 ml cuvette was filled with 2.5 ml of 10 mM phosphate buffer (pH 7.5), 100 μ l bacteroid preparation or cell solution (0.2-0.4 mg protein), and 25 μ l 100mM MV solution, sealed with a mini suba seal, and made anaerobic by sparging with oxygen-free nitrogen gas for 10 minutes. A 100 mM sodium dithionite solution was freshly made and sparged before its addition with a gas-tight Hamilton syringe to the cuvette. Enough sodium dithionite was added to turn the solution blue, with an absorbance of approximately 2 at 600 nm in the spectrophotometer (Aminco DW-2000 or Hitachi U-3310). Once a steady base-line was observed, 100 μ l of a saturated NO solution was added to the cuvette to begin the reaction. Each assay was run until the absorbance had dropped to zero, that is, when all MV was oxidised.

β -galactosidase activities were determined with permeabilized cells from at least three independently grown cultures as previously described (Miller, 1972).

The protein concentration of bacteroids and free-living cells solutions was estimated by using the Bio-Rad assay, with a standard curve of varying BSA concentrations.

Leghemoglobin content was measured by fluorimetry as described by LaRue and Child (1978). 0.3 g of nodules were grounded in 6 ml Lb extraction buffer ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 40 mM (pH 7.4); $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 10 mM (pH 7.4); $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0.02%; NaHCO_3 0.1%) supplemented with 0.1 g PVPP. The homogenate was centrifugated at 12000 g at 4 °C for 20 min to retain the supernatant. 50 μ l of clear supernate and 3 ml saturated oxalic acid were added to screw-capped tubes which were sealed and heated for 30 min at 120 °C in an autoclave, then cooled to room temperature. The fluorescence of the solutions was measured with a Shimadzu spectrophotofluorometer equipped with a mercury-xenon lamp and a RF-549 red-sensitive photomultiplier. The excitation wavelength was 405 nm and the emission monochromator setting was 650 nm. The difference in fluorescence between heated and unheated samples was proportional to heme protein concentration.

Acetylene-dependent ethylene production was assayed on fresh detached nodules. A Hewlett-Packard model 5890 gas chromatograph (Agilent Technologies,

S.L., Madrid, Spain) equipped with a flame ionization detector was operated with a Molecular Sieve 5A (60-80 mesh) column (180x0.32 cm) (Agilent Technologies, S.L., Madrid, Spain). N₂ at 60 ml min⁻¹ served as a carrier gas. Oven, injector and detector temperature were 60, 90 and 110 °C, respectively. Nodules (20-30) were placed in 17-ml tubes, filled with 10% acetylene, and sampled (0.5 ml sample) for ethylene after 10 and 20 min. Concentration of ethylene in each sample was calculated from standards of pure ethylene.

For determination of nitrite in nodules, 0.5 g of nodules was homogenized with 2 ml 1 M zinc acetate and centrifuged at 12000 g at 4 °C for 5 min. For the determination of nitrite in free-living cultures, 1 ml samples of the cultures were centrifuged at 8000 g for 3 min to remove the cells. The resultant supernatants from the nodule extracts or from the cells cultures were mixed with 1 vol. 100% ice-cold ethanol and centrifuged for a further 5 min. The nitrite concentration of the final supernatant was determined as described above.

NO production in free-living cells was measured amperometrically using a NO electrode (Apollo 4000, World Precision Instruments, Inc., USA) comprising a water-jacketed (30 °C) chamber, stirred magnetically. The membrane covered electrode was situated at the bottom of the chamber above the stirrer. For experimental assays, the chamber was filled with 2 ml of YEM, to which 100 µl of a concentrated cell suspension (3 mg ml⁻¹ protein) were added. After the cells had consumed the oxygen present in the chamber by adding 90 µl of sodium succinate 1 M, 30 µl of NaNO₂ 100 mM were added with a Hamilton syringe and the NO production was analysed.

6.5. Detection of NO in nodules.

A stock solution of DAF-FM (Invitrogen) (7 mM in dimethylsulfoxide) was diluted 1000-fold in water before use. Fresh nodules were incubated with the diluted DAF-FM solution for 1 h in the dark at 25 °C. After incubation, fluorometric measurements of the solution were performed in a fluorometer (QM200, Photon Technology International) with 495 nm excitation and 515 nm emission wavelength (2 nm band width).

6.6. Treatment of nodules with a NO scavenger.

Fresh nodules were incubated with distilled water containing 2 mM c-PTIO (carboxy-2-phenyl-4,4,5,5-tetramethyl-imidazoline-1-oxyl-3-oxide, Invitrogen) for 30 min (detection of NO) or for 3 h (transcript levels) in the dark at 25 °C.

6.7. Whole nodule EPR spectroscopy.

Whole nodule EPR spectroscopy was performed essentially as described by Meakin *et al.* (2007). Intact, frozen root nodules (between 2.5 and 2.8 mm in diameter) were transferred individually to 12 cm quartz EPR tubes with 3 mm internal diameter, under liquid nitrogen. Each sample contained a total biomass of 160 ± 10 mg. Nodules were closely packed and filled the tube to a depth of ca. 30 mm. A 10 cm length of ethylene-tetrafluoroethylene tubing (GE Healthcare) was inserted into the tube and secured to allow liquid gas boil-off, but prevent nodule movement during sample loading and measurement. In the absence of nodules, neither the tubes nor tubing gave rise to any EPR signal. EPR spectra were recorded using a Bruker ER200D spectrometer, fitted with a dual mode cavity (type ER4116DM), which was interfaced to an ELEXSYS control system (Bruker Analytische Messtechnik GmbH) and equipped with a variable temperature liquid helium flow cryostat (Oxford Instruments, UK). Spectra were recorded at 41 ± 1 K. Microwave frequency was 9.683 GHz (X-band) with 2 mW power applied. Spectra are the average of three scans with modulation amplitude, 0.3 mT (3 Gauss) and signal gain, 2.83×10^4 .

6.8. UV-visible spectroscopy.

For the quantification of the percentage of Lb bound to NO within nodules, Lb extracts were prepared from nodules by homogenising 0.3 g of nodules with 4 ml Lb extraction buffer and centrifuging at 12000 g at 4 °C for 20 min to retain the supernatant. Absorption spectra from 300-700 nm at 20 °C were recorded from 1 ml reduced and nitrosylated nodule extracts using a Hitachi U-3310 Spectrophotometer linked to a circulating BC-10 water bath (Fisher Scientific). Absorption measurements were taken from the spectra to allow quantification of the nodular LbNO following the protocol previously described by Meakin *et al.* (2007).

6.9. Transcript levels.

Total RNA was isolated from nodules using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), treated with DNaseI Amplification Grade (Invitrogen) and reverse transcribed using SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). For each RNA sample, control experiments in which the reverse transcriptase step was omitted were done to confirm the absence of any residual DNA. Quantitative RT-PCR was performed in a iQ5 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) using Platinum Taq DNA Polymerase, SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain and the 10 mM dNTP Set (Invitrogen) and specific primers for genes expressed in bacteroids (see supplemented table S1). The PCR program consisted of an initial denaturation and Taq activation step of 3 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C, 45 s at 60 °C, and 45 s at 72 °C. All reactions were set up in triplicate. The generation of specific PCR products was confirmed by melting curve analysis. The mRNA levels were normalized against *gapA* gene (Yang *et al.*, 2006). Values of treated nodules were expressed relative to those of control nodules using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak & Schmittgen, 2001).

7. ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grant AGL2006-13848-CO2-02/AGR from Ministerio de Educación y Ciencia, and 107PICO312 from CYTED. Support from the Junta de Andalucía (BIO-275) is also acknowledged, as is the financial support from CSIC (2007GB0035) and from CSIC/CONACYT (2005MX0032) for collaborations with UEA (UK) and Centro de Ciencias Genómicas (México). We thank H. Hennecke and H-M Fischer for the gift of plasmid pRJ1042. C. Sánchez was supported by a fellowship from the CSIC (I3P). DJR is the recipient of a Royal Society Wolfson Merit Award.

8. LITERATURE CITED

Acuña, G., Álvarez-Morales, A., Fischer, H.-M., and Hennecke, H. 1987. A vector for the site-directed, genomic integration of foreign DNA into soybean root-nodule bacteria. *Plant Mol. Biol.* 9: 41-50.

- Appleby, C.A. 1992. The origin and functions of hemoglobin in plants. *Sci. Progress.* 76: 365-398.
- Bacanamwo, M. and Purcell, L.C. 1999. Soybean dry matter and N accumulation responses to flooding stress, N sources and hypoxia. *J. Exp. Bot.* 50: 689-696.
- Bailey-Serres, J. and Voeselek, L.A.C.J. 2008. Flooding Stress: Acclimations and Genetic Diversity. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:313-39.
- Baudouin, E., Pleuchot, L., Engler, G., Pauly, N., and Puppo, A. 2006. Nitric oxide is formed in *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* functional nodules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19: 970-975.
- Bedmar, E.J., Robles, E.F., and Delgado, M.J. 2005. The complete denitrification pathway of the symbiotic nitrogen-fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochem. Soc. Trans.* 33: 141-144.
- Besson-Bard, A., Pugin, A., and Wendehenne, D. 2008. New Insights into Nitric Oxide Signaling in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 21-39.
- Bethke, P.C., Badger, M.R., and Jones, R.L. 2004. Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell.* 16: 332-341.
- Cruz-Ramos, H., Crack, J., Wu, G., Hughes, M.N., Scott, C., Thomson¹, A.J., Green, J., and Poole, R.K. 2002. NO sensing by FNR: regulation of the *Escherichia coli* NO-detoxifying flavohaemoglobin, Hmp. *The EMBO J.* 21: 3235-3244.
- Cueto, M., Hernández-Perera, O., Martín, R., Bentura, M.L., Rodrigo, J., Lamas, S., and Golvano, M.P. 1996. Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. *FEBS Lett.* 398: 159-164.
- Delgado, M.J., Bedmar, E.J., and Downie, J.A. 1998. Genes involved in the formation and assembly of rhizobial cytochromes and their role in symbiotic nitrogen fixation. *Adv. Microbial Phys.* 40: 191-231.
- Delgado, M.J., Bonnard, N., Tresierra-Ayala, A., Bedmar, E.J., and Müller, P. 2003. The *Bradyrhizobium japonicum* *napEDABC* genes encoding the periplasmic nitrate reductase are essential for nitrate respiration. *Microbiology.* 149: 3395-3403.
- Delledonne, M. 2005. NO news is good news for plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 390-396.
- Dordas, C. 2009. Nonsymbiotic haemoglobins and stress tolerance in plants. *Plant Sci.* 176: 433-440.

- Ferrarini, A., De Stefano, M., Baudouin, E., Pucciariello, C., Polverari, A., Puppo, A., and Delledonne, M. 2008. Expression of *Medicago truncatula* genes responsive to nitric oxide in pathogenic and symbiotic conditions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21: 781-790.
- Fischer, H.-M. 1994. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol. Rev.* 58: 352-386.
- Gilles-González, M.A., González, G., and Perutz, M.F. 1994. Heme-based sensors, exemplified by the kinase FixL, are a new class of heme protein with distinctive ligand binding and autoxidation. *Biochemistry.* 33: 8067-8073.
- Herold, S. and Puppo, A. 2005. Oxyleghemoglobin scavenges nitrogen monoxide and peroxynitrite: a possible role in functioning nodules? *J. Biol. Inorg. Chem.* 10: 935-945.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Minamisawa, K., Uchiumi, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Iriguchi, M., Kawashima, K., Kohara, M., Matsumoto, M., Shimpo, S., Tsuruoka, H., Wada, T., Yamada, M., and Tabata, S. 2002. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res.* 9: 189-197.
- LaRue, T.A. and Child, J.J. 1979. Sensitive fluorometric assay for leghemoglobin. *Ana. Biochem.* 92: 11-15.
- Lin, J.T. and Stewart, V. 1998. Nitrate assimilation by bacteria. *Adv. Micro. Phys.* 39: 1-30.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻[$\Delta\Delta C(T)$] method. *Methods.* 25: 402-408.
- Mathieu, C., Moreau, S., Frendo, P., Puppo, A., and Davies, M.J. 1998. Direct detection of radicals in intact soybean nodules: presence of nitric oxide-leghemoglobin complexes. *Free. Radic. Biol. Med.* 24: 1242-1249.
- Meakin, G.E., Jepson, B., Bedmar, E.J., Richardson, D.J., and Delgado, M.J. 2006. The role of *Bradyrhizobium japonicum* nitric oxide reductase in nitric oxide detoxification in soya bean root nodules. *Biochem. Soc. Trans.* 34: 195-196.
- Meakin, G.E., Bueno, E., Jepson, B., Bedmar, E.J., Richardson, D.J., and Delgado, M.J. 2007. The contribution of bacteroidal nitrate and nitrite reduction to the formation of nitrosylleghaemoglobin complexes in soybean root nodules. *Microbiology.* 153: 411-419.

- Mesa, S., Velasco, L., Manzanera, M.E., Delgado, M.J., and Bedmar, E.J. 2002. Characterisation of the *norBCQD* genes, encoding nitric oxide reductase, in the nitrogen fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Microbiology*. 148: 3553-3560.
- Mesa, S., de Dios Alché, J., Bedmar, E.J., and Delgado, M.J. 2004. Expression of the *nir*, *nor* and *nos* denitrification genes from *Bradyrhizobium japonicum* in soybean root nodules. *Physiol. Plantarum*. 120: 205-211.
- Mesa, S., Hauser, F., Friberg, M., Malaguti, E., Fischer, H.-M., and Hennecke, H. 2008. Comprehensive assesment of the regulons controlled by the FixLJ-FixK₂-FixK₁ cascade in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 190: 6568-6579.
- Meyer, C., Lea, U.S., Provan, F., Kaiser, W.M., and Lillo, C. 2005. Is nitrate reductase a major player in the plant NO (nitric oxide) game? *Photosyn. Res.* 83: 181-189.
- Miller, J.H. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Minchin, F.R. 1997. Regulation of oxygen diffusion in legume nodules. *Soil. Biol. Biochem.* 29: 881-888.
- Nagata, M., Murakami, E., Shimoda, Y., Shimoda-Sasakura, F., Kucho, K., Suzuki, A., Abe, M., Higashi, S., and Uchiumi, T. 2008. Expression of a class 1 hemoglobin gene and production of nitric oxide in response to symbiotic and pathogenic bacteria in *Lotus japonicus*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21: 1175-1183.
- Nicholas, D.J.D. and Nason, A. 1957. Determination of nitrate and nitrite. In *Methods in Enzymology*. Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. (eds.). New York: Academic Press, pp. 981-984.
- Pauly, N., Pucciariello, C., Mandon, K., Innocenti, G., Jamet, A., Baudouin, E., Hérouart, D., Frendo, P., and Puppo, A. 2006. Reactive oxygen and nitrogen species and glutathione: key players in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *J. Exp. Bot.* 57: 1769-1776.
- Pii, Y., Crimi, M., Cremonese, G., Spena, A., and Pandolfini, T. 2007. Auxin and nitric oxide control indeterminate nodule formation. *BMC Plant Biol.* 8: 7-21.
- Pullan, S.T., Gidley, M.D., Jones, R.A., Barrett, J., Stevanin, T.M., Read, R.C., Green, J., and Poole, R.K. 2007. Nitric oxide in chemostat-cultured *Escherichia coli* is sensed by Fnr and other global regulators: unaltered methionine biosynthesis indicates lack of S nitrosation. *J. Bacteriol.* 189: 1845-1855.

- Regensburger, B. and Hennecke, H. 1983. RNA polymerase from *Rhizobium japonicum*. Arch. Microbiol. 135: 103-109.
- Rigaud, J. and Puppo, A. 1975. Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacteroids. J. Gen. Microbiol. 88: 223-228.
- Robles, E.F., Delgado, M.J., Krell, T., Cutruzzolà, F., and Bedmar, E.J. Nitrogen oxides regulation of denitrification genes and molecular characterization of the *Bradyrhizobium japonicum* NnrR transcriptional regulator. Submitted to *J. Bacteriol.*
- Sasakura, F., Uchiumi, T., Shimoda, Y., Suzuki, A., Takenouchi, K., Higashi, S., and Abe, M. 2006. A class 1 hemoglobin gene from *Alnus firma* functions in symbiotic and nonsymbiotic tissues to detoxify nitric oxide. Mol. Plant-Microbe Interact. 19: 441-450.
- Shimoda, Y., Nagata, M., Suzuki, A., Abe, M., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Higashi, S., and Uchiumi, T. 2005. Symbiotic rhizobium and nitric oxide induce gene expression of non-symbiotic hemoglobin in *Lotus japonicus*. Plant Cell Physiol. 46: 99-107.
- Shimoda, Y., Shimoda-Sasakura, F., Kucho, K., Kanamori, N., Nagata, M., Suzuki, A., Abe, M., Higashi, S., and Uchiumi, T. 2009. Overexpression of class 1 plant hemoglobin genes enhances symbiotic nitrogen fixation activity between *Mesorhizobium loti* and *Lotus japonicus*. Plant J. 57: 254-63.
- Stöhr, C., Strube, F., Marx, G., Ullrich, W.R., and Rockel, P. 2001. A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. Planta. 212: 835-841.
- Trinchant, J.-C. and Rigaud, J. 1982. Nitrite and nitric oxide as inhibitors of nitrogenase from soybean bacteroids. Appl. Environ. Microbiol. 44: 1385-1388.
- van Spanning, R.J., Delgado, M.J., and Richardson, D.J. 2005. The nitrogen cycle: denitrification and its relationship to N₂ fixation. In Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology and the environment. Werner, D. and Newton, W.E. (eds.). Springer Netherlands, pp. 277-342.
- van Spanning, R.J., Richardson, D.J., and Ferguson, S.J. 2007. Introduction to the biochemistry and molecular biology of denitrification. In Biology of the nitrogen cycle. Bothe, H., Ferguson, S.J., and Newton, W.E. (eds.). Elsevier, pp. 3-20.

- Velasco, L., Mesa, S., Delgado, M.J., and Bedmar, E.J. 2001. Characterization of the *nirK* gene encoding the respiratory, Cu-containing nitrite reductase of *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1521: 130-134.
- Velasco, L., Mesa, S., Xu, C., Delgado, M.J., and Bedmar, E.J. 2004. Molecular characterization of *nosRZDFYLX* genes coding for denitrifying nitrous oxide reductase of *Bradyrhizobium japonicum*. *Antonie van Leeuwenhoek.* 85: 229-235.
- Vincent, J.M. 1974. Root-nodule symbioses with *Rhizobium*. In *The Biology of Nitrogen Fixation*. Quispel, A. (ed.). New York: Elsevier, pp. 265-341. Elsevier.
- Winkler, W.C., Gonzalez, G., Wittenberg J.B., Hille, R., Dakappagari, N., Jacob, A., González, L.A., and Gilles, M.A. 1996. Nonsteric factors dominate binding of nitric oxide, azide, imidazole, cyanide, and fluoride to the Rhizobial heme-based oxygen sensor FixL. *Chem. Biol.* 3: 841-850.
- Yamasaki, H., Sakihama, Y., and Takahashi, S. 1999. An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends Plant Sci.* 4: 128-129.
- Yamasaki, H. and Sakihama, S. 2000. Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett.* 468: 89-92.
- Yang, J., Sangwan, I., Lindemann, A., Hauser, F., Hennecke H., Fischer H.-M., and O'Brian, M.R. 2006. *Bradyrhizobium japonicum* senses iron through the status of haem to regulate iron homeostasis and metabolism. *Mol.Microbiol.* 60: 427-437.
- Zumft, W.G. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 533-616.

9. SUPPLEMENTAL MATERIAL
9.1. Supplemental table S1.

Table S1. Primers used for quantification of transcripts from bacteroids

Gene	Forward	Reverse
<i>gapA</i>	GACCAGACCAAGGTGCAGAAC	AAGCCCCACTCGTTGTCGTA
<i>nifH</i>	CGGCAGACCGACAAGGAA	ATCAGTTGAGTGCCAAGCTTCTT
<i>nifD</i>	ACCATACGATGTTGCGATCA	CCCGTAGTCCCATCTCTTCA
<i>nifS</i>	ATTTCCCGTGAAGTGTCTGG	ACTTTACCAATGGCCTGCAC
<i>fixA</i>	GGCGAAATTACCGTGCTTAC	GCGATCAGCACCATAAGTCA

CAPÍTULO 2

**Physiological significance of *Bradyrhizobium japonicum* denitrification
in symbiotic nitrogen fixation of soybean plants under flooding
conditions**

Cristina Sánchez¹, Germán Tortosa¹, Antonio Delgado², Eulogio J. Bedmar¹ and María
J. Delgado^{1,*}

¹Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín,
CSIC, P. O. Box 419, 18080-Granada, Spain

²Departamento de Geoquímica Ambiental, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, P.O. Box 419,
18080-Granada, Spain

Manuscrito en preparación

1. RESUMEN

El proceso de desnitrificación realizado por los bacteroides de *Bradyrhizobium japonicum* contribuye a la producción de óxido nítrico (NO) en nódulos de soja en respuesta a encharcamiento. Sin embargo, todavía no se conoce la relevancia fisiológica de la producción de NO vía desnitrificación en la simbiosis *B. japonicum-Glycine max*. En este trabajo, se ha estudiado la implicación de la desnitrificación en la fijación simbiótica de dinitrógeno (N₂) en respuesta a condiciones de encharcamiento, mediante la inoculación de plantas de soja con cepas de *B. japonicum* que tienen mutados los genes *nirK* o *norC*, que codifican la enzima nitrito reductasa de tipo Cu o la óxido nítrico reductasa de tipo c, respectivamente. Después de 7 días de encharcamiento se observó un descenso del número de nódulos (NN) y del peso seco de los nódulos (NDW) de las plantas, y este efecto fue más pronunciado en aquellas inoculadas con la cepa mutante *norC*. Por el contrario, después de 14 días de encharcamiento, se observó un incremento del NN de las plantas inoculadas con la cepa parental y la mutante *norC*, pero no en aquellas inoculadas con la mutante *nirK*. Sin embargo, el NDW no se afectó tras 14 días de encharcamiento, independientemente de la cepa utilizada en la inoculación. El encharcamiento afectó en gran medida el funcionamiento de los nódulos, ya que, al cabo de 7 y 14 días de encharcamiento, se observó un descenso significativo del contenido de leghemoglobina (Lb) de los nódulos derivados de cualquiera de las cepas utilizadas en este estudio, en comparación con los nódulos control. Sin embargo, este efecto fue mayor en nódulos derivados de las plantas inoculadas con la cepa parental o la mutante *norC*, que en los derivados de plantas inoculadas con la mutante *nirK*. La fijación de N₂ se estimó mediante el análisis del contenido del nitrógeno derivado de la fijación simbiótica (FN) en los tallos de las plantas, a través del método de dilución del ¹⁵N. Por medio de esta aproximación, se observó que el efecto negativo provocado por 14 días de encharcamiento sobre la fijación de N₂ fue mayor en las plantas inoculadas con la mutante *norC*. Estos resultados permiten demostrar la significación fisiológica de la hipótesis propuesta previamente, en la que se sugería que el NO producido, por la enzima nitrito reductasa de tipo Cu, en nódulos de soja, tiene un efecto negativo sobre la expresión de los genes de la nitrogenasa.

2. ABSTRACT

Denitrification by *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids contributes to nitric oxide (NO) production within soybean nodules in response to flooding conditions. However, the physiological relevance of NO production by denitrification in *B. japonicum*-*Glycine max* symbiosis is still unclear. In this work, we have established the involvement of denitrification in symbiotic nitrogen fixation in response to flooding conditions by inoculating soybean plants with *B. japonicum* strains lacking the *nirK* or *norC* genes which encode the Cu-containing nitrite reductase and the *c*-type nitric oxide reductase denitrification enzymes, respectively. 7 days flooding decreased nodule number (NN) and nodule dry weight (NDW) of plants, and this effect was more relevant in plants inoculated with the *norC* mutant. By contrary, 14 days flooding increased NN of plants inoculated with the WT and *norC* strains, but not of plants inoculated with the *nirK* mutant. However, NDW was not affected by 14 days flooding regardless of the strain used for inoculation. Nodule functioning was strongly affected by flooding since leghemoglobin (Lb) content of the nodules induced by any of the strains was significantly decreased after 7 or 14 days flooding compared to control plants. However, this effect was more relevant in nodules of plants inoculated with the WT or *norC* mutant than in those inoculated with the *nirK* mutant. Nitrogen fixation was estimated by analyzing nitrogen content in shoots derived from biological nitrogen-fixation (FN) using the ^{15}N isotope dilution technique. By using this approach, we have observed that the negative effect of 14 days flooding on nitrogen fixation was more pronounced in plants inoculated with the *norC* mutant. However, nitrogen fixation of plants inoculated with *nirK* showed the highest tolerance to 14 days flooding. These findings allowed us to demonstrate the physiological significance of the previously proposed hypothesis that NO formed by Cu-containing nitrite reductase in soybean nodules, in response to flooding, has a negative effect on expression of nitrogenase.

3. INTRODUCTION

Denitrification is the biological process by which bacteria reduce sequentially nitrate (NO_3^-) or nitrite (NO_2^-) to dinitrogen (N_2) when oxygen concentration is limiting. Nitrate is reduced to nitrite by either a membrane-bound (Nar) or a periplasmic nitrate reductase (Nap), and nitrite reductases (CuNir or cd_1 Nir) catalyse the reduction of nitrite to nitric oxide (NO). NO is further reduced to nitrous oxide (N_2O) by nitric oxide reductases (cNor, qNor or qCu_ANor) and, finally, N_2O is converted to N_2 by the nitrous oxide reductase enzyme (Nos). The respiratory electron transfer from reducing equivalents to N-oxides is coupled to proton translocation and energy conservation, which permits cell growth under oxygen-limited conditions. Although the denitrification process is initiated by respiratory nitrate reduction, this reaction is not unique to denitrification since it also occurs in ammonification and assimilatory nitrate reduction. Thus it is considered that the defining reaction in denitrification is the reduction of nitrite to the first gaseous intermediate, NO. Comprehensive reviews covering the physiology, biochemistry and molecular genetics of denitrification have been published elsewhere (van Spanning *et al.*, 2005 and 2007; Zumft *et al.*, 1997).

Bradyrhizobium japonicum, the microsymbiont of soybean (*Glycine max*), elicits formation of root nodules where, in addition to the nitrogenase complex the synthesis of the denitrification enzymes is induced (for a review see Delgado *et al.*, 2007). In *B. japonicum*, denitrification depends on the *napEDABC* (Delgado *et al.*, 2003), *nirK* (Velasco *et al.*, 2001), *norCBQD* (Mesa *et al.*, 2002) and *nosRZDYFLX* (Velasco *et al.*, 2004) gene clusters encoding nitrate-, nitrite-, nitric oxide- and nitrous oxide-reductases, respectively. Expression of *B. japonicum nirK*, *norC* and *nosZ* denitrification genes in soybean root nodules has been reported by *in situ* histochemical detection of β -galactosidase activity due to transcriptional fusions of the *nirK*, *norC* and *nosZ* promoter regions to the reporter gene *lacZ* (Mesa *et al.*, 2004). Similarly, isolated bacteroids also expressed the P_{nirK} -*lacZ*, P_{norC} -*lacZ* and P_{nosZ} -*lacZ* fusions (Mesa *et al.*, 2004). Levels of β -galactosidase activity were similar in both bacteroids and nodule sections from plants that were solely N_2 -dependent or grown in the presence of 4 mM KNO_3 , which suggest that oxygen, and not nitrate, is the main factor controlling expression of denitrification genes in soybean nodules (Mesa *et al.*, 2004).

The symbiotic phenotype of *B. japonicum* strains carrying a mutation in either the *nirK*, *norC*, or *nosZ* structural genes has also been reported (Mesa *et al.*, 2004). In

plants not amended with nitrate, *nirK* or *norC* mutants showed a wild-type (WT) phenotype with regard to nodule number and nodule dry weight as well as plant dry weight and nitrogen content. In the presence of nitrate, plants inoculated with either a *nirK* or a *norC* mutant strain showed less nodule dry weight, and lower plant dry weight and nitrogen content relative to those plants inoculated with the WT or a *nosZ* mutant. Nodulation kinetics analyses confirmed that mutation of either the *nirK* or *norC* genes confers on *B. japonicum* a reduced ability for nodulation in soybean plants grown with nitrate (Mesa et al., 2004). However, nodules formed by the parental and mutant strains exhibited similar nitrogenase activities. These results allowed Mesa *et al.* (2004) to suggest that denitrification enzymes play a role in nodule formation rather than in nodule function.

The critical balance between oxygen input and consumption within the nodule may easily be disturbed in the natural environment of the symbiosis by flooding. In fact, N₂-fixing legume-rhizobia symbioses are normally adversely affected by flooding or by long-term exposure to artificially-lowered rhizosphere pO₂ (Bacanmwo & Purcell, 1999; Witty *et al.*, 1986). The poor performance of nodulated legumes under flooded conditions has been attributed mainly to a reduction in the supply of oxygen to the nodules (Arrese-Igor *et al.*, 1993; Bacanamwo & Purcell, 1999; James & Crawford, 1998; Minchin & Summerfield, 1976).

Recently, it has been shown that hypoxia (Meakin *et al.*, 2007) or flooding conditions (Sánchez *et al.*, *unpublished data*) induce NO production in soybean nodules and it is bacteroidal denitrification the main source of NO under these conditions. It has also been demonstrated that NO produced by *B. japonicum* NirK in response to flooding conditions affects nitrogenase genes expression (Sánchez *et al.*, *unpublished data*). However, the physiological relevance of NO production by denitrification in nodules in response to flooding is still unclear. In this work, we have analyzed the symbiotic phenotype, under flooding conditions, of a *B. japonicum nirK* mutant, where NO production from denitrification is blocked, and of a *norC* mutant, which accumulates NO produced through denitrification.

4. RESULTS

4.1. Plant growth.

Table 1 shows shoot dry weight (SDW) and shoot height (SH) of soybean plants that were inoculated or not with the wild-type (WT) *B. japonicum* USDA110 strain, and *nirK* GRK308 or *norC* GRC131 mutant strains, and were subjected or not (control) to flooding conditions. Before flooding treatment (0 days) and after 7 days treatment, no significant differences were observed in SDW and SH among plants (Table 1). After 14 days flooding, SDW of plants inoculated with either the WT or any of the denitrification mutants decreased significantly, around 20%, compared to control plants. However, this effect was not observed in uninoculated plants (Table 1). No significant differences in SDW were observed after 14 days flooding among plants inoculated with any of the strains, however, SDW of control uninoculated plants was significantly lower compared to plants inoculated with either the WT, and the *nirK* or the *norC* mutant strains. After 14 days, flooded plants inoculated with the *nirK* mutant showed higher SH than those inoculated with the WT or *norC* mutant (Table 1).

Strain	Flood treatment	Days of treatment					
		0		7		14	
		SDW (g plant ⁻¹)	SH (cm plant ⁻¹)	SDW (g plant ⁻¹)	SH (cm plant ⁻¹)	SDW (g plant ⁻¹)	SH (cm plant ⁻¹)
USDA110	Control	0.366	19.8	0.876	22.7	1.626 aA	24.9 aA
	Flooded	—	—	0.924	22.7	1.204 bA	25.8 aB
GRK308	Control	0.355	20.2	0.863	23.0	1.621 aA	24.4 bA
	Flooded	—	—	0.948	22.9	1.347 bA	32.5 aA
GRC131	Control	0.313	19.4	0.910	23.1	1.620 aA	25.0 aA
	Flooded	—	—	0.943	23.2	1.336 bA	27.2 aB
Uninoculated	Control	0.344	20.4	0.841	22.7	1.242 aB	25.3 aA
	Flooded	—	—	0.926	23.1	1.199 aB	26.3 aB

Table 1. Shoot dry weight (SDW) and shoot height (SH) of uninoculated plants and plants inoculated with the wild-type *B. japonicum* USDA110, and *nirK* GRK308 or *norC* GRC131 mutant derivatives. Plants were subjected or not (control) to flooding conditions for 7 and 14 days. Values in a column within the same strain followed by the same lower-case letter, and values in a column within the same flood treatment followed by the same capital letter, are not significantly different as determined by the Tukey HSD test at $P \leq 0.05$ (n=10).

4.2. Nodulation.

The effect of flooding and inoculation with the *B. japonicum nirK* or *norC* denitrification mutants on nodule number (NN) (Figure 1A) and on nodule dry weight (mg, NDW) (Figure 1B) per plant was also assessed. Before flooding (0 days), NN of plants inoculated with either the *nirK* or the *norC* mutant strains was significantly lower compared to those inoculated with the WT (Figure 1A, 0 days). However, no significant differences were observed in NDW among plants inoculated with any of the strains (Figure 1B, 0 days). After 7 days flooding, NN per plant decreased approximately 30% in plants inoculated with the WT or *nirK* strain, and 40% in those inoculated with the *norC* strain compared to control plants (Figure 1A, 7 days). Similarly, a higher decrease (56%) of NDW per plant was observed in 7 days flooded plants inoculated with the *norC* mutant compared to those plants inoculated with the WT or *nirK* strains where NDW per plant decreased about 44% (Figure 1B, 7 days). After 14 days flooding, an induction of NN per plant (36%) was observed in plants inoculated with either the WT or *norC* strains. However no significant differences were observed in NN among control and flooded plants inoculated with the *nirK* strain (Figure 1A, 14 days). By contrast to NN, no significant differences were observed in NDW among control and flooded plants inoculated with any of the strain used in this study (Figure 1B, 14 days).

Table 2 shows the ratio between NDW and NN per plant. This parameter is indicative of the individual nodule dry weight (mg per nodule). Before flooding, the individual weight of nodules produced by plants inoculated with the *nirK* strain was significantly higher than that of nodules from plants inoculated with the WT or *norC* strains (Table 2, 0 days). 7 days flooding decreased around 22%, 18% and 17% nodule growth in plants inoculated with either the WT, *nirK* or *norC* strains, respectively, compared to control plants. After 14 days flooding, only a slight decrease (14%) of nodule weight was observed in *nirK* nodules compared to control nodules. However, a significantly higher decrease of about 37% and 41% was observed in WT and *norC* nodules, respectively, after 14 days flooding compared to control plants. These results suggest that 14 days flooding had a stronger effect on WT and *norC* nodule growth compare to *nirK* nodules.

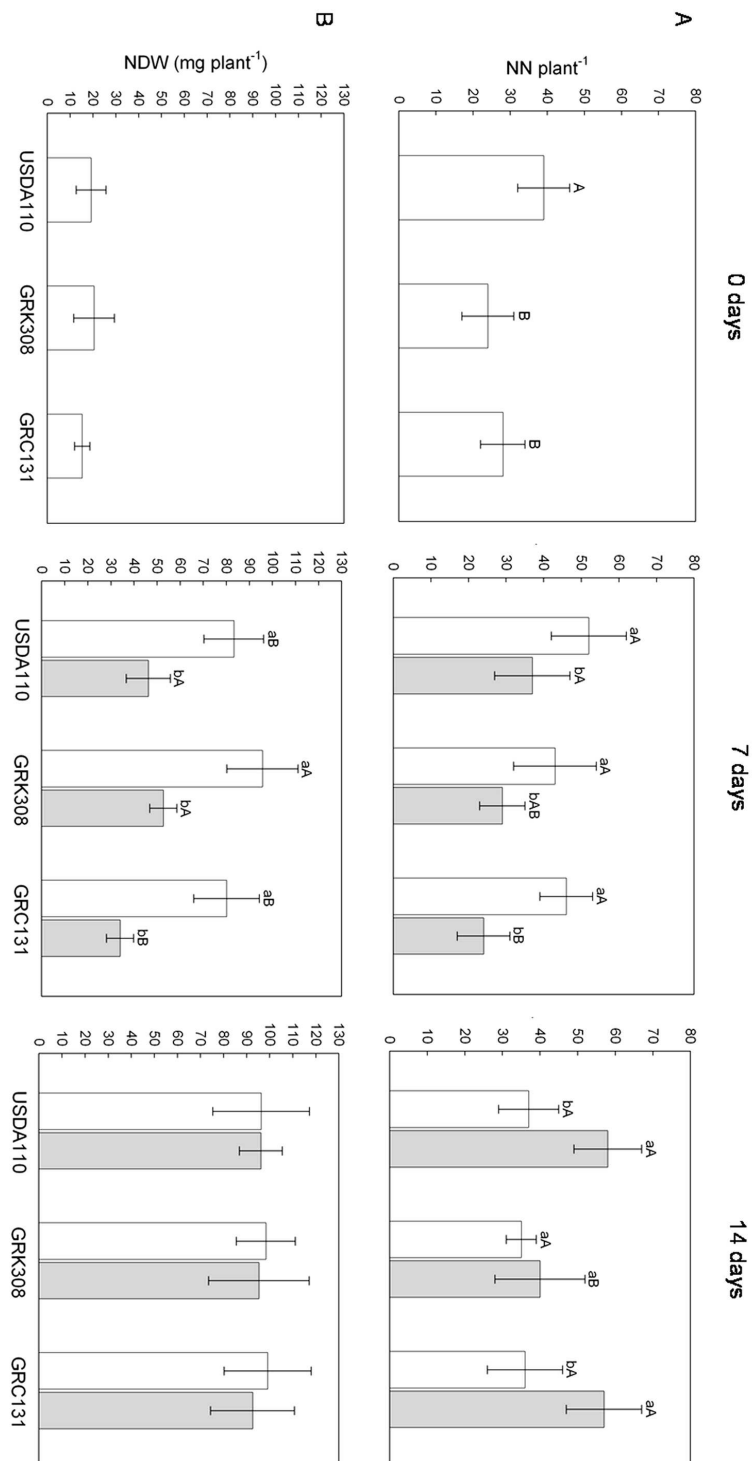


Figure 1. (A) Nodule number (NN) and (B) nodule dry weight (NDW) of plants inoculated with the wild-type *B. japonicum* USDA110, and *nirK* GRK308 or *norC* GRC131 mutant strains. Nodules were isolated from control plants (white bars) or plants subjected to flooding conditions for 7 and 14 days (grey bars). In individual graphs, bars within the same strain marked with the same lower-case letter, and bars within the same flood treatment followed by the same capital letter, are not significantly different as determined by the Tukey HSD test at $P \leq 0.05$ ($n=10$).

Strain	Flood treatment	Dry weight per nodule (mg nodule ⁻¹)		
		Days of treatment		
		0	7	14
USDA110	Control	0.49 B	1.60 aB	2.60 aA
	Flooded	—	1.24 bB	1.65 bB
GRK308	Control	0.85 A	2.22 aA	2.81 aA
	Flooded	—	1.81 bA	2.38 bA
GRC131	Control	0.55 B	1.74 aB	2.75 aA
	Flooded	—	1.44 bB	1.62 bB

Table 2. Dry weight per nodule (ratio between nodule dry weight (NDW) and nodule number (NN) per plant). Plants were inoculated with the wild-type *B. japonicum* USDA110, and *nirK* GRK308 or *norC* GRC131 mutant strains. Nodules were isolated from plants subjected or not (control) to flooding conditions for 7 and 14 days. Values in a column within the same strain followed by the same lower-case letter, and values in a column within the same flood treatment followed by the same capital letter, are not significantly different as determined by the Tukey HSD test at $P \leq 0.05$ (n=10).

4.3. Leghaemoglobin content.

Nitrogen-fixing activity of nodules was examined by analyzing leghaemoglobin (Lb) content. Leghaemoglobin concentration measured fluorometrically shows a correlation with nitrogenase activity according to LaRue & Child (1978). In control plants, *norC* nodules showed a decrease in Lb content compared to those nodules produced by the WT or *nirK* strains (Table 3, 0, 7 and 14 days). 7 days flooding decreased approximately 48%, 37% and 58% the Lb content of nodules from plants inoculated with the WT, *nirK* or *norC* strains, respectively compared to control plants (Table 3, 7 days). After 14 days flooding, about 44%, 26% and 44% decrease of Lb content was observed in WT, *nirK* or *norC* nodules compared to control nodules (Table 3, 14 days).

Strain	Flood treatment	Lb content [mg Lb (g FWN) ⁻¹]		
		Days of treatment		
		0	7	14
USDA110	Control	2.96 A	5.14 aA	7.09 aA
	Flooded	—	2.66 bB	3.93 bA
GRK308	Control	3.27 A	5.37 aA	6.63 aB
	Flooded	—	3.38 bA	4.90 bB
GRC131	Control	1.26 B	4.33 aB	6.00 aC
	Flooded	—	1.79 bC	3.37 bC

Table 3. Leghaemoglobin (Lb) content in nodules. Plants were inoculated with the wild-type USDA110, and *nirK* GRK308 or *norC* GRC131 mutant strains. Nodules were isolated from plants subjected or not (control) to flooding conditions for 7 and 14 days. Values in a column within the same strain followed by the same lower-case letter, and values in a column within the same flooding treatment followed by the same capital letter, are not significantly different as determined by the Tukey HSD test at $P \leq 0.05$ (n=10). FWN, fresh weight nodule.

4.4. Total N and N derived from biological N₂ fixation.

The effect of flooding and inoculation with the *nirK* or *norC* *B. japonicum* denitrification mutants on nitrogen fixation was evaluated by using the ¹⁵N isotope dilution technique. Table 4 shows the ¹⁵N enrichment (%atom ¹⁵N excess), the estimation of the proportion of nitrogen derived from atmosphere (%Ndfa), total nitrogen content (TN), and fixed-nitrogen content (FN) of shoots from soybean plants that were inoculated or not with the WT *B. japonicum* USDA110 strain, and *nirK* GRK308 or *norC* GRC131 mutant strains and were subjected or not (control) to 14 days flooding conditions. Regardless of the strain used for inoculation, TN of inoculated plants was consistently higher compared to that of uninoculated plants (Table 4). Flooding did not affect TN in uninoculated plants. By contrast, TN of plants inoculated with any of the strains strongly decreased by flooding. However, flooded plants inoculated with the *nirK* strain showed a significantly higher TN of around 11% and 17%, compared to plants inoculated with the WT or the *norC* mutant, respectively. Nitrate uptake from the mineral solution (using ¹⁵N labelling) by uninoculated plants was consistently higher than that by inoculated plants (Table 4, %Atom ¹⁵N excess). After 14 days flooding, rate of ¹⁵N uptake by plants inoculated with the *norC* mutant

increased significantly around 17% and 27% compared to plants inoculated with the WT or the *nirK* mutant, respectively. However, no significant changes of ^{15}N uptake were observed after 14 days flooding in uninoculated plants. N derived from the biological N_2 fixation was examined in shoots by estimation of %Ndfa (Table 4) as is indicated in Material and Methods. After 14 days flooding %Ndfa of plants inoculated with any of the strains strongly decreased by flooding. However, the decrease on %Ndfa by plants inoculated with the *norC* mutant was significantly higher, around 17% and 32%, compared to plants inoculated with the WT or the *nirK* mutant, respectively. Similarly, FN by plants inoculated with the *norC* mutant decreased significantly about 28% and 42% compared to plants inoculated with the WT or the *nirK* mutant, respectively (Table 4, FN). These results indicate that the negative effect of flooding on N_2 fixation was more pronounced in plants inoculated with the *norC* mutant compared to those inoculated with the WT or the *nirK* strains. By contrast, plants inoculated with the *nirK* mutant showed the highest tolerance to flooding, since the decrease of %Ndfa and FN caused by flooding in plants inoculated with the *nirK* mutant was less pronounced than that observed in plants inoculated with either the WT or the *norC* mutant.

Strain	Flood treatment	Atom ^{15}N			
		excess (%)	Ndfa (%)	TN (mg g^{-1})	FN (mg g^{-1})
USDA110	Control	1.31 bB	70 aA	29.2 aA	20.4 aAB
	Flooded	2.61 aBC	45 bAB	14.8 bB	6.5 bB
GRK308	Control	1.04 bB	76 aA	28.9 aA	22.0 aA
	Flooded	2.20 aC	54 bA	16.7 bA	9.0 bA
GRC131	Control	1.34 bB	69 aA	27.9 aA	19.4 aB
	Flooded	3.00 aB	37 bB	13.9 bB	5.2 bB
Uninoculated	Control	4.38 aA	—	10.5 aB	—
	Flooded	4.75 aA	—	11.3 aC	—

Table 4. ^{15}N enrichment (%atom ^{15}N excess), estimation of the proportion of nitrogen derived from atmosphere (%Ndfa), total nitrogen content (TN), and fixed-nitrogen content (FN) of shoot tissue of uninoculated plants and plants inoculated with the wild-type USDA110, and *nirK* GRK308 or *norC* GRC131 mutant strains. Plants were subjected or not (control) to flooding conditions for 14 days. Values in a column within the same strain followed by the same lower-case letter, and values in a column within

the same flood treatment followed by the same capital letter, are not significantly different as determined by the Tukey HSD test at $P \leq 0.05$ ($n=10$).

5. DISCUSSION

The hypoxic conditions within nodules not only allows the maintenance of nitrogenase activity, but also the expression of genes involved in denitrification process (Mesa *et al.*, 2004; Meakin *et al.*, 2007). Although an excess of fixed nitrogen inhibits the formation and functioning of nodules, nitrate in small doses, could be used for ATP generation by denitrifying bacteroids, thus improving energy availability for nitrogenase activity. In fact, *B. japonicum* bacteroids isolated from nodules were capable of N_2 fixation using nitrate as an electron acceptor for energy conservation (O'Hara & Daniel, 1985). Several publications suggest that N_2 fixation and denitrification, two processes that are antagonistic in the nitrogen cycle, may perform complementary functions in the cells of symbiotic rhizobia that would be important for survival of bacteria inside nodules (reviewed by Lucinski *et al.*, 2002).

In soybean nitrate-grown plants, inoculation with either a *B. japonicum nirK* or *norC* mutants lacking the respiratory Cu-containing nitrite reductase or c-type nitric oxide reductase, respectively, decreased nodule dry weight (NDW) and consequently a decrease in plant dry weight (SDW) was also observed (Mesa *et al.*, 2004). In contrast to these observations, in our work, no differences in NDW and SDW were observed among non-flooded plants inoculated with either the WT, *nirK* or *norC* mutant strains. The apparent discrepancy with the results presented here could be due to the different plant growth conditions, since in Mesa *et al.* (2004), plants were grown from the beginning in the presence of 4 mM KNO_3 , whereas here nitrate was added to the nutrient solution after 15 days growth.

According to Bacanamwo & Purcel (1999), 14 days flooding decrease SDW of plants inoculated with any of the strains used in this study. The decrease in N_2 fixation, estimated by Lb content, was faster (7 days) than the decrease in biomass (14 days), and the decrease in N_2 fixation was more pronounced than the decrease in biomass. These results are in agreement with those observed by Bacanamwo & Purcel (1999), and as these authors proposed, it might be possible that decreased N_2 fixation results in decreased vegetative growth.

As previously observed by Bacanamwo & Purcell (1999), 7 days flooding conditions decreased nodule number (NN) and nodule dry weight (NDW) of plants inoculated with any of the strains used in this study. However, the effect of flooding in nodulation of plants inoculated with the *norC* mutant was greater than the effect observed in those inoculated with either the WT or *nirK* mutant. Previous work from our group by performing fluorometric NO detection analyses showed that flooded nodules induced by the *norC* strain accumulated more NO, than those induced by the WT or *nirK* mutant, respectively (Sánchez *et al.*, unpublished data). It might be possible that the higher levels of NO produced in *norC* nodules were responsible for the great effect of flooding in NN and NDW of plants inoculated with the *norC* mutant.

After 14 days flooding, NDW of plants inoculated with either the WT, *nirK* or *norC* strains reached control levels of nodule dry mass. Moreover, 14 days flooding of plants inoculated with the WT and *norC* strains resulted in the production of new nodules since NN significantly increased compared to control plants. Although 14 days flooding increased NDW in plants inoculated with the *nirK* strain with respect to 7 days flooding, NN kept constant compare to control plants. These observations indicate that 14 days flooding provoked an increase in individual nodule weight rather than an increase in NN of plants inoculated with the *nirK* mutant. Supporting this observation the dry weight per nodule (NDW/NN ratio) was significantly greater in plants inoculated with *nirK* than those inoculated with WT or *norC* after 14 days flooding. It has been previously shown that, in contrast to *nirK* nodules where NO formation from the denitrification is blocked, flooding conditions induced NO production in WT or *norC* nodules (Sánchez *et al.*, unpublished data). It might be possible that NO produced through the denitrification pathway is responsible for the increase in NN observed in plants inoculated with the WT or *norC* mutant in response to 14 days flooding conditions. Supporting this hypothesis, it has been shown that NO is involved in the auxin-signalling pathway controlling indeterminate nodule formation (Pii *et al.*, 2007). In addition, a transcriptomal study of *Medicago truncatula* NO-responsive genes showed that NO might regulate important processes of symbiotic nodule development and functioning (Ferrarini *et al.*, 2008). Alternatively, since nodule functioning, estimated by Lb content, was more affected by 7 or 14 days flooding in nodules induced by the WT or the *norC* mutant than in those induced by the *nirK* mutant, it might be possible that plants compensate this higher inhibition in nodule functioning by increasing nodule number.

Total nitrogen content (TN) and ^{15}N enrichment (% atom ^{15}N excess) of nitrate-dependent (uninoculated) plants were not affected by flooding. However, TN of inoculated plants decreased after flooding treatment. In addition, in those plants, N content derived from biological N_2 fixation was consistently affected, and an increase of % atom ^{15}N excess was observed. These results suggest that plants responded to the decrease in N_2 fixation induced by flooding with a greater uptake and assimilation of nitrate from the mineral solution. Supporting our results, it has been previously reported that soybean plants grown on nitrate are less sensitive to flooding than plant relying on N_2 fixation, indicating a differential sensitivity to flooding between N_2 fixation and nitrate uptake and assimilation (Buttery, 1987; Bacanamwo & Purcell 1999), which may be due to a lesser oxygen requirement for nitrate uptake and assimilation compared with N_2 fixation (Bacanamwo & Purcell 1999).

It has been proposed that the decrease in symbiotic N_2 fixation in response to flooding result from both decreased nodule mass and specific nitrogenase activity (Minchin & Pate, 1975; Bacanamwo & Purcell, 1999). The negative effect of flooding in specific nitrogenase activity of nodules from plants inoculated with the WT, *nirK* and *norC B. japonicum* strains has been previously demonstrated in our group (Sánchez *et al. unpublished data*) by analyzing acetylene reduction activity (ARA) and Lb content of the nodules, a parameter which shows a direct correlation with nitrogenase activity (LaRue & Child, 1978). In this work, we have confirmed that, 7 days as well as 14 days flooding stress decreased Lb content of nodules from plants inoculated with any of the strains used in these studies. Similarly, as previously reported by Sánchez *et al.*, (*unpublished data*), the effect of flooding on Lb content of the nodules was more pronounced in plants inoculated with the WT or the *norC* mutant strain, than those from plants inoculated with the *nirK* mutant. These authors concluded that NO produced through denitrification in soybean nodules in response to flooding conditions affects nitrogenase gene expression and consequently nitrogenase activity.

In order to investigate the physiological relevance of the different effects, provoked by flooding, found in nodulation and nitrogenase activity between plants inoculated with the *nirK* or the *norC B. japonicum* denitrification mutants, an estimation of N_2 fixation has been performed by measuring the content of nitrogen derived from biological N_2 -fixation (FN) using the ^{15}N isotope dilution technique. Our results showed that the decrease of FN caused by 14 days flooding was significantly more pronounced in plants inoculated with the *norC* mutant strain, which has been previously shown that

accumulates NO within nodules in response to flooding (Sánchez *et al.*, unpublished data). However, N₂ fixation in plants inoculated with *nirK*, where NO formation by denitrification is blocked, showed higher tolerance to 14 days flooding than plants inoculated with either the WT or the *norC* mutant. Since 14 days flooding did not affect nodule biomass regardless the strain used for inoculation, is nitrogenase activity the main process responsible for the decrease of N₂ fixation observed in response to flooding. In this work, we have demonstrated the physiological relevance of NO effect on nitrogenase gene expression proposed previously by Sánchez *et al.*, (unpublished data). Moreover, we also suggest that NO could also function in signalling processes in nodule formation as it has been previously proposed in indeterminate nodules by Pii *et al.* (2007).

6. MATERIAL AND METHODS

6.1. Bacterial strains and growth conditions.

B. japonicum USDA110 (US Department of Agriculture, Beltsville, MD), and *nirK* GRK308 (Velasco *et al.*, 2001) and *norC* GRC131 (Mesa *et al.*, 2002) mutant derivative strains were used in this study. *B. japonicum* strains were routinely grown in peptone-salts-yeast extract (PSY) medium (Regensburger & Hennecke, 1983) at 28 °C. Antibiotics were added to cultures at the following concentrations (µg ml⁻¹): chloramphenicol, 15; spectinomycin, 200; streptomycin, 200; kanamicyn, 200.

6.2. Plant growth conditions.

Soybean (*Glycine max* L. Merr., cv. Williams) seeds were surface-sterilized with 96% ethanol (v/v) for 30 s, immersed in H₂O₂ (15 %, v/v) for 8 min, then washed with sterile water and germinated in darkness at 28 °C. Selected seedlings were planted in autoclaved pots filled with a perlite-vermiculite mixture (1:1). Plants (five per pot) were inoculated at sowing with 1 ml of a single bacterial strain (10⁸ cells ml⁻¹) and grown in a greenhouse. Plants were watered four times a week, alternatively with water and with a nitrogen-free mineral solution (Rigaud & Puppo, 1975). In order to induce denitrification activity, after growth for 15 days, plants were provided with the same mineral solution supplemented with 4 mM ¹⁵N-labelled KNO₃ (10% ¹⁵N, Cambridge Isotope Laboratories, Inc.). It has previously been demonstrated that treatment of plants

with 4 mM KNO₃ results in denitrification activity, and it does not inhibit nodule formation or nitrogenase activity (Mesa *et al.*, 2004; Meakin *et al.*, 2007). After growth for 28 days, a set of plants was subjected to flooding by submerging pots to 1 cm above substrate level in a quarter-strength mineral solution. The solution level was maintained by daily additions of solution, which was added gently to avoid aeration. Non-flooded treatments (control plants) received the quarter-strength mineral solution four times a week. Nodules were harvested from 28 (0 days flooding)-, 35 (7 days flooding)- and 42 (14 days flooding)-day-old plants. At each harvest, shoots (separated from roots at the cotyledonary node) and nodules were dried to a constant weight at 80 °C for 48 h. Dry weight (SDW) and height (SH) were measured on shoots, and nodule number (NN) and nodule dry weight (NDW) were determined per plant. For determination of leghaemoglobin content, nodules were harvested into liquid nitrogen and stored at -80°C.

6.3. Leghaemoglobin content.

Leghaemoglobin extracts were prepared from nodules by homogenising 0.3 g of nodules with 4 ml Lb extraction buffer (Na₂HPO₄·2H₂O 40 mM (pH 7.4); NaH₂PO₄·H₂O 10 mM (pH 7.4); K₃Fe(CN)₆ 0.02%; NaHCO₃ 0.1%) supplemented with 0.1 g PVPP, and centrifuging at 12000 g at 4 °C for 20 min to retain the supernatant. 50 µl of clear supernate and 3 ml saturated oxalic acid were added to screw-capped tubes which were sealed and heated for 30 min at 120 °C in an autoclave, then cooled to room temperature. The fluorescence of the solutions was measured with a Shimadzu spectrophotofluorometer equipped with a mercury-xenon lamp and a RF-549 red-sensitive photomultiplier. The excitation wavelength was 405 nm and the emission monochromator setting was 650 nm. The difference in fluorescence between heated and unheated samples was proportional to heme protein concentration.

6.4. Total N and N derived from biological N₂ fixation.

Shoots oven-dried at 80 °C for 48 h were weighed and grounded in a grinder (IKA A 11 basic). Subsamples of approximately 3 mg were then weighed and analysed for total N and ¹⁵N enrichment (%atom ¹⁵N excess) using an elemental analyser (EA1500 NC, Carlo Erba, Milan, Italy) coupled to isotope-ratio mass spectrometer (Finnigan Delta Plus XL). The proportion of N derived from atmospheric N₂ (%Ndfa) was calculated according to Chalk *et al.*, 1985, as follows:

$$\%N_{fda} = 100 \times [1 - (A/B)]$$

where

A = %atom ^{15}N excess in inoculated plants

B = %atom ^{15}N excess in uninoculated plants

Atom% ^{15}N excess = %atom ^{15}N in labelled treatment - %atom ^{15}N in non-labelled treatment

For calculation of %atom ^{15}N excess, a set of plants was maintained under N_2 -fixing conditions in order to obtain the %atom ^{15}N of the non-labelled treatment.

The fixed-nitrogen content (FN) was calculated as follows:

$$\text{FN} = (\%N_{fda} \times \text{TN})/100$$

6.5. Statistical analysis.

The data were analysed by sampling times using analysis of variance, and means were separated by Tukey HSD Test at $P \leq 0.05$. Statistical procedures were carried out with the software OpenSat (<http://fsf.org/>).

7. ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grant AGL2006-13848-CO2-02/AGR from Ministerio de Educación y Ciencia, and 107PICO312 from CYTED. Support from the Junta de Andalucía (BIO-275) is also acknowledged. C. Sánchez was supported by a fellowship from the CSIC (I3P).

8. LITERATURE CITED

Arrese-Igor, C., Royuela, M., de Lorenzo, C., de Felipe, M.R., and Aparicio-Tejo, P.M. 1993. Effect of low rhizosphere oxygen on growth, nitrogen fixation and nodule morphology in lucerne. *Physiol. Plantarum*. 89: 55-63.

- Bacanamwo, M. and Purcell, L.C. 1999. Soybean dry matter and N accumulation responses to flooding stress, N sources and hypoxia. *J. Exp. Bot.* 50: 689-696.
- Buttery, B.R. 1987. Some effects of waterlogging and supply of combined nitrogen on soybean growth. *Can. J. Plant Sci.* 67: 69-77.
- Chalk, P.M. 1985. Estimation of N₂ fixation by isotope dilution: an appraisal of techniques involving ¹⁵N enrichment and their application. *Soil Biol. Biochem.* 17: 389-410.
- Delgado, M.J., Bedmar, E.J., and Downie, J.A. 1998. Genes involved in the formation and assembly of rhizobial cytochromes and their role in symbiotic nitrogen fixation. *Adv. Microbial Phys.* 40: 191-231.
- Delgado, M.J., Bonnard, N., Tresierra-Ayala, A., Bedmar, E.J., and Müller, P. 2003. The *Bradyrhizobium japonicum* *napEDABC* genes encoding the periplasmic nitrate reductase are essential for nitrate respiration. *Microbiology.* 149: 3395-3403.
- Delgado, M.J., Casella, S., and Bedmar, E.J. 2007. Denitrification in Rhizobia-Legume Symbiosis. *In* *Biology of the Nitrogen Cycle*. Bothe, H., Ferguson, S.J., and Newton, W.E. (eds.). Elsevier, pp. 3-20.
- Ferrarini, A., De Stefano, M., Baudouin, E., Pucciariello, C., Polverari, A., Puppo, A., and Delledonne, M. 2008. Expression of *Medicago truncatula* genes responsive to nitric oxide in pathogenic and symbiotic conditions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21: 781-790.
- James, E.K. and Crawford, R.M.M. 1998. Effect of oxygen availability on nitrogen fixation by two *Lotus* species under flooding conditions. *J. Exp. Bot.* 49: 599-609.
- LaRue, T.A. and Child, J.J. 1979. Sensitive fluorometric assay for leghemoglobin. *Ana. Biochem.* 92: 11-15.
- Luciński, R., Polcyn, W., and Ratajczak, L. 2002. Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association *Rhizobium*-legumes. *Acta Biochimica Polonica.* 49: 537-546.
- Meakin, G.E., Bueno, E., Jepson, B., Bedmar, E.J., Richardson, D.J., and Delgado, M.J. 2007. The contribution of bacteroidal nitrate and nitrite reduction to the formation of nitrosylleghaemoglobin complexes in soybean root nodules. *Microbiology.* 153: 411-419.

- Mesa, S., Velasco, L., Manzanera, M.E., Delgado, M.J., and Bedmar, E.J. 2002. Characterisation of the *norBCQD* genes, encoding nitric oxide reductase, in the nitrogen fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Microbiology*. 148: 3553-3560.
- Mesa, S., de Dios Alché, J., Bedmar, E.J., and Delgado, M.J. 2004. Expression of the *nir*, *nor* and *nos* denitrification genes from *Bradyrhizobium japonicum* in soybean root nodules. *Physiol. Plantarum*. 120: 205-211.
- Minchin, F.R. and Pate, J.S. 1975. Effects of water, aeration and salt regime on nitrogen fixation in a nodulated legume: definition of an optimum root environment. *J. Exp. Bot.* 26: 60-80.
- Minchin, F.R. and Summerfield, R.J. 1976. Symbiotic nitrogen fixation and vegetative growth of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] in waterlogging conditions. *Plant and Soil*. 45: 113-127.
- O'Hara, G.M. and Daniel, R.M. 1985. Rhizobial denitrification: a review. *Soil. Biol. Biochem.* 17: 1-9.
- Pii, Y., Crimi, M., Cremonese, G., Spena, A., and Pandolfini, T. 2007. Auxin and nitric oxide control indeterminate nodule formation. *BMC Plant Biol.* 8: 7-21.
- Regensburger, B. and Hennecke, H. 1983. RNA polymerase from *Rhizobium japonicum*. *Arch. Microbiol.* 135: 103-109.
- Rigaud, J. and Puppo, A. 1975. Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacteroids. *J. Gen. Microbiol.* 88: 223-228.
- Sánchez, C., Gates, A.J., Meakin, G.E., Uchiumi, T., Girard, L., Richardson, D.J., Bedmar, E.J., and Delgado, M.J. Production of nitric oxide and nitrosylhaemoglobin complexes in soybean nodules in response to flooding. *Submitted to Mol. Plant-Microbe Interact.*
- van Spanning, R.J., Delgado, M.J., and Richardson, D.J. 2005. The nitrogen cycle: denitrification and its relationship to N₂ fixation. *In Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology and the environment*. Werner, D. and Newton, W.E. (eds.). Springer Netherlands, pp. 277-342.
- van Spanning, R.J., Richardson, D.J., and Ferguson, S.J. 2007. Introduction to the Biochemistry and Molecular Biology of Denitrification. *In Biology of the Nitrogen Cycle*. Bothe, H., Ferguson, S.J., and Newton, W.E. (eds.). Elsevier, pp. 3-20.

- Velasco, L., Mesa, S., Delgado, M.J., and Bedmar, E.J. 2001. Characterization of the *nirK* gene encoding the respiratory, Cu-containing nitrite reductase of *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1521: 130-134.
- Velasco, L., Mesa, S., Xu, C., Delgado, M.J., and Bedmar, E.J. 2004. Molecular characterization of *nosRZDFYLX* genes coding for denitrifying nitrous oxide reductase of *Bradyrhizobium japonicum*. *Antonie van Leeuwenhoek.* 85: 229-235.
- Witty, J.F., Minchin, F.R., Skøt, L., and Sheedy, J.E. 1986. Nitrogen fixation and oxygen in legume root nodules. *Oxford Surveys in Plant Molecular and Cell Biology.* 3: 275-314.
- Zumft, W.G. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 533-616.

CAPÍTULO 3

**Dual role of NirB in *Bradyrhizobium japonicum* nitrate assimilation
and in nitric oxide detoxification in soybean root nodules**

Cristina Sánchez¹, Georgina E. Meakin², Lourdes Girard³, David J. Richardson²,
Eulogio J. Bedmar¹, and María J. Delgado¹

¹Estación Experimental del Zaidín, CSIC, P. O. Box 419, 18080-Granada, Spain; ²School of Biological Sciences, University of East Anglia, Norwich, NR4 7TJ, UK. ³Programa de Genómica Funcional de Procariotes, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos, 62271, México.

Manuscrito en preparación

1. RESUMEN

La detección de complejos nitrosil-leghemoglobina (LbNO) en nódulos de soja conduce a la pregunta de cómo los bacteroides de *Bradyrhizonium japonicum* superan la toxicidad del óxido nítrico (NO). Previamente, se ha demostrado en algunas bacterias que las enzimas nitrito reductasas generadoras de amonio (NH_4^+), las cuales catalizan la reducción (transfiriendo 6 electrones) del nitrito (NO_2^-) a amonio, también son capaces de reducir el NO a NH_4^+ . En el genoma de *B. japonicum*, se ha identificado un gen, *nirB*, que codifica una supuesta nitrito reductasa asimilatoria, la cual contiene sirohemo en el centro activo. En este estudio, se demuestra que la delección de *nirB* provocó un defecto en el crecimiento aeróbico de las células incubadas en condiciones en las que el nitrato fue la única fuente de nitrógeno. Los transcritos correspondientes a *nirB* se detectaron, mediante RT-PCR, en nódulos de soja procedentes de plantas inoculadas con la cepa parental de *B. japonicum* USDA110. La implicación de NirB en la destoxificación de NO en nódulos de soja se estudió mediante la inoculación de plantas con la cepa mutante *nirB*. Los complejos LbNO se analizaron mediante las espectroscopías EPR y UV-visible. Los niveles de complejos LbNO, así como los de nitrito y NO, fueron significativamente superiores en nódulos de la mutante *nirB* en comparación con los de la cepa parental. La acumulación de NO, detectada en nódulos de la mutante *nirB*, disminuyó tras la incubación de dichos nódulos con un secuestrador de NO. Estos resultados sugieren que NirB tiene un doble papel, en la asimilación de nitrato en células de *B. japonicum*, y en la destoxificación de NO en nódulos de soja.

2. ABSTRACT

The identification of nitric oxide (NO)-bound to leghaemoglobin within soybean nodules has led to the question of how *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids overcome the toxicity of this NO. It has previously been reported, in some bacteria, that ammonia-generating nitrite reductases which catalyze 6-electron reduction of nitrite to ammonia (NH_4^+) are also capable to reduce NO to NH_4^+ or nitrous oxide. A gene, *nirB*, encoding a sirohaem nitrite reductase has been identified in the *B. japonicum* genome. In this study, we show that deletion of *nirB* caused a growth defect in *B. japonicum* cells, when grown under aerobic conditions with nitrate as the only nitrogen source. By performing RT-PCR analyses, transcripts of *nirB* were detected in soybean nodules isolated from plants that were inoculated with *B. japonicum* USDA110. The involvement of NirB in nitric oxide detoxification in soybean nodules has been assessed by inoculating plants with the *nirB* deficient mutant. Nitrosilleghaemoglobin (LbNO) complexes were analysed in nodules by using electron paramagnetic resonance and UV-visible spectroscopies. Levels of LbNO complexes, as well as, nitrite and NO in *nirB* nodules were significantly higher than those observed in wild-type nodules. After incubation with a NO scavenger, increase of NO accumulation in *nirB* nodules compared to wild-type nodules was suppressed. These results suggest that NirB has a dual role in nitrate assimilation in *B. japonicum* free-living cells and in NO detoxification in soybean nodules.

3. INTRODUCTION

Bradyrhizobium japonicum forms root nodules when is symbiotically associated with soybean (*Glycine max* L. Merr., cv. Williams). Within nodules, bacteria differentiate into bacteroids, which produce the oxygen (O₂)-labile nitrogenase enzyme. Nitrogenase catalyses the reduction of atmospheric dinitrogen into ammonia through an energetically demanding process. In nodules, a diffusion barrier exists to limit O₂ entry into the nodule (Minchin, 1997; Minchin *et al.*, 2008), and then O₂ is delivered to the bacteroids by the plant oxygen-carrier, leghaemoglobin (Lb), which is present exclusively in the nodule (Appleby, 1992) resulting in a very low concentration of free oxygen (3 to 30 nM) within infected nodule tissue.

In addition to being able to bind O₂, Lb can also bind nitric oxide (NO) to form nitrosylleghaemoglobin (LbNO) complexes, the presence of which have been detected within soybean nodules (Kanayama *et al.*, 1990; Mathieu *et al.*, 1998; Meakin *et al.*, 2007). NO is a signal molecule involved in diverse physiological processes in plants, but it can become very toxic under certain conditions determined, for example, by its rate of production and diffusion and the redox state of the cell (for reviews see Delledone, 2005; Grün *et al.*, 2006; Neill *et al.*, 2008, Besson-Bard *et al.*, 2008). The identification of LbNO complexes within soybean nodules has led to the question of how *B. japonicum* bacteroids overcome the toxicity of NO.

In bacteria, one candidate for NO detoxification is the respiratory nitric oxide reductase (Nor) which catalyses the reduction of NO to nitrous oxide (N₂O) in the anaerobic respiratory process, denitrification (van Spanning *et al.*, 2005; de Vries *et al.*, 2007; Zumft, 2005). The soybean symbiont, *B. japonicum*, is an α -Proteobacteria able to denitrify under both free-living and symbiotic conditions (Bedmar *et al.*, 2005). In *B. japonicum*, denitrification depends on the *napEDABC* (Delgado *et al.*, 2003), *nirK* (Velasco *et al.*, 2001), *norCBQD* (Mesa *et al.*, 2002) and *nosRZDYFLX* (Velasco *et al.*, 2004) genes, encoding nitrate-, nitrite-, nitric oxide- and nitrous oxide-reductase enzymes, respectively. Expression of *B. japonicum* denitrification genes has been reported in isolated bacteroids, and in soybean root nodules by *in situ* histochemical detection of β -galactosidase activity from transcriptional fusions of the *nirK*, *norC* and *nosZ* genes to the reporter gene *lacZ* (Mesa *et al.*, 2004).

Recently, Meakin and coworkers (2006) have demonstrated that knocking-out Nor does not affect the level of NO within nodules. These authors have proposed that

Nor is not solely responsible for NO detoxification within soybean nodules, leading to the suggestion that other systems may be involved in NO detoxification (Meakin *et al.*, 2006).

Bacteria have evolved several mechanisms for NO detoxification (for reviews see Gardner, 2005; Poole, 2005; Pullan *et al.*, 2008). The most prominent are the flavohemoglobin Hmp (Boccaro *et al.*, 2005; Hernández-Urzúa, *et al.*, 2003; Poole, 2005; Wu *et al.*, 2003) and the flavorubredoxin NorV (Gardner *et al.*, 2002; Hutchings *et al.*, 2002; Mills *et al.*, 2005 and 2008). These enzymes detoxify incoming NO both aerobically (Hmp) and anoxically (NorV), converting the toxic gas to nitrate (NO₃⁻) or nitrous oxide (N₂O), respectively (Poole, 2005). It has also been suggested that the cytochrome *bd* is critical for protecting *Escherichia coli* cells from NO-induced growth inhibition (Mason *et al.*, 2008). In *E. coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium it has been reported that periplasmic nitrite reductase (NrfA; pentaheme periplasmic cytochrome *c* nitrite reductase) which catalyses 6-electron reduction of nitrite (NO₂⁻) to ammonia (NH₄⁺), is also capable of detoxification of NO to NH₄⁺ or N₂O, anaerobically (Poock *et al.*, 2002, Mills *et al.*, 2008). Ammonia-generating nitrite reductases display a complex active site comprised of a siroheme coupled to a single [4Fe-4S] center (Vega and Kamin, 1977). Nitrite reduction by hexaheme enzymes from strictly and facultatively anaerobic bacteria, such as *Desulfovibrio desulfuricans*, *Wolinella succinogenes* or *E. coli* (Costa *et al.*, 1990) can also reduce NO to either NH₄⁺ or N₂O.

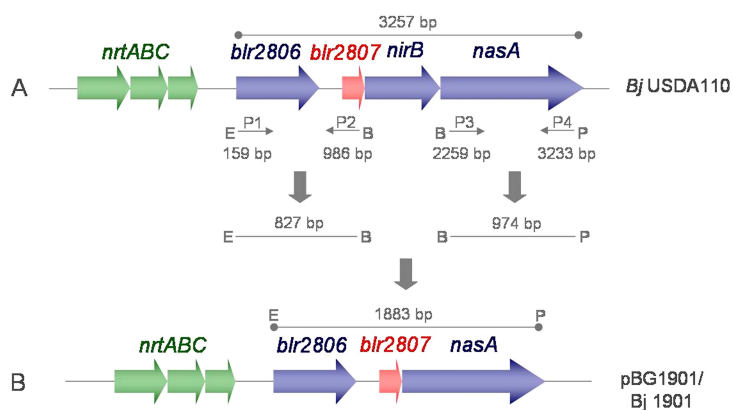


Figure 1. (A) Schematic diagram of the putative *B. japonicum* USDA110 nitrate assimilation gene cluster. The *nrtABC* genes may encode an ABC-nitrate transporter, *nirB* may encode an assimilatory nitrite reductase and *nasA* may encode an assimilatory nitrate reductase. ORF *blr2806* may encode a nitrite extrusion protein, and ORF *blr2807* may encode a single-domain haemoglobin. In (A), construction of the plasmid pBG1901 (B) is also indicated (see Material and Methods).

The presence of a gene, *nirB*, putatively encoding a sirohaem nitrite reductase has been identified in the *B. japonicum* genome (<http://genome.kazusa.or.jp/rhizobase/>). This gene is included in a cluster containing putative *nrtABC*, *nasA* and *nirB* genes (Figure 1A), possibly encoding an ABC-type nitrate uptake system, an assimilatory nitrate reductase (NasA) and an assimilatory nitrite reductase (NirB), respectively. In this paper, we have assessed the role of *B. japonicum* NirB in nitrate assimilation in free-living cells and in NO detoxification in soybean nodules by using a *nirB* deletion mutant (Fig. 1A and B).

4. RESULTS

4.1. Involvement of NirB in nitrate-dependent aerobic and anaerobic growth.

The *B. japonicum nirB* mutant strain 1901 showed similar growth rates as the wild type (WT) strain USDA110 when cells were incubated aerobically in PSY complete medium (Fig. 2a). Similarly, cells of a *nirK* mutant strain GRK308, lacking the Cu-containing respiratory nitrite reductase, were able to grow under these conditions (Fig. 2a). The role of NirB in *B. japonicum* nitrate assimilation was assessed by growing USDA110, GRK308 and 1901 strains aerobically in Bergersen's minimal medium with nitrate as the sole nitrogen source. As Figure 2b shows, the WT and *nirK* strains were able to grow reaching a optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 1.2 after 10 days incubation under aerobic conditions with nitrate (Fig. 2b). However, the *nirB* mutant showed a defect in growth under these conditions reaching an optical density (OD₆₀₀) of only 0.25. Nitrite detection analyses showed that nitrite was not accumulated in the growth medium from any of the strains (data not shown).

Anaerobic growth of USDA110, GRK308 and 1901 strains was assessed by incubating cells under anaerobic conditions in Bergersen's minimal medium with nitrate as the sole nitrogen source (Fig. 2c). Similarly to WT strain, cells of the *nirB* mutant were able to grow under these conditions, reaching an optical density (OD₆₀₀) of 0.4 after 10 days. As previously observed by Velasco *et al.* (2001) and Bueno *et al.* (2008), the *nirK* mutant was unable to grow under anaerobic conditions (Fig. 2c). Under these conditions, nitrite accumulated in *nirK* growth medium as previously reported (Velasco *et al.*, 2001; Bueno *et al.*, 2008), but not in WT or *nirB* growth medium (data not shown).

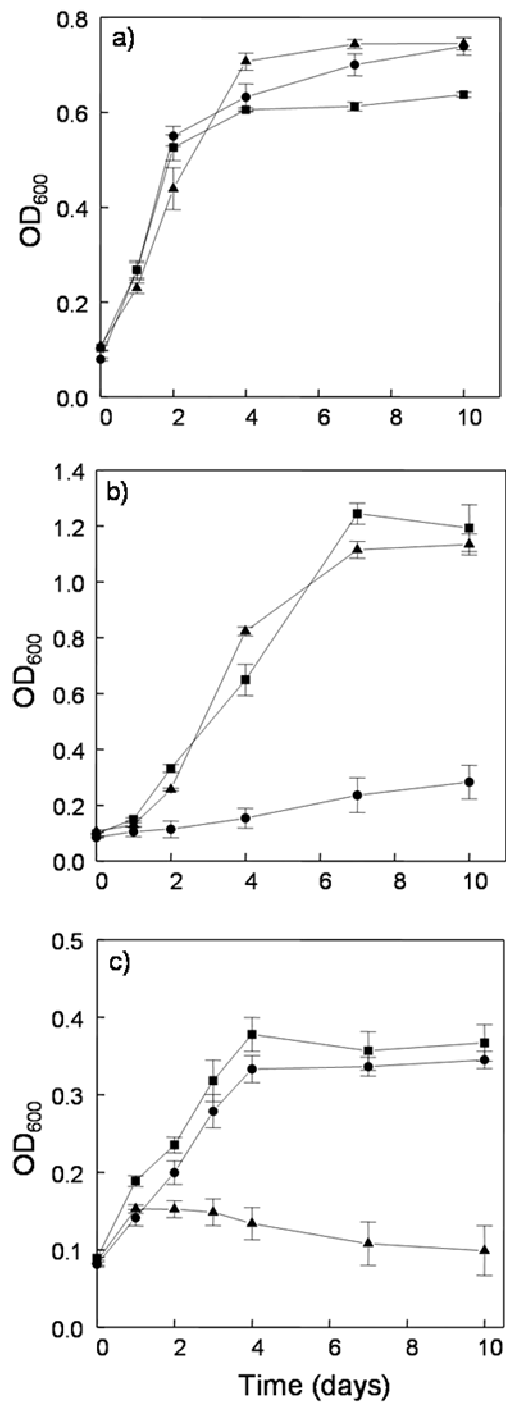


Figure 2. (a) aerobic growth in complete PSY medium, (b) nitrate-dependent aerobic growth, and (c) nitrate-dependent anaerobic growth in Bergersen minimum medium supplemented with 10 mM of wild-type *B. japonicum* USDA110 strain (squares), and *nirB* 1901 (circles) and *nirK* GRK308 (triangles) mutant strains. Growth was measured by recording the optical density (OD₆₀₀) of the cultures on a daily basis. Points are means \pm SE from three different starter cultures, grown in duplicate.

4.2. Nitrite and nitric oxide reduction under free-living conditions.

The role of NirB in nitrite reduction was next investigated by looking at MV-dependent nitrite reductase (Nir) activity in WT, *nirB* and *nirK* cells incubated aerobically or anaerobically with nitrate as the sole nitrogen source (Table 1A). Before recording Nir activity, cells were broken by sonication to ensure that both periplasmic and cytoplasmic enzymes could use MV as an electron donor, and hence allow total Nir activity to be measured. Cell-free extracts prepared from cells lacking *nirK*, incubated under aerobic conditions for 96 h, exhibited WT levels of Nir activity (Table 1A). However, levels of Nir activity in cells of the *nirB* mutant were about 2-fold higher than those detected either in the parental strain or *nirK* mutant (Table 1A). Under anaerobic conditions, Nir activity increased about 9 times in the WT cell-free extract compared to that observed under aerobic conditions (Table 1A). Levels of MV-dependent Nir activity in *nirB* cells were similar to those detected in the parental strain (Table 1A). However, as previously shown by Bueno *et al.* (2008), cells of the *nirK* mutant strain showed about 10-fold lower levels of Nir activity than those detected in WT or *nirB* cells (Table 1A).

A Nir activity [nmol NO ₂ ⁻ consumed h ⁻¹ (mg protein) ⁻¹]			
Strain	Genotype	Aerobic	Anaerobic
USDA110	WT	185 ± 16	1723 ± 210
1901	<i>nirB</i>	419 ± 58	1609 ± 172
GRK308	<i>nirK</i>	192 ± 21	153 ± 27

B Nor activity [nmol NO consumed min ⁻¹ (mg protein) ⁻¹]			
Strain	Genotype	Aerobic	Anaerobic
USDA110	WT	49 ± 11	261 ± 47
1901	<i>nirB</i>	192 ± 25	175 ± 25
GRC131	<i>norC</i>	53 ± 21	66 ± 12

Table 1. MV-dependent nitrite reductase (Nir) and nitric oxide reductase (Nor) activities in wild type (WT), and *nirB* 1901, *nirK* GRK308 and *norC* GRC131 mutant strains. Nir and Nor activities were determined in cell-free extracts of cells that were incubated under aerobic or anaerobic conditions in Bergersen's minimum medium with 10 mM nitrate as the sole nitrogen source. Data are means ± SE from three different cell incubations, assayed in triplicate.

To investigate the role of NirB in NO reduction, MV-dependent NO reductase (Nor) activity was measured in cell-free extracts from both aerobic and anaerobically-incubated cells (Table 1B). Determination of NO reductase activity in aerobically-incubated cells revealed an unexpected 4-fold increase in the ability of *nirB* cells to reduce NO compared to WT cells (Table 1B). Cells of a *norC* mutant strain GRC131, lacking the nitric oxide reductase showed WT rates of NO reduction (Table 1B). Anaerobic conditions induced about 5-times Nor activity in WT cells (Table 1B). Under these conditions, rates of Nor activity in a *B. japonicum norC* mutant were about 4-times lower than that of WT (Table 1B). However, rates of NO reduction observed in the *nirB* cell-free extracts were only 1.5 lower than those observed in the parental strain (Table 1B).

4.3. NO formation in soybean nodules produced by *B. japonicum nirB* mutant.

Expression of *nirB* gene was first checked in soybean nodules of plants inoculated with *B. japonicum* USDA110 (Fig. 3). As positive controls, expression of denitrification *nirK* and *norC* genes was also checked by RT-PCR. According to previous observations (Mesa *et al.*, 2004), *nirK* and *norC* genes were expressed in nodules (Fig. 3). Similarly as *nirK* or *norC*, *nirB* was also expressed in nodules (Fig. 3). However, transcripts of *hmpA* gene, which encodes a flavohaemoglobin, were not detected in soybean nodules (Fig. 3).

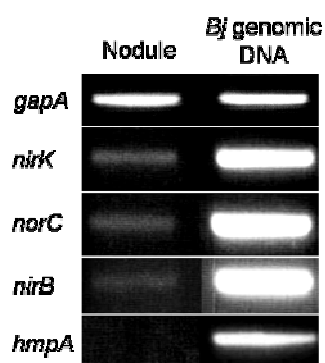


Figure 3. Reverse transcription-PCR detection of *nirK*, *norC*, *nirB* and *hmpA* transcripts in nodules isolated from soybean plants that were inoculated with *B. japonicum* USDA110. Prior to the reverse transcription PCR experiments, for each pair of primers the optimization of the PCR amplification conditions was done using *B. japonicum* genomic DNA as the template. *gapA* gene was used as internal standard control. Data are representative of reactions performed with three independent RNA samples.

To assess the role of NirB in NO detoxification within soybean nodules, plants were inoculated with the WT *B. japonicum* USDA110 strain, and *nirB* 1901 or *nirK* GRK308 mutants. Whole nodule EPR spectroscopy was used to detect NO bound to leghaemoglobin (Lb), UV-visible spectroscopy was used to quantify the proportion of Lb bound to NO in nodule extracts as previously described (Meakin *et al.*, 2007), and free NO was analyzed by using the specific fluorescent probe DAF-FM. The EPR LbNO signal from *nirB* nodules was significantly higher than that observed in WT or *nirK* nodules (Fig. 4). Similarly, interpretation of the absorption spectra found that levels of LbNO were about 2 times higher in *nirB* nodules than in WT or *nirK* nodules (Fig. 5a). Fluorometric NO detection showed that NO production by *nirB* nodules was approximately 2-times higher than that produced by WT or *nirK* nodules (Fig. 5b). To make clear that the induction of fluorescence observed in *nirB* nodules is due to NO, nodules were treated with a NO scavenger (c-PTIO) and such induction was clearly

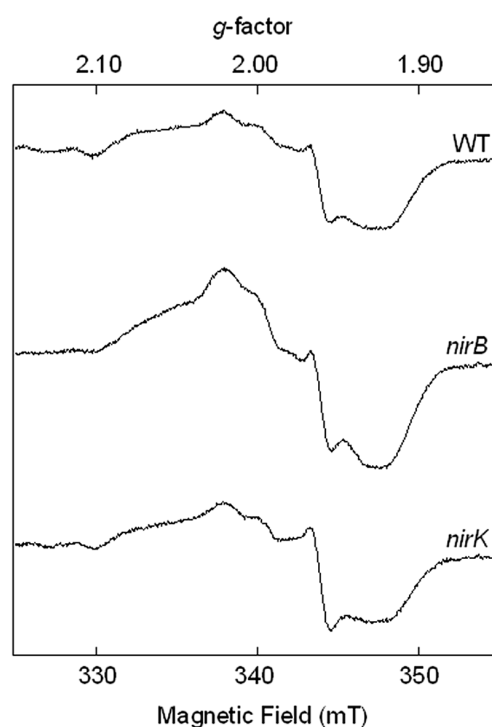


Figure 4. EPR spectra from intact nodules of plants inoculated with wild type (WT) *B. japonicum* USDA110, and *nirB* 1091 and *nirK* GRK308 mutant strains. The y-axis is the same scale on all panels. Spectra are representative of EPR spectra recorded from triplicate nodule samples from two or three different nodule harvests.

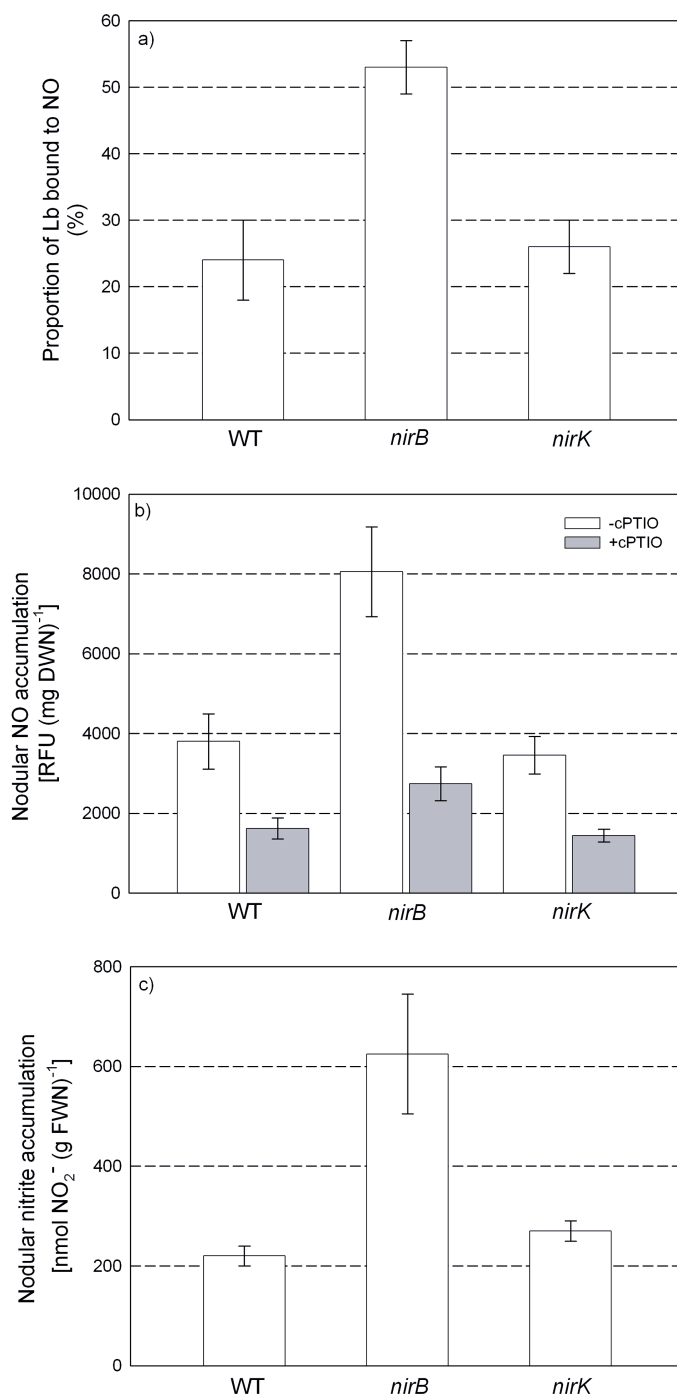


Figure 5. (a) LbNO proportion determined from the UV-visible spectra, (b) NO detection using DAF-FM and expressed as relative fluorescence units (RFU), and (c) nitrite accumulation in nodules. Plants were inoculated with wild-type (WT) *B. japonicum* USDA110, and *nirB* 1901 and *nirK* GRK308 mutant strains. In (b), nodules were incubated with 2 mM of c-PTIO (grey bars). Data are means \pm SE from three independent experiments assayed by using six replicates. RFU, relative fluorescence units, DWN, dry weight nodule, FWN, fresh weight nodule.

suppressed (Fig. 5b), indicating that the fluorescence was representative of NO production. Nitrite analyses in nodules showed that approximately 3 times more nitrite accumulated in nodules from plants inoculated with the *nirB* mutant compared to those from plants inoculated with either the WT or *nirK* strains (Fig. 5c). As previously observed (Kanayama *et al.*, 1990; Meakin *et al.*, 2007) either nitrite or NO accumulation within nodules correlates with levels of LbNO, so both nitrite and NO produced by *nirB* nodules may contribute to LbNO formation.

MV-dependent nitrite and NO reductase activities were also measured in bacteroids. As Table 2 shows, similar levels of Nir and Nor activity were observed in either the WT, and the *nirB* or *nirK* bacteroids.

Strain	Genotype	Nir activity	Nor activity
USDA110	WT	90 ± 8	24 ± 2
1901	<i>nirB</i>	84 ± 7	21 ± 6
GRK308	<i>nirK</i>	83 ± 8	19 ± 4
GRC131	<i>norC</i>	72 ± 8	29 ± 7

Table 2. MV-dependent nitrite reductase (Nir) and nitric oxide reductase (Nor) activities in bacteroids. Plants were inoculated with wild type (WT) *B. japonicum*, and *nirB* 1901, *nirK* GRK308 and *norC* GRC131 mutant strains. Data are means ± SE from three different cell incubations, assayed in triplicate.

5. DISCUSSION

The defect in nitrate-dependent aerobic growth showed by the *nirB* *B.japonicum* mutant suggested that NirB has a role in nitrate assimilation, presumably as the assimilatory nitrite reductase, and supported the assumption that the gene cluster depicted in Figure 1 encodes proteins required for nitrate assimilation. Even though *nirB* cells could not grow when the nitrogen source was limited to nitrate, presumably due to the lack of nitrite reduction to ammonium, rates of MV-dependent Nir activity in this mutant were even higher than those observed in wild-type (WT) cells. This suggests that in *B. japonicum* there are other ways to reduce nitrite which are induced when NirB is absent. However, NirB is required for nitrate-dependent aerobic growth.

Under anaerobic conditions, with nitrate as the sole nitrogen source, the *nirK* cells were unable to grow, since NirK is required for anaerobic respiration (Velasco *et*

al., 2001), but surprisingly, the *nirB* cells were able to grow. Growth of *nirB*, as well as observation of a WT level of MV-dependent Nir activity in the *nirB* cells, further demonstrated that *B. japonicum* cells have other ways to reduce nitrite to ammonium for assimilation under anaerobic conditions. In contrast to NirB, and as previously reported by Bueno *et al.* (2008), NirK was mainly involved in nitrite respiration by nitrate-dependent anaerobically grown cells since about 91% of Nir activity detected in WT cells was due to NirK enzyme.

The ability to grow under nitrate-dependent anaerobic conditions as well as the observation of MV-dependent Nir activity in *nirB* free-living cells under both aerobically and anaerobically nitrate dependent conditions suggest that other nitrite reduction routes must operate in *B. japonicum*. One possibility is a ferredoxin-dependent nitrite reductase (Fd-Nir), encoded by *nirA*, which accepts electrons from reduced ferredoxin to reduce nitrite to ammonium (Campbell & Kinghorn, 1990). To date, Fd-Nirs have only been characterised in phototrophic bacteria and higher plants (Flores *et al.*, 2005) and have not yet been identified in non-phototrophic bacteria. Another way in which *B. japonicum* cells can reduce nitrite is through the action of an assimilatory sulphite reductase, which is capable of reducing nitrite to ammonium (Flores *et al.*, 2005; Siegel *et al.*, 1982). Assimilatory sulphite reductases are composed of eight flavoprotein subunits, which are encoded by *cysJ*, and four haemoprotein subunits, which are encoded by *cysI* (Ostrowski *et al.*, 1989; Siegel & Davis, 1974). A search of the *B. japonicum* genome (<http://genome.kazusa.or.jp/rhizobase/>) for other nitrite reductases revealed the presence of a putative *nirA* gene, which encodes a predicted protein that might be a Fd-Nir, as well as of *cysJ* and *cysI* genes. The role of those genes in *B. japonicum* nitrite reduction is currently being investigated.

As observed for Nir activity, rates of MV-dependent Nor activity in the *nirB* mutant incubated aerobically were higher than those observed in WT cells. This suggests that in *B. japonicum* there are other ways to reduce nitrite and NO which are induced when NirB is absent. Although, NorC is responsible for 75% of Nor activity observed in anaerobically grown cells, NirB partially contributes with about 33% of WT Nor activity.

Having established that NirB has a role in nitrate assimilation in *B. japonicum* free-living cells, presumably as an assimilatory nitrite reductase, the role of NirB in nitrite reduction in soybean nodules was investigated. In addition, NirB might be also able to reduce NO, since other ammonium-generating nitrite reductases have been

observed to reduce NO to ammonium (Costa *et al.*, 1990; Poock *et al.*, 2002). The involvement of NirB as a suspected mechanism of NO detoxification in nodules has also been investigated. Transcripts of *nirB* gene were detected by RT-PCR in soybean nodules. A BLAST search of the *B. japonicum* genome sequence with the *E. coli* flavohemoglobin gene sequence had identified a putative *B. japonicum* flavohemoglobin (<http://genome.kazusa.or.jp/rhizobase/>). However, no transcripts of *B. japonicum* flavohemoglobin gene, *hmpA*, was detected in soybean nodules under our experimental conditions, suggesting a minor role in NO detoxification in those conditions.

Since *nirB* nodules accumulated more nitrite, NO and LbNO complexes than WT nodules, a role for NirB in nitrite and NO detoxification and indirectly in LbNO formation in soybean nodules might be proposed. As previously reported by Meakin *et al.* (2007), our results suggest that NirK is not involved in nitrite accumulation or LbNO formation in soybean nodules from plants grown under normal conditions. However, recently it has been shown that this enzyme has a role in LbNO formation in nodules from plants subjected to flooding where denitrification is induced (Sánchez *et al.*, unpublished data). Since, *nirB* nodules accumulated nitrite, it might be possible that NO accumulated in such nodules must come from nitrite. In the plant cells, NO can be produced from nitrite via nonenzymatic (Bethke *et al.*, 2004) or enzymatic pathways, catalyzed by nitrate reductase (NR) that can reduce nitrite to NO, as well as nitrate to nitrite (Meyer *et al.*, 2005; Yamasaki *et al.*, 1999 Yamasaki & Sakihama, 2000). Nitrite can be reduced also to NO by the plasma membrane-bound nitrite: NO-reductase (NI-NOR; Stöhr *et al.*, 2001). Another possible source of NO in nodules may be the nitric oxide synthase (NOS)-like enzyme, since a (NOS)-like activity has been identified in nodules of *Lupinus albus* (Cueto *et al.*, 1996). In this respect, it has been suggested that a NOS may participate to NO production in *Medicago truncatula* nodules (Baudouin *et al.*, 2006).

Although it is clear from our results that NirB has a role in NO detoxification, WT rates of MV-dependent Nir and Nor activities were observed in the *nirB* bacteroids. These observations suggests that *B. japonicum* bacteroids has other ways to reduce nitrite and NO as has been suggested for free-living cells. Alternatively, it might be possible that the low rates of Nir and Nor activities detected in bacteroids compared to those observed in free-living cells could explain that no differences of Nir and Nor activities were observed between WT and *nirB* bacteroids.

Nitrite and NO, have been reported to be potent inhibitors of nitrogenase activity (Sasakura *et al.*, 2006; Shimoda *et al.*, 2009; Trinchant & Rigaud 1982). Recently, it was proposed that in soybean nodules is Lb and not NirK or Nor bacteroidal enzymes the main system involved in detoxifying nitrite and NO produced by bacteroidal denitrification in response to flooding conditions (Sánchez *et al.*, unpublished data). Whether NirB contributes to the protection of symbiotic nitrogen fixation against nitrite and NO need to be addressed.

6. MATERIALS AND METHODS

6.1. Bacterial strains and growth conditions.

B. japonicum USDA110 (US Department of Agriculture, Beltsville, MD), and *nirB* 1901, *norC* GRC131 (Mesa *et al.*, 2002) and *nirK* GRK308 (Velasco *et al.*, 2001) mutant strains were used in this study. *B. japonicum* strains were routinely grown in peptone-salts-yeast extract (PSY) medium (Regensburger & Hennecke, 1983) at 28 °C. Nitrate-dependent aerobic and anaerobic growth was performed in Bergersen's minimal medium (Bergersen, 1961) with nitrate as the sole nitrogen source. Antibiotics were added to *B. japonicum* cultures at the following concentrations ($\mu\text{g ml}^{-1}$): chloramphenicol, 15; spectinomycin, 200; streptomycin, 200; kanamycin, 200. *E. coli* strains were routinely grown overnight in Luria-Bertani (LB) medium (Miller, 1972) at 37 °C. *E. coli* DH5 α (Stratagene) was used as host in standard cloning procedures and *E. coli* S17-1 (Simon *et al.*, 1983) served as the donor in conjugative plasmid transfer. The antibiotics used were ($\mu\text{g ml}^{-1}$): ampicillin, 100; kanamycin, 25.

6.2. Construction of a *nirB* mutant.

To construct a *B. japonicum nirB* deletion mutant, DNA fragments of 827 and 974 bp corresponding to the upstream and downstream regions of the *nirB* gene, respectively, were amplified by PCR, using two primer pairs containing restriction endonuclease sites to facilitate cloning (Figure 1A) (supplemental table S1). The PCR products were individually ligated into the pGEM[®]-T (Promega) vector and transformed into competent *E. coli* DH5 α cells. After release the PCR products from the pGEM[®]-T vectors, they were ligated together into the plasmid pK18*mobsacB* (Schäfer *et al.*,

1994). The resulting plasmid, pBG1901 (Figure 1B), was transferred via conjugation into *B. japonicum* USDA110 using *E. coli* S17.1 as donor. Transconjugants were selected in Bergersen plates supplemented with 10 % sucrose. Colonies that were kanamycin sensitive were identified as double recombinants. The *nirB* 1901 mutant strain was confirmed by PCR. PCR amplification of the region containing the *nirB* gene from *B. japonicum* USDA110 genomic DNA gave a product of 3156 bp (Figure 1A). Amplification of the genomic DNA from the *B. japonicum* 1901 mutant gave a product of 1883 bp (Figure 1A).

Chromosomal and plasmid isolations, restriction enzyme digestions, agarose gel electrophoresis, ligations and *E. coli* transformations, were performed according to standard protocols (Sambrook *et al.*, 1989).

6.3. Plant growth conditions.

Soybean (*Glycine max* L. Merr., cv. Williams) seeds were surface-sterilized with 96% ethanol (v/v) for 30 s, immersed in H₂O₂ (15 %, v/v) for 8 min, then washed with sterile water and germinated in darkness at 28 °C. Selected seedlings were planted in autoclaved 1 l Leonard jars assemblies filled with vermiculite. Plants (two per jar) were inoculated at sowing with 1 ml of a single bacterial strain (10⁸ cells/ml), supplied with a N-free mineral solution (Rigaud & Puppo, 1975), and grown in a controlled environmental chamber under conditions previously described (Delgado *et al.*, 1998). After growth for 15 days, plants were provided with the same mineral solution supplemented with 4 mM KNO₃. It has previously been demonstrated that treatment of plants with 4 mM KNO₃ results in denitrification activity, and it does not inhibit nodule formation or nitrogenase activity (Mesa *et al.*, 2004; Meakin *et al.*, 2007). Nodules were harvested from 34-day-old plants, frozen into liquid nitrogen and stored at -80 °C, except those nodules to be used for enzyme activities and NO determination.

6.4. Bacteroid isolation.

Bacteroids were prepared as previously described (Mesa *et al.*, 2004). In brief, 1.5 g of fresh nodules was ground in 7.5 ml of 50 mM Tris/HCl (pH 7.5) supplemented with 200 mM mannitol. The homogenate was filtered through four layers of cheesecloth and centrifuged at 250 g at 4 °C for 5 min to remove nodule debris. The resulting supernatant was recentrifuged at 12 000 g at 4 °C for 10 min to pellet the bacteroids.

The bacteroids were washed twice with 50 mM Tris/HCl (pH 7.5) and resuspended in a final volume of 2.5 ml.

6.5. Analytical methods.

For assays with cell-free extracts, bacteroids and free-living cells were broken by sonication with an Ultrasonic Processor (Hielscher). Aliquots of 500 µl of cells were broken by three 10-second bursts of sonication.

The protein concentration of bacteroids and free-living cells solutions was estimated by using the Bio-Rad assay, with a standard curve of varying BSA concentrations.

For determination of methyl viologen (MV)-dependent nitrite reductase activity, aliquots of bacteroid or free-living cells preparations (0.2-0.4 mg protein) were added to a reaction mixture (NaNO₂, 200 µM; MV, 200 µM; phosphate buffer pH 7.5, 10 mM) and the reaction started with the addition of sodium dithionite. The reactions were run at 30 °C for 15 min and stopped through the oxidation of the sodium dithionite by vortexing. Controls were run in parallel, but in these reactions, the sodium dithionite was oxidised at the start of the reaction. Nitrite was estimated after diazotation by adding the sulfanilamide/naphthylethylene diamine dyhydrochloride reagent (Nicholas & Nason, 1957).

For determination of NO reductase activity in bacteroids and free-living cells a kinetic MV-dependent assay was used. For each assay, a 3 ml cuvette was filled with 2.5 ml 10 mM phosphate buffer (pH 7.5), 100 µl bacteroid preparation or cell solution (0.2-0.4 mg protein), and 25 µl 100 mM MV solution, sealed with a mini suba seal, and made anaerobic by sparging with oxygen-free nitrogen gas for 10 min. A 100 mM sodium dithionite solution was freshly made and sparged before its addition with a gas-tight Hamilton syringe to the cuvette. Enough sodium dithionite was added to turn the solution blue, with an absorbance of approximately 2 at 600 nm in the spectrophotometer (Aminco DW-2000 or Hitachi U-3310). Once a steady base-line was observed, 100 µl of a saturated NO solution was added to the cuvette to begin the reaction. Each assay was run until the absorbance had dropped to zero, that is, when all of the MV was oxidised.

For determination of nitrite accumulation in nodules, 0.5 g of nodules was homogenized with 2 ml 1 M zinc acetate and centrifuged at 12000 g at 4 °C for 5 min.

For the determination of nitrite accumulation in free-living cultures, 1 ml samples of the cultures were centrifuged at 8000 g for 3 min to remove the cells. The resultant supernatants from the nodule extracts or from the cells cultures were mixed with 1 vol. 100% ice-cold ethanol and centrifuged for a further 5 min. The nitrite concentration of the final supernatant was determined as described above.

6.6. Detection of NO in nodules.

A stock solution of 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorescein (DAF-FM, 7 mM in dimethylsulfoxide, Invitrogen) was diluted 1000-fold in water before use. Fresh nodules were incubated with the diluted DAF-FM solution for 1 h in the dark at 25 °C. After incubation, fluorometric measurements of the solution were performed in a fluorometer (QM200, Photon Technology International) with 495 nm excitation and 515 nm emission wavelength (2 nm band width).

6.7. Treatment of nodules with a NO scavenger.

Fresh nodules were incubated with distilled water containing 2 mM carboxy-2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-3-oxide-1-oxyl (c-PTIO, Invitrogen) for 30 min in the dark at 25 °C.

6.8. Whole nodule EPR spectroscopy.

Whole nodule EPR spectroscopy was performed essentially as described by Meakin *et al.* (2007). Intact, frozen root nodules (between 2.5 and 2.8 mm in diameter) were transferred individually to 12 cm quartz EPR tubes with 3 mm internal diameter, under liquid nitrogen. Each sample contained a total biomass of 160 ± 10 mg. Nodules were closely packed and filled the tube to a depth of ca. 30 mm. A 10 cm length of ethylene-tetrafluoroethylene tubing (GE Healthcare) was inserted into the tube and secured to allow liquid gas boil-off, but prevent nodule movement during sample loading and measurement. In the absence of nodules, neither the tubes nor tubing gave rise to any EPR signal. EPR spectra were recorded using a Bruker ER200D spectrometer, fitted with a dual mode cavity (type ER4116DM), which was interfaced to an ELEXSYS control system (Bruker Analytische Messtechnik GmbH) and equipped with a variable temperature liquid helium flow cryostat (Oxford Instruments, UK). Spectra were recorded at 41 ± 1 K. Microwave frequency was 9.683 GHz (X-band)

with 2 mW power applied. Spectra are the average of three scans with modulation amplitude, 0.3 mT (3 Gauss) and signal gain, 2.83×10^4 .

6.9. UV-visible spectroscopy.

For the quantification of the percentage of Lb bound to NO within nodules, Lb extracts were prepared from nodules by homogenising 0.3 g of nodules with 4 ml of Lb extraction buffer ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 40 mM (pH 7.4); $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 10 mM (pH 7.4); $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0.02%; NaHCO_3 0.1%) and centrifuging at 12000 g at 4 °C for 20 min to retain the supernatant. Absorption spectra from 300-700 nm at 20 °C were recorded from 1 ml reduced and nitrosylated nodule extracts using a Hitachi U-3310 Spectrophotometer linked to a circulating BC-10 water bath (Fisher Scientific). Absorption measurements were taken from the spectra to allow quantification of the nodular LbNO following the protocol previously described by Meakin *et al.* (2007).

6.10. Detection of transcripts.

Total RNA was isolated from nodules using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), treated with DNaseI Amplification Grade (Invitrogen) and reverse transcribed using SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). For each RNA sample, control experiments in which the reverse transcriptase step was omitted were done to confirm the absence of any residual DNA. The complementary DNA was amplified with the specific primers for *nirK*, *norC*, *nirB*, *hmpA* and *gapA* genes (supplemental table S2). To ensure that equal amounts of total RNA were loaded in the control and the test reaction, *gapA* gene was used as an internal standard. Primers were designed with Oligo 6.4 software. Prior to the reverse transcription PCR experiments, for each pair of primers the optimization of the PCR amplification conditions was done using *B. japonicum* genomic DNA as the template. After initial denaturation step at 95°C for 5 min and 30 cycles of amplification (94 °C for 1 min; 60 °C for 1 min; 72 °C for 1 min) and a final elongation step at 72 °C for 5 min, PCR products were analyzed by electrophoresis in agarose gels.

7. ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grant AGL2006-13848-CO2-02/AGR from Ministerio de Educación y Ciencia, and 107PICO312 from CYTED. Support from the Junta de Andalucía (BIO-275) is also acknowledged, as is the financial support from CSIC (2007GB0035) and from CSIC/CONACYT (2005MX0032) for collaborations with UEA (UK) and Centro de Ciencias Genómicas (México). C. Sánchez was supported by a fellowship from the CSIC (I3P). DJR is the recipient of a Royal Society Wolfson Merit Award.

8. LITERATURE CITED

- Appleby, C.A. 1992. The origin and functions of hemoglobin in plants. *Sci Progress* 76: 365-398.
- Baudouin, E., Pleuchot, L., Engler, G., Pauly, N., and Puppo, A. 2006. Nitric oxide is formed in *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* functional nodules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19: 970-975.
- Bedmar, E.J., Robles, E.F., and Delgado, M.J. 2005. The complete denitrification pathway of the symbiotic nitrogen-fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochem. Soc. Trans.* 33: 141-144.
- Besson-Bard, A., Pugin, A., and Wendehenne, D. 2008. New Insights into Nitric Oxide Signaling in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 21–39.
- Bergersen, F.J. 1961. The growth of *Rhizobium* in synthetic media. *Austral. J. Biol. Sci.* 14: 349-360.
- Bethke, P.C., Badger, M.R., and Jones, R.L. 2004. Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell.* 16: 332-341.
- Boccarda, M., Mills, C.E., Zeier, J., Anzi, C., Lamb, C., Poole, R.K., and Delledonne, M. 2005. Flavohaemoglobin HmpX from *Erwinia chrysanthemi* confers nitrosative stress tolerance and affects the plant hypersensitive reaction by intercepting nitric oxide produced by the plant host. *Plant J.* 43: 226-237.
- Bueno, E, Bedmar, E.J., Richardson, D.J., and Delgado, M.J. 2008. Role of *Bradyrhizobium japonicum* cytochrome *c*₅₅₀ in nitrite and nitrate respiration. *FEMS Microbiol. Lett.* 279: 188-194.

- Campbell, W.H. and Kinghorn, J.R. 1990. Functional domains of assimilatory nitrate and nitrite reductases. *Trends Biochem. Sci.* 15: 315-319.
- Costa, C., Macedo, A., Moura, I., Moura, J.J.G., Le Gall, J., Berlier, Y., Liu, M.-Y., and Payne, W.J. 1990. Regulation of the hexaheme nitrite/nitric oxide reductase of *Desulfovibrio desulfuricans*, *Wolinella succinogenes* and *Escherichia coli*. *FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett.* 276: 67-70.
- Cueto, M., Hernández-Perera, O., Martín, R., Bentura, M.L., Rodigo, J., Lamas, S., and Golvano, M.P. 1996. Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. *FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett.* 398: 159-164.
- de Vries, S., Pouvreau S., and Pouvreau L.A.M. 2007. Nitric oxide reductase: structural variations and catalytic mechanism. *In* *Biology of the nitrogen cycle*. Bothe, H., Ferguson, S.J., and Newton, W.E. (eds). Elsevier, pp. 57-66.
- Delgado, M.J., Bedmar, E.J., and Downie, J.A. 1998. Genes involved in the formation and assembly of rhizobial cytochromes and their role in symbiotic nitrogen fixation. *Adv. Microbial Phys.* 40: 191-231.
- Delgado, M.J., Bonnard, N., Tresierra-Ayala, A., Bedmar, E.J., and Müller, P. 2003. The *Bradyrhizobium japonicum napEDABC* genes encoding the periplasmic nitrate reductase are essential for nitrate respiration. *Microbiology.* 149: 3395-3403.
- Delledonne, M. 2005. NO news is good news for plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 390-396.
- Flores, E., Frías, J.E., Rubio, L.M., and Herrero, A. 2005. Photosynthetic nitrate assimilation in cyanobacteria. *Photosyn. Res.* 83: 117-133.
- Gardner, A.M., Helmick, R.A., and Gardner, P.R. 2002. Flavorubredoxin, an inducible catalyst for nitric oxide reduction and detoxification in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 277: 8172-8177.
- Gardner, P.R. 2005. Nitric oxide dioxygenase function and mechanism of flavohemoglobin, hemoglobin, myoglobin and their associated reductases. *Journal of Inorganic Biochemistry.* 99: 247-266.
- Grün, S., Lindermayr, C., Sell, S., and Durner, J. 2006. Nitric oxide and gene regulation in plants. *J. Exp. Bot.* 57: 507-516.
- Hernández-Urzúa, E., Mills, C.E., White, G.P., Contreras-Zentella, M.L., Escamilla, E., Vasudevan, S.G., Membrillo-Hernández, J., and Poole, R.K. 2003.

- Flavo-hemoglobin Hmp, but not its individual domains, confers protection from respiratory inhibition by nitric oxide in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 278: 34975-34982.
- Hutchings, M.I., Mandhana, N., and Spiro, S. 2002. The NorR protein of *Escherichia coli* activates expression of the flavorubredoxin gene *norV* in response to reactive nitrogen species. *J. Bacteriol.* 184: 4640-4643.
- Kanayama, Y., Watanabe, I., and Yamamoto, Y. 1990. Inhibition of nitrogen fixation in soybean plants supplied with nitrate I. Nitrite accumulation and formation of nitrosylleghemoglobin in nodules. *Plant Cell Physiol.* 31: 341-346.
- Mathieu, C., Moreau, S., Frenco, P., Puppo, A., and Davies, M.J. 1998. Direct detection of radicals in intact soybean nodules: presence of nitric oxide-leghemoglobin complexes. *Free. Radic. Biol. Med.* 24: 1242-1249.
- Mason, M.G., Shepherd, M., Nicholls, P., Dobbin, P.S., Dodsworth, K.S., Poole, R.K., and Cooper, C.E. 2009. Cytochrome *bd* confers nitric oxide resistance to *Escherichia coli*. *Nat. Chem. Biol.* 5: 94-96.
- Meakin G.E., Jepson B., Bedmar E.J., Richardson D.J., and Delgado M.J. 2006. The role of *Bradyrhizobium japonicum* nitric oxide reductase in nitric oxide detoxification in soya bean root nodules. *Biochem. Soc. Trans.* 34: 195-196.
- Meakin G.E., Bueno E., Jepson B., Bedmar E.J., Richardson D.J., and Delgado M.J. 2007. The contribution of bacteroidal nitrate and nitrite reduction to the formation of nitrosylleghaemoglobin complexes in soybean root nodules. *Microbiology.* 153: 411-419.
- Mesa, S., Velasco, L., Manzanera, M.E., Delgado, M.J., and Bedmar, E.J. 2002. Characterisation of the *norBCQD* genes, encoding nitric oxide reductase, in the nitrogen fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Microbiology.* 148: 3553-3560.
- Mesa, S., de Dios Alché, J., Bedmar, E.J., and Delgado, M.J. 2004. Expression of the *nir*, *nor* and *nos* denitrification genes from *Bradyrhizobium japonicum* in soybean root nodules. *Physiol. Plantarum.* 120: 205-211.
- Meyer, C., Lea, U.S., Provan, F., Kaiser, W.M., and Lillo, C. 2005. Is nitrate reductase a major player in the plant NO (nitric oxide) game? *Photosyn. Res.* 83: 181-189.
- Miller, J.H. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- Mills, P., Richardson, D.J., Hinton, J.C.D., and Spiro, S. 2005. Detoxification of nitric oxide by the flavorubedoxin of *Salmonella enterica* serovar Thyphimurium. *Biochem. Soc. Trans.* 33: 198-199.
- Mills, P., Rowley, G., Spiro, S., Hinton, J.C.D., and Richardson, D.J. 2008. A combination of cytochrome *c* nitrite reductase (NrfA) and flavorubedoxin (NorV) protects *Salmonella enterica* serovar Thyphimurium against killing by NO in anoxic environments. *Microbiol.* 154: 1218-1228.
- Minchin, F.R. 1997. Regulation of oxygen diffusion in legume nodules. *Soil. Biol. Biochem.* 29: 881-888.
- Minchin, F.R., James, E.K., and Becana, M. 2008. Oxygen diffusion, production of reactive oxygen and nitrogen species, and antioxidants in legume nodules. *In* Nitrogen-Fixing Leguminous Symbioses. Dilworth, M.J., James, E.K., Sprent, J.I., and Newton W.E. (eds). Springer Science, pp. 321-362.
- Neill, S., Bright, J. Desikan R., Hancock, J. Harrison, J, and Willson I. 2008. Nitric oxide evolution and perception. *J. Exp. Bot.* 59: 25-35.
- Nicholas, D.J.D. and Nason, A. 1957. Determination of nitrate and nitrite. *In* Methods in Enzymology. Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. (eds). New York: Academic Press, pp. 981-984.
- Ostrowski, J., Wu, J.-Y., Rueger, D.C., Miller, B.E., Siegel, L.M., and Kredich, N.M. 1989. Characterization of the *cysJIH* regions of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* 264: 15726-15737.
- Poock, S.R., Leach, E.R., Moir, J.W.B., Cole, J.A., and Richardson, D.J. 2002. Respiratory detoxification of nitric oxide by the cytochrome *c* nitrite reductase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 277: 23664-23669.
- Poole, R.K. 2005. Nitric oxide and nitrosative stress tolerance in bacteria. *Biochem. Soc. Trans.* 33: 176-180.
- Pullan, S.T., Monk, C.E., Lee, L., and Poole, R.K. 2008. Microbial responses to nitric oxide and nitrosative stress: growth, “omic” and physiological methods. *Methods Enzymol.* 437: 499-519.
- Regensburger, B. and Hennecke, H. 1983. RNA polymerase from *Rhizobium japonicum*. *Arch. Microbiol.* 135: 103-109.
- Rigaud, J. and Puppo, A. 1975. Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacteroids. *J. Gen. Microbiol.* 88: 223-228.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sánchez, C., Gates, A.J., Meakin, G.E., Uchiumi, T., Girard, L., Richardson, D.J., Bedmar, E.J., and Delgado, M.J. Production of nitric oxide and nitrosylhaemoglobin complexes in soybean nodules in response to flooding. Submitted to Mol. Plant-Microbe Interact.
- Sasakura, F., Uchiumi, T., Shimoda, Y., Suzuki, A., Takenouchi, K., Higashi, S., and Abe, M. 2006. A class 1 hemoglobin gene from *Alnus firma* functions in symbiotic and nonsymbiotic tissues to detoxify nitric oxide. Mol. Plant-Microbe Interact. 19: 441-450.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., and Pühler, A. 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. Gene 145: 69-73.
- Siegel, L.M. and Davis, P.S. 1974. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-sulfite reductase of enterobacteria. J. Biol. Chem. 249: 1587-1598.
- Siegel, L.M., Rueger, D.C., Barber, M.J., and Krueger, R.J. 1982. *Escherichia coli* sulfite reductase hemoprotein subunit. J. Biol. Chem. 257: 6343-6350.
- Simon, R., Priefer, U., and Pühler, A. 1983. Vector plasmids for in vivo and in vitro manipulation of Gram-negative bacteria. In Molecular genetics of the bacteria-plant interaction. Pühler, A (ed.). Heidelberg: Springer, pp. 98-106.
- Shimoda, Y., Shimoda-Sasakura, F., Kucho, K., Kanamori, N., Nagata, M., Suzuki, A., Abe, M., Higashi, S., and Uchiumi, T. 2009. Overexpression of class 1 plant hemoglobin genes enhances symbiotic nitrogen fixation activity between *Mesorhizobium loti* and *Lotus japonicus*. Plant J. 57: 254-63.
- Stöhr, C., Strube, F., Marx, G., Ullrich, W.R., and Rockel, P. 2001. A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. Planta. 212: 835-841.
- Trinchant, J.-C. and Rigaud, J. 1982. Nitrite and nitric oxide as inhibitors of nitrogenase from soybean bacteroids. Appl. Environ. Microbiol. 44: 1385-1388.
- van Spanning, R.J., Delgado, M.J., and Richardson, D.J. 2005. The nitrogen cycle: denitrification and its relationship to nitrogen fixation. In Nitrogen fixation in

- agriculture, forestry, ecology and the environment. Werner, D. and Newton, W.E. (eds). Springer Netherlands, pp. 277-342.
- Velasco, L., Mesa, S., Delgado, M.J., and Bedmar, E.J. 2001. Characterization of the *nirK* gene encoding the respiratory, Cu-containing nitrite reductase of *Bradyrhizobium japonicum*. Biochim. Biophys. Acta. 1521: 130-134.
- Velasco, L., Mesa, S., Xu, C., Delgado, M.J., and Bedmar, E.J. 2004. Molecular characterization of *nosRZDFYLX* genes coding for denitrifying nitrous oxide reductase of *Bradyrhizobium japonicum*. Antonie van Leeuwenhoek. 85: 229-235.
- Vega, J.M and Kamin, H. 1977. Spinach nitrite reductase: purification and properties of a siroheme-containing iron sulphur enzyme. J. Biol. Chem. 252: 896-909.
- Wu, G., Wainwright, L.M., and Poole, R.K. 2003. Microbial globins. Adv. Microbiol. Physiol. 47; 255-310.
- Yamasaki, H., Sakihama, Y., and Takahashi, S. 1999. An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. Trends Plant Sci. 4: 128-129.
- Yamasaki, H. and Sakihama, S. 2000. Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett. 468: 89-92.
- Zumft, W.G. 2005. Nitric oxide reductases of prokariotes with emphasis on the respiratory, heme-copper oxidase type. J. Inorg. Biochem. 99: 194-215.

9. SUPPLEMENTAL MATERIAL

9.1. Supplemental table S1.

Supplemental Table S1. Primer pairs for the amplification of upstream and downstream *nirB* regions

Forward	Reverse
P1: CGGAATTC AAGGATTT CATCGGCTTCCT <i>EcoRI</i>	P2: CGGGATCC AAATCATGTAGCCGGACAGC <i>BamHI</i>
P3: CGGGATCC AAGGCAGCTCGATATGACG <i>BamHI</i>	P4: AAACTGCAG AGATGGCAGTTGAGGATCG <i>PstI</i>

9.2. Supplemental table S2.

Supplemental Table S2. Primers used for detection of transcripts from bacteroids

Gene	Forward	Reverse
<i>gapA</i>	CCCTCGAAGCTGCCCTGGAAG	GGCCGCGATAGAGATCCTTGT
<i>nirK</i>	CCGCACAACATCGACTTTCAC	CGCCGACCTTGCCGTTGAACA
<i>norC</i>	CTTCTACGGCGGCTCGGCTTT	GTCAGGTTGAACTGCGGCATC
<i>nirB</i>	GGTTGGAGGCGGCCTATGGAC	CTGCATGACGTCGTTGACCAC
<i>hmpA</i>	CGAGATCAACGCGCTGCTTTA	TGTCGGCGATATAGAGGGAGG

DISCUSIÓN GENERAL

Capítulo 1. Producción de óxido nítrico y de complejos nitrosil-leghemoglobina en nódulos de soja en respuesta a encharcamiento.

Varios estudios han aportado evidencias directas o indirectas acerca de la producción de óxido nítrico (NO) en nódulos de leguminosas (Baudouin *et al.*, 2006; Pii *et al.*, 2007; Shimoda *et al.*, 2005). Recientemente, Meakin y colaboradores (2007) han demostrado la hipoxia produce un incremento en la formación de complejos nitrosil-leghemoglobina (LbNO) en nódulos de soja. Sin embargo, actualmente se desconocen las fuentes, así como el papel del NO en nódulos. En este sentido, se ha propuesto que el NO es un inhibidor directo de la actividad de la enzima nitrogenasa en nódulos de soja (Trinchant & Rigaud, 1982). Trabajos más recientes, han demostrado que la aplicación de un donador de NO (SNAP) provoca una disminución de la actividad nitrogenasa en nódulos de *Lotus japonicus* (Shimoda *et al.*, 2009) y *Alnus firma* (Sasakura *et al.*, 2006). Sin embargo, estos autores, no establecieron las condiciones fisiológicas por las que el NO puede provocar daño a la actividad nitrogenasa, ni tampoco profundizaron en el efecto del NO sobre la expresión de los genes que codifican dicha enzima.

En este trabajo, se han utilizado la espectroscopías EPR (electron paramagnetic resonance) y UV-visible para detectar el NO unido a leghemoglobina (Lb) en nódulos. Trabajos previos identificaron la señal correspondiente a los complejos LbNO obtenida por EPR a partir de la Lb de soja purificada (Lb α) e incubada con nitrito en presencia de nitrato sódico (Meakin *et al.*, 2007) o con un donador de NO (Mathieu *et al.*, 1998). El empleo de EPR y UV-visible ha permitido demostrar que el encharcamiento provoca un incremento de la formación de complejos LbNO en nódulos de soja.

Se han propuesto varios mecanismos por los que se puede producir NO durante la interacción planta-rizobio (revisado por Pauly *et al.*, 2006). La desnitrificación puede ser uno de ellos, puesto que el nitrito y el NO son intermediarios de la reducción de nitrato a nitrógeno molecular (N₂). De hecho, se ha sugerido que la reducción de nitrato por los bacteriodes de *Bradyrhizobium japonicum* contribuye a la formación de complejos LbNO en nódulos de soja, en respuesta a condiciones hipóxicas (Meakin *et al.*, 2007). De acuerdo con estas observaciones, en el presente trabajo se ha demostrado que en nódulos de plantas de soja inoculadas con la cepa mutante *napA* de *B. japonicum*, no se observa la inducción de la formación de LbNO en respuesta a

encharcamiento. Además, también se ha demostrado que tanto el nitrito, producido por la enzima Nap y que se acumula en nódulos formados por la mutante *nirK*, como el NO, producido por la enzima NirK y cuya producción incrementa en nódulos formados por la mutante *norC*, son los principales responsables del aumento de la acumulación de LbNO observado en nódulos de soja en respuesta a encharcamiento. Por el contrario, otros autores han sugerido que la desnitrificación no está implicada en la producción de NO en la simbiosis *Medicago truncatula-Sinorhizobium meliloti* (Baudouin *et al.*, 2006). Es probable, por tanto, que la desnitrificación tenga un papel importante en nódulos cuando las raíces están sometidas a condiciones fisiológicas específicas, como puede ser la hipoxia y el encharcamiento.

La presencia de niveles basales de LbNO, detectados por espectroscopía UV-visible, y de NO, en nódulos de plantas inoculadas con la mutante *napA* y sometidas a encharcamiento, sugiere la presencia de otras fuentes de NO, independientes de la desnitrificación, como puede ser la enzima nitrato reductasa o una actividad tipo NOS, procedentes de la fracción vegetal del nódulo. Cueto y colaboradores (1996) demostraron la presencia de actividad tipo NOS en nódulos de lupino, y estudios más recientes, han sugerido que una actividad tipo NOS contribuye a la producción de NO en nódulos de *M. truncatula* (Baudouin *et al.*, 2006), pero, hasta la fecha, se desconoce la presencia de una enzima tipo NOS en nódulos de soja.

En este trabajo, también se ha estudiado el papel de las enzimas Nap, NirK y Nor en la formación de LbNO en nódulos de soja en respuesta a encharcamiento mediante el análisis de las actividades nitrato, nitrito y óxido nítrico reductasa, dependientes de MV, en bacteroides aislados de nódulos procedentes de plantas inoculadas con la cepa parental USDA110, o con las mutantes *napA* GRPA1, *nirK* GRK308 o *norC* GRC131 de *B. japonicum*. Los niveles de actividad nitrato reductasa observados en bacteroides de una cepa de *B. japonicum* mutada en el gen *napA*, sugieren que el 100% y el 90% de la actividad nitrato reductasa detectada en bacteroides de la cepa parental aislados de nódulos control y encharcados, respectivamente, se debe a la enzima Nap. Sin embargo, la detección de niveles similares de actividad nitrito reductasa en bacteroides de la cepa parental y de la mutante *nirK* aislados de nódulos control, sugiere que, aparte de NirK, deben existir en los bacteroides otras enzimas implicadas en la reducción de nitrito. En la secuencia del genoma de *B. japonicum* publicada por Kaneko y colaboradores (2002), se localiza el gen *nirB*

(<http://genome.kazusa.or.jp/rhizobase/>), que podría codificar una enzima nitrato reductasa, que reduce el nitrato a amonio durante la asimilación de nitrato (Lin y Stewart, 1998). Por tanto, queda pendiente estudiar el posible papel de esta enzima en la reducción de nitrato en los bacteroides. En bacteroides aislados de nódulos procedentes de plantas encharcadas, NirK fue responsable del 58% de la actividad nitrato reductasa, lo que sugiere que dicha enzima debe ser responsable, en parte, de la acumulación de nitrato y LbNO observada en nódulos de plantas inoculadas con la mutante *nirK* sometidas a encharcamiento. Aunque no se observaron diferencias en actividad NO reductasa entre bacteroides de la cepa parental y de la mutante *norC* aislados de nódulos encharcados, sí se observó un aumento significativo de la formación de NO en nódulos producidos por la mutante *norC*, en comparación con nódulos formados por la cepa parental, lo que indica que NorC está implicada en la reducción de NO en nódulos, en condiciones de encharcamiento.

Puesto que la expresión de *nifH* disminuyó en aquellos nódulos donde se observó una inducción en la producción de NO, y esta situación ocurrió en nódulos procedentes de plantas inoculadas con la cepa parental y la mutante *norC* de *B. japonicum* y sometidas a encharcamiento, proponemos que el NO producido por la desnitrificación podría ser la molécula implicada en la disminución de la expresión de *nifH* bajo condiciones de encharcamiento. De acuerdo con esta hipótesis, el efecto observado sobre la expresión de *nifH* en los nódulos tratados con un secuestrador de NO (c-PTIO) fue significativamente menor. Puesto que también se ha propuesto al nitrato como un inhibidor de la actividad nitrogenasa (Trinchant y Rigaud, 1982), en este trabajo se analizó la expresión de *nifH* en nódulos de plantas inoculadas con la mutante *nirK* y sometidas a encharcamiento. Aunque se observó un aumento significativo de nitrato y LbNO en estos nódulos, en comparación con nódulos producidos por la cepa parental, el nivel de transcritos de *nifH* no se afectó. Este resultado descarta al nitrato como un posible inhibidor de la expresión del gen *nifH*. En aquellos nódulos producidos por las mutantes *napA* o *nirK*, y sometidos a encharcamiento, donde la producción de NO vía desnitrificación está bloqueada, la expresión de *nifH* no se afectó. Todas estas observaciones apoyan la hipótesis de que el NO producido por la enzima NirK es la molécula implicada en la disminución de la expresión de *nifH* observada en condiciones de encharcamiento.

Puesto que el NO es un compuesto citotóxico, su acumulación, debida a la pérdida de actividad NO reductasa, es letal para bacterias desnitrificadoras (revisado por van Spanning *et al.*, 2005 y 2007; Zumft, 1997). Con el objeto de establecer si el efecto del NO sobre la expresión de *nifH* en nódulos es un efecto generalizado sobre la regulación génica, en este trabajo también se analizó la expresión de otros genes requeridos para la fijación de nitrógeno, como *nifD*, que codifica la subunidad α de la MoFe-proteína del complejo nitrogenasa, *fixA*, que codifica la cadena β de una flavoproteína que participa en la transferencia de electrones, y *nifS*, que codifica una proteína involucrada en la biosíntesis de los grupos metálicos de la nitrogenasa. La expresión de *nifA* y *nifS* no se afectó en nódulos producidos por la cepa parental y sometidos a encharcamiento, donde se indujo la producción de NO, por lo que se descarta la posibilidad de un efecto tóxico general del NO sobre la regulación génica en nódulos.

El aumento de LbNO observado en nódulos producidos por la cepa *nirK* y sometidos a encharcamiento, en los que además se observó una acumulación de nitrito, no afectó negativamente a la actividad nitrogenasa en comparación con los nódulos producidos por la cepa parental. Aunque el encharcamiento incrementó significativamente la formación de LbNO en nódulos producidos por la mutante *norC* en comparación con aquellos producidos por la cepa parental, los valores de actividad nitrogenasa fueron muy similares en los nódulos producidos por ambas cepas. Estas observaciones demuestran que el incremento de LbNO en nódulos no afectó al funcionamiento óptimo de la enzima nitrogenasa. Considerando estas observaciones, proponemos un papel adicional de la Lb como secuestradora de nitrito y NO, y por tanto, como protectora de la actividad nitrogenasa en nódulos. De acuerdo con esta hipótesis, otros autores han sugerido que, sólo una proporción mínima de la Lb presente en el nódulo estaría unida al oxígeno, y ya que ésta presenta una afinidad mayor por el NO que por el oxígeno, la Lb (presente en nódulos en concentraciones elevadas) puede actuar como un secuestrador de NO, modulando su bioactividad (Rigaud y Puppo, 2005). De hecho, se ha propuesto que las hemoglobinas no simbióticas pueden participar en la destoxicación de NO, ya que recientemente se ha demostrado que la sobreexpresión de una Hb de clase 1 protege a la fijación simbiótica de nitrógeno, eliminando el NO en nódulos de *L. japonicus* (Shimoda *et al.*, 2009). En células de *B. japonicum* cultivadas en vida libre en condiciones desnitrificantes, las enzimas NirK y

Nor son muy activas, y tienen un papel muy importante en la destoxicación de nitrito y NO, ya que se ha demostrado que células con mutaciones en los genes *nirK* o *norC* presentan un defecto en el crecimiento anaeróbico (Velasco *et al.*, 2001; Mesa *et al.*, 2002). Sin embargo, en condiciones simbióticas, la actividad de las enzimas NirK y Nor es alrededor de 14 y 7 veces, inferior, respectivamente, a la detectada en vida libre. Estas observaciones apoyan la hipótesis que propone a la Lb, como el sistema principal implicado en la destoxicación de nitrito y NO de los nódulos, producidos por la desnitrificación.

La participación del NO producido por NirK en la expresión de los genes que codifican la nitrogenasa también se ha confirmado en condiciones de vida libre, mediante el análisis de la actividad β -galactosidasa de la fusión traduccional *nifD'*-*lacZ*. Tras la incubación en condiciones anaeróbicas, la expresión de *nifD* disminuyó en células que tenían mutado el gen *norC*, las cuales acumularon NO en el medio. Sin embargo, la acumulación de nitrito en el medio donde crecieron las células que tenían mutado el gen *nirK* no afectó la expresión de *nifD*. Los resultados obtenidos en vida libre confirman los obtenidos en simbiosis y nos permiten sugerir que el NO producido por la enzima NirK es un potente inhibidor de la expresión de los genes de la nitrogenasa. El mecanismo por el que puede ocurrir tal inhibición se desconoce hasta el momento. Varios trabajos han sugerido que la proteína FixL, componente de la cascada reguladora FixLJ/FixK₂, que controla la fijación de nitrógeno (Fischer, 1994), podría sentir NO (Gilles-González *et al.*, 1994; Winkler *et al.*, 1996; Gong *et al.*, 2000), de la misma forma que sensa oxígeno. Alternativamente, el NO podría reaccionar directamente con la proteína reguladora de los genes de la fijación de nitrógeno, NifA (Fischer, 1994), inactivando la proteína, tal y como se ha demostrado para FNR, una proteína reguladora de respuesta a oxígeno en *Escherichia coli* (Cruz-Ramos *et al.*, 2002; Pullan *et al.*, 2007). Puesto que NifA es activador directo de la transcripción de los genes responsables de la fijación de nitrógeno, un posible efecto del NO sobre dicho activador podría resultar en un efecto generalizado sobre la transcripción de todas las dianas de NifA. Pero, sorprendentemente, nuestros resultados muestran que la transcripción de dos de estas dianas, *fixA* y *nifS*, no se ve afectada por la presencia de NO en nódulos sometidos a encharcamiento. Recientemente, Mesa y colaboradores (2008), han sugerido que el regulón de FixK₁ contiene un número importante de genes controlados negativamente, y la mayoría de ellos, pertenece al grupo de genes activados

por NifA. Dentro del regulón, los genes *nifD* y *nifH* pertenecen a dicho grupo, pero no es el caso de los genes *fixA* y *nifS* (Mesa *et al.*, 2008). Estos autores proponen que la disminución de la concentración de oxígeno hasta un nivel intermedio induce la cascada FixLJ/FixK₂, y consecuentemente FixK₁, la cual mantiene reprimidos algunos genes dependientes de NifA. Cuando la concentración de oxígeno disminuye, las células producen más cantidad de proteína NifA activa, que, gradualmente, va anulando el efecto represor de FixK₁. En el caso en que NifA no se activara, debido a la presencia de NO en nódulos sometidos a encharcamiento, la represión no se anularía. El mecanismo implicado en la regulación negativa de los genes la nitrogenasa por NO está siendo investigado actualmente en nuestro grupo de investigación.

Capítulo 2. Relevancia fisiológica del efecto de la desnitrificación de *Bradyrhizobium japonicum* sobre la fijación simbiótica de dinitrógeno en plantas de soja sometidas a encharcamiento.

Las condiciones hipóxicas del interior del nódulo no sólo permiten el mantenimiento de la actividad nitrogenasa, sino también la expresión de los genes responsables del proceso de desnitrificación (Mesa *et al.*, 2004; Meakin *et al.*, 2007). Aunque el exceso de nitrógeno fijado inhibe la formación y el funcionamiento de los nódulos, el nitrato, en pequeñas dosis, puede ser utilizado por los bacteroides para la generación de ATP vía desnitrificación, en beneficio de la energía necesaria para la actividad nitrogenasa. De hecho, se ha demostrado que los bacteroides de *B. japonicum* aislados de nódulos, son capaces de fijar nitrógeno utilizando el nitrato como aceptor de electrones para la conservación de energía (O'Hara & Daniel, 1985). En varias publicaciones, se sugiere que la fijación simbiótica de nitrógeno (FSN) y la desnitrificación, dos procesos antagonistas en el ciclo del nitrógeno, pueden llevar a cabo funciones complementarias en los rizobios simbióticos, que podrían ser importantes para la supervivencia de la bacteria dentro de los nódulos (revisado por Lucinski *et al.*, 2002).

En el capítulo 1 de resultados, se ha demostrado que el NO producido por la enzima NirK de *B. japonicum* NirK en respuesta a condiciones de encharcamiento disminuye la expresión de los genes responsables de la síntesis de la enzima nitrogenasa. Sin embargo, la implicación fisiológica de la producción de NO en nódulos

en respuesta a encharcamiento se desconocía. En este segundo capítulo, se ha analizado el fenotipo simbiótico, en condiciones de encharcamiento, de la mutante *nirK*, que no produce NO vía desnitrificación, y la *norC* de *B. japonicum*, que acumula el NO producido vía desnitrificación.

De acuerdo con Bacanamwo y Purcell (1999), después de 14 días de encharcamiento, se observó un descenso del SDW de las plantas inoculadas con cualquiera de las cepas utilizadas en este estudio. La actividad de la enzima nitrogenasa, estimada mediante el análisis del contenido de Lb de los nódulos, se afectó a los 7 días de encharcamiento. Estos resultados coinciden con lo observado previamente por Bacanamwo y Purcell (1999), y tal y como estos autores proponen, es probable que el descenso en biomasa observado a los 14 días de encharcamiento sea una consecuencia del descenso en la actividad nitrogenasa.

Tal y como observaron Bacanamwo y Purcell (1999), después de 7 días de encharcamiento se observó una disminución del número de nódulos (NN) y del peso seco de los nódulos (NDW) en las plantas inoculadas con cualquiera de las cepas utilizadas en este estudio. Sin embargo, en el caso de las plantas inoculadas con la mutante *norC*, el efecto del encharcamiento sobre los parámetros relacionados con la nodulación fue más pronunciado que en el caso de las plantas inoculadas con la cepa parental o la mutante *nirK*. Estudios previos realizados en nuestro grupo, mediante análisis de detección de NO por fluorescencia con DAF-FM, mostraron que en condiciones de encharcamiento, los nódulos producidos por la mutante *norC* acumulan más NO que aquellos producidos por la cepa parental o la mutante *nirK* (Sánchez *et al.*, consultar el Capítulo 1). Según estas observaciones, es posible que los elevados niveles de NO producidos en los nódulos *norC* sean los responsables de un efecto más drástico del encharcamiento sobre el NN y el NDW en las plantas inoculadas con la mutante *norC*.

Tras 14 días de encharcamiento, el NDW de las plantas inoculadas con la cepa parental, o las mutantes *nirK* y *norC*, recuperó los niveles control. Además, después de 14 días de encharcamiento, las plantas inoculadas con la cepa parental o la mutante *norC*, presentaron mayor NN que sus respectivas plantas control. Sin embargo, no se observaron diferencias en NN de las plantas inoculadas con la mutante *nirK* comparadas con las plantas control. Estas observaciones indican que en plantas inoculadas con la mutante *nirK*, los 14 días de encharcamiento provocaron un

incremento en el peso individual de los nódulos, más que en el NN por planta. De acuerdo con esto, el peso seco por nódulo (razón entre NDW/NN de cada planta) fue significativamente mayor en plantas inoculadas con la mutante *nirK*, en comparación con aquellas inoculadas con la cepa parental o la mutante *norC*. Previamente, se ha demostrado que, al contrario de lo que ocurre en nódulos *nirK*, en los que la formación de NO a través de la desnitrificación está bloqueada, el encharcamiento induce la producción de NO en nódulos formados por la cepa parental, o la mutante *norC* de *B. japonicum* (Sánchez *et al.*, consultar el Capítulo 1). Por tanto, es posible que el NO producido por la desnitrificación sea el responsable del aumento del NN observado en plantas inoculadas con la cepa parental o la mutante *norC*, después de 14 días de encharcamiento. De acuerdo con esta hipótesis, se ha demostrado que el NO interviene la ruta de señalización iniciada por la auxinas que controla la formación de nódulos indeterminados (Pii *et al.*, 2007). Además, recientemente se ha demostrado, mediante un estudio transcriptómico de genes de *Medicago truncatula* que responden a NO, que el NO regula procesos importantes en el desarrollo y el funcionamiento de los nódulos (Ferrarini *et al.*, 2008). Alternativamente, puesto que el funcionamiento de los nódulos, según el contenido en Lb, se afectó más en aquéllos derivados de la cepa parental o la mutante *norC* que en aquellos derivados de la mutante *nirK*, es posible que las plantas compensen la disminución del funcionamiento de los nódulos incrementando el número de nódulos como han propuesto previamente Aydi y colaboradores (2008).

El encharcamiento durante 14 días no afectó el contenido de nitrógeno total (TN) y el enriquecimiento en ^{15}N (expresado como el porcentaje de átomos de ^{15}N en exceso) de plantas no inoculadas que dependían exclusivamente del aporte de nitrato. Sin embargo, sí se observó un descenso del TN de las plantas inoculadas después de 14 días de encharcamiento. Además, en estas plantas, el contenido en nitrógeno procedente de la FSN se afectó considerablemente, al mismo tiempo que se observó un notable incremento del porcentaje de átomos de ^{15}N en exceso. Estos resultados sugieren que el encharcamiento afectó la FSN de las plantas inoculadas, y que éstas respondieron captando y asimilando más nitrato a partir de la solución mineral. De acuerdo con estos resultados, varios trabajos han demostrado que las plantas de soja que crecen dependiendo sólo de la aplicación de nitrato, son menos sensibles al encharcamiento que aquellas que dependen exclusivamente de la FSN. Esto, a su vez, indica que el encharcamiento afecta más a la FSN que a la captación y asimilación de nitrato

(Bacanamwo y Purcell, 1999; Buttery, 1987), lo cual puede deberse a que el segundo proceso requiere menos oxígeno que el primero (Bacanamwo y Purcell, 1999).

Se ha propuesto que el descenso de la FSN en condiciones de encharcamiento es el resultado de un descenso en la masa de los nódulos y de la actividad específica de la nitrogenasa (Bacanamwo y Purcell, 1999; Minchin y Pate, 1975). En nuestro grupo, se ha demostrado previamente (Sánchez *et al.*, consultar el Capítulo 1) el efecto negativo del encharcamiento sobre la actividad nitrogenasa específica en nódulos procedentes de plantas inoculadas con la cepa parental de *B. japonicum* y las mutantes *nirK* y *norC*, mediante el análisis de la actividad reductora de acetileno (ARA) y el contenido de Lb de los nódulos (un parámetro que se correlaciona directamente con la actividad nitrogenasa, según LaRue y Child, 1978). En este trabajo, después de 7 y 14 días de encharcamiento, se observó una disminución en el contenido de Lb de los nódulos procedentes de plantas inoculadas con las tres cepas utilizadas en este estudio. Tal y como se observó en el estudio anterior (Sánchez *et al.*, consultar el Capítulo 1), el efecto del encharcamiento sobre el contenido de Lb fue más pronunciado en nódulos de plantas inoculadas con la cepa parental o la mutante *norC*, que en aquéllos de plantas inoculadas con la mutante *nirK*. En el estudio anterior, se propuso que el NO, producido por la desnitrificación en nódulos de soja sometidos a encharcamiento, afecta la expresión de los genes que codifican la nitrogenasa, y por tanto la actividad de dicha enzima.

Con el objeto de profundizar en la relevancia fisiológica de los efectos diferentes, debidos al encharcamiento, observados en nodulación y actividad nitrogenasa en plantas inoculadas con las mutantes *nirK* y *norC* de *B. japonicum*, se estimó el contenido nitrógeno derivado de la fijación de nitrógeno (FN) mediante el método isotópico de dilución del ^{15}N . Los resultados mostraron que, tras 14 días de encharcamiento, el descenso del FN fue más pronunciado en plantas inoculadas con la mutante *norC*, las cuales acumularon NO en los nódulos en respuesta a encharcamiento. Sin embargo, en aquellas plantas inoculadas con la mutante *nirK*, en cuyos nódulos la producción de NO vía desnitrificación está bloqueada, la FN mostró una mayor tolerancia en comparación con las plantas inoculadas con la cepa parental o la mutante *norC*. Puesto que después de 14 días de encharcamiento e independientemente de la cepa utilizada, la biomasa de los nódulos no se afectó, parece que la actividad nitrogenasa es el principal proceso responsable del descenso de la FN observada en las

plantas en respuesta a encharcamiento. En este trabajo se ha demostrado la implicación fisiológica del efecto del NO sobre la expresión de los genes de la nitrogenasa, propuesto en el Capítulo 1.

Capítulo 3. Implicación de la proteína NirB en la asimilación de nitrato en células de *Bradyrhizobium japonicum* y en la destoxificación de óxido nítrico en nódulos de soja.

En el genoma de *B. japonicum* se ha identificado un gen, *nirB*, que codifica una enzima nitrito reductasa asimilatoria. El gen *nirB* se encuentra en una región donde se han identificado otros genes relacionados con el proceso de asimilación del nitrato, como son *nrtABC*, que codifican un sistema de transporte de nitrato tipo ABC, y *nasA*, que codifica una nitrato reductasa asimilatoria. En este trabajo, se ha construido una cepa de *B. japonicum* mutante en el gen *nirB* mediante la delección de la región correspondiente a dicho gen, con el objeto de analizar el papel de NirB en la asimilación de nitrato en células de *B. japonicum*, y en la destoxificación de NO en nódulos de soja.

Las células mutantes *nirB* de *B. japonicum* mostraron un defecto en su capacidad de crecer aeróbicamente en medio mínimo con nitrato como única fuente de nitrógeno, lo que sugiere que NirB tiene un papel en la asimilación de nitrato, supuestamente como nitrito reductasa asimilatoria. Esta observación apoya la suposición de que el grupo de genes que aparece representado en la Figura 1 del Capítulo 3 codifica proteínas relacionadas con la asimilación de nitrato. Aunque la cepa mutante *nirB* no pudo crecer con nitrato como única fuente de nitrógeno, probablemente debido a que en dicha cepa el nitrito no se puede reducir a amonio, la actividad nitrito reductasa (Nir) dependiente de MV fue mayor en éstas cepa que en la cepa parental. Este resultado sugiere que en *B. japonicum*, existen otras vías de reducir el nitrito, las cuales se inducen cuando NirB está ausente. Sin embargo, NirB es necesaria para el crecimiento aeróbico dependiente de nitrato.

En condiciones anaeróbicas, con nitrato como única fuente de nitrógeno, la cepa mutante *nirK* fue incapaz de crecer, ya que NirK es necesaria para la respiración anaeróbica del nitrato (Velasco *et al.*, 2001), pero sorprendentemente, la cepa mutante *nirB* sí creció. Este hecho, junto con la detección de niveles actividad Nir en la mutante

nirB similares a los de la cepa parental, sugiere que en *B. japonicum* existen otras vías de reducir el nitrito a amonio para su asimilación, en condiciones anaeróbicas. Tal y como se ha demostrado previamente (Velasco *et al.*, 2001; Bueno *et al.*, 2008), la enzima NirK es la principal responsable de la respiración de nitrito durante el crecimiento anaeróbico dependiente de nitrato, puesto NirK fue la responsable de aproximadamente el 91% de la actividad Nir detectada en la cepa parental incubada en condiciones desnitrificantes.

Como ya se ha comentado, la capacidad de crecer en condiciones anaeróbicas dependientes de nitrato, junto con la detección de actividad Nir tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas dependientes de nitrato, en células de la cepa mutante *nirB*, sugieren que en *B. japonicum* deben existir otras rutas de reducción de nitrito. Una posibilidad es una nitrito reductasa dependiente de ferredoxina (Fd-Nir), codificada por *nirA*, que acepta los electrones de la ferredoxina reducida para reducir el nitrito a amonio (Campbell y Kinghorn, 1990). Hasta la fecha, las Fd-Nirs sólo se han caracterizado en bacterias fototróficas y en plantas superiores (Flores *et al.*, 2005), y todavía no se han identificado en bacterias no fototróficas. Otra posibilidad, por la que las células de *B. japonicum* podrían reducir el nitrito a amonio, es mediante una sulfito reductasa asimilatoria, puesto que se ha demostrado que esta enzima es capaz de reducir el nitrito a amonio (Flores *et al.*, 2005; Siegel *et al.*, 1982). Las sulfito reductasas asimilatorias están constituidas por 8 subunidades de flavoproteína, codificadas por el gen *cysJ*, y 4 subunidades de hemoproteína, codificadas por el gen *cysI* (Otrowski *et al.*, 1989; Siegel y Davis, 1974). La búsqueda de otras posibles nitrito reductasas en el genoma de *B. japonicum* (<http://genome.kazusa.or.jp/rhizobase/>), reveló la presencia de un gen *nirA*, que codifica una proteína que podría tratarse de una Fd-Nir, y también de los genes *cysJ* y *cysI*. El papel de estos genes en la reducción de nitrito en *B. japonicum* se está investigado actualmente.

Tal y como se observó para la actividad Nir, la actividad NO reductasa (Nor) dependiente de MV en células de la cepa mutante *nirB* incubada aeróbicamente fue mayor que la observada en células de la cepa parental. Esto sugiere que en *B. japonicum* existen otras rutas de reducción de nitrito a NO, las cuales se inducen cuando NirB está ausente. Sin embargo, en células de la cepa parental crecidas anaeróbicamente, la enzima NO reductasa de tipo c, fue responsable del 75% de la actividad Nor observada, y NirB contribuyó con aproximadamente un 33% de dicha actividad.

Una vez establecido el papel de NirB en la asimilación de nitrato en células de *B. japonicum*, el siguiente objetivo fue estudiar el papel de NirB en la reducción de nitrito en nódulos de soja. Además, es posible que NirB también sea capaz de reducir NO, puesto que se ha observado que otras nitrito reductasas asimilatorias reducen NO a amonio (Costa *et al.*, 1990; Poock *et al.*, 2002). Por tanto, también se estudió la participación de NirB como un posible mecanismo de destoxificación de NO. Mediante RT-PCR se detectaron transcritos de *nirB* en nódulos de soja. Una búsqueda BLAST en el genoma de *B. japonicum* (<http://genome.kazusa.or.jp/rhizobase/>) con la secuencia del gen de la flavohemoglobina de *Escherichia coli* permitió identificar una posible flavohemoglobina en *B. japonicum* (*hmpA*). Sin embargo, bajo las condiciones experimentales utilizadas, no se detectaron transcritos correspondientes a *hmpA* en nódulos de soja, lo que sugiere que esta enzima no tiene un papel importante en la destoxificación de NO en nódulos en tales condiciones.

Puesto que los nódulos producidos por la mutante *nirB* acumularon más nitrito, NO y complejos LbNO que los nódulos de la cepa parental, se propone un papel de NirB en la destoxificación de nitrito y NO, e indirectamente, en la formación de LbNO en nódulos de soja. Tal y como propusieron previamente Meakin y colaboradores (2007), nuestros resultados sugieren que NirK no participa en la acumulación de nitrito y LbNO en nódulos de soja procedentes de plantas crecidas en condiciones normales. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que NirK sí está implicada en la formación de LbNO en nódulos de soja procedentes de plantas sometidas a encharcamiento, en los que la desnitrificación está inducida (Sánchez *et al.*, consultar el Capítulo 1). Puesto que los nódulos formados por la mutante *nirB* acumularon nitrito, es posible que el NO acumulado en dichos nódulos procediera del nitrito. En células vegetales, se puede producir NO a partir de nitrito por procesos no enzimáticos (Bethke *et al.*, 2004), o por procesos enzimáticos, catalizados por la nitrato reductasa, que puede reducir nitrito a NO, al igual que nitrato a nitrito (Meyer *et al.*, 2005; Yamasaki *et al.*, 1999 Yamasaki & Sakihama, 2000). La enzima nitrito:NO reductasa de membrana, específica de raíz, también podría ser la responsable de la reducción de nitrito a NO (Stöhr *et al.*, 2001). Otra fuente de NO en nódulos puede ser una enzima tipo NO sintasa (NOS), puesto que se ha detectado actividad tipo NOS en nódulos de *L. albus* (Cueto *et al.*, 1996). En relación con este dato, se ha sugerido que una actividad tipo

NOS participa en la producción de NO en nódulos de *M. truncatula* (Baudouin *et al.*, 2006).

Aunque, según los resultados obtenidos en este trabajo, parece que NirB participa en la destoxificación de NO en nódulos, las actividades Nir y Nor observadas en bacteroides de la cepa *nirB* fue similar a la de los bacteroides de la cepa parental. Esta observación sugiere que, tal y como se ha sugerido para condiciones de vida libre, en los bacteroides de *B. japonicum* deben existir otras rutas por las que el nitrito se reduce a NO.

Tanto el nitrito como el NO son inhibidores de la actividad nitrogenasa (Sasakura *et al.*, 2006; Shimoda *et al.*, 2009; Trinchant y Rigaud, 1982). En el Capítulo 1 de esta Tesis Doctoral, se ha propuesto que en nódulos de soja es la Lb, y no las enzimas NirK o Nor del bacteroide, el principal sistema implicado en la destoxificación de nitrito y NO, producidos por la desnitrificación en respuesta a encharcamiento. Por tanto, queda pendiente estudiar si NirB está implicada en la protección de la enzima nitrogenasa frente al nitrito y al NO.

CONCLUSIONES

1. El encharcamiento induce la formación de NO y de complejos nitrosil-leghemoglobina (LbNO) en nódulos de soja. Tanto el nitrito, producido por la enzima nitrato reductasa periplásmica (Nap), como el NO, producido por la enzima nitrito reductasa (NirK) de *Bradyrhizobium japonicum*, son los principales responsables de la formación de complejos LbNO en nódulos de soja en respuesta a condiciones de encharcamiento.
3. El NO producido en los nódulos de soja por la enzima NirK de *B. japonicum*, en respuesta a encharcamiento, disminuye la expresión de los genes estructurales de la nitrogenasa, *nifH* y *nifD*.
4. Además de transportar oxígeno a los simbiosomas, en este trabajo se propone una función adicional para la Lb como mecanismo de detoxificación de nitrito y óxido nítrico en nódulos de soja.
5. Se ha demostrado la implicación fisiológica del efecto negativo del NO en la expresión de la nitrogenasa, dado que la fijación de dinitrógeno de plantas de soja inoculadas con la mutante *nirK* de *B. japonicum*, que no produce NO, es más tolerante al encharcamiento que la de plantas inoculadas con la mutante *norC*, que acumula NO.
6. El gen *nirB* de *B. japonicum*, responsable de la síntesis de una nitrito reductasa asimilatoria, está implicado en la asimilación de nitrato en células cultivadas en vida libre. Además, se propone la posible implicación de NirB en la detoxificación de nitrito y NO en nódulos de soja.

BIBLIOGRAFÍA DE LA INTRODUCCIÓN
Y DISCUSIÓN GENERALES

- Anthamatten, D., Sherb, B., y Hennecke, H. 1992. Characterization of a *fixLJ*-regulated *Bradyrhizobium japonicum* gene sharing similarity with the *Escherichia coli fnr* and *Rhizobium meliloti fixK* genes. J. Bacteriol. 174: 2111-2120.
- Appleby, C. A. 1984. Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 35: 443-478.
- Arigoni, F., Kaminski, P.A., Hennecke, H., y Elmerich, C. 1991. Nucleotide sequence of the *fixABC* region of *Azorhizobium caulinodans* ORS571: similarity of the *fixB* product with eukaryotic flavoproteins, characterization of *fixX*, and identification of *nifW*. Mol. Gen. Genet. 225: 514-520.
- Atkins, C.A., Smith, P., Mann, A., y Thumfort, P. 2001. Localization of carbonic anhydrase in legume nodules. Plant Cell Environ. 24: 317-326.
- Bacanamwo, M. y Purcell, L.C. 1999. Soybean dry matter and N accumulation responses to flooding stress, N sources and hypoxia. J. Exp. Bot. 50: 689-696.
- Bailey-Serres, J. y Voesenek, L.A.C.J. 2008. Flooding Stress: Acclimations and Genetic Diversity. Annu. Rev. Plant Biol. 59: 313-39.
- Baek, S.-H., Hartsock, A., y Shapleigh, J.P. 2008. *Agrobacterium tumefaciens* C58 Uses ActR and FnrN To Control *nirK* and *nor* Expression. J. Bacteriol. 190: 78-86.
- Barnett, M.J., Fisher, R.F., Jones, T., Komp, C., Abola, A.P., Barloy-Hubler, F., Bowser, L., Capela, D., Galibert, F., Gouzy, J., Gurjal, M., Hong, A., Guisar, L., Hyman, R.W., Kahn, D., Kahn, M.L., Kalman, S., Keating, D.H., Palm, C., Peck, M.C., Surzycki, R., Wells, D.H., Yeh, K.C., Davis, R.W., Federspiel, N.A., y Long S.R. 2001. Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98: 9883-9888.
- Barroso, J.B., Corpas, F.J., Carreras, A., Sandalio, L.M., Valderrama, R., Palma, J. M., Lupiáñez, J.A., y del Río, L.A. 1999. Localization of nitric-oxide synthase in plant peroxisomes. J. Biol. Chem. 274: 36729-36733.
- Batut, J., Daveran-Mingot, M.L, David, M., Jacobs, J.; Garnerone, A.M. y Kahn, D. 1989. *fixK*, a gene homologous with *fnr* and *crp* from *Escherichia coli*, regulates nitrogen fixation genes both positively and negatively in *Rhizobium meliloti*. EMBO J. 8: 1279-1289.

- Baudouin, E., Pleuchot, L., Engler, G., Pauly, N., y Puppo, A. 2006. Nitric oxide is formed in *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* functional nodules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19: 970-975.
- Bauer, E., Kaspar, T., Fischer, H.-M., y Hennecke, H. 1998. Expression of the *fixR-nifA* operon in *Bradyrhizobium japonicum* depends on a new responseregulator, RegR. *J. Bacteriol.* 180: 3853-3863.
- Becana, M. y Klucas, R.V. 1992. Oxidation and Reduction of Leghemoglobin in Root Nodules of Leguminous Plants. *Plant Physiol.* 98: 1217-1221.
- Becana, M., Moran, J.F., y Iturbe-Ormaetxe, I. 1995. Structure and function of leghemoglobins. *An. Estac. Exp. Aula Dei (Zaragoza).* 21: 203-208.
- Bedmar, E.J., Robles, E.F., y Delgado, M.J. 2005. The complete denitrification pathway of the symbiotic, nitrogen-fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochem. Soc. Trans.* 33: 141-144.
- Bedzyk, L., Wang, T., y Ye, R.W. 1999. The periplasmic nitrate reductase in *Pseudomonas* sp. strain G-179 catalyzes the first step of denitrification. *J. Bacteriol.* 181: 2802-2806.
- Beligni, M.V. y Lamattina, L. 1999. Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues. *Planta.* 208: 337-344.
- Besson-Bard, A., Pugin, A., y Wendehenne, D. 2008. New Insights into Nitric Oxide Signaling in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 21-39.
- Bethke, P.C., Badger, M.R., y Jones, R.L. 2004a. Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell.* 16: 332-341.
- Bethke, P.C., Gubler, F., Jacobsen, J.V., y Jones, R.L. 2004b. Dormancy of *Arabidopsis* seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. *Planta.* 219: 847-855.
- Bogdan, C. 2001. Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol.* 11: 66-75.
- Boistard, P., Batut, J., David, M., Fourment, J., Garnerone, A.M., Kahn, D., de Philip, P., Reytrat, J.M., y Waelkens, F. 1991 Regulation of nitrogen fixation genes in *Rhizobium meliloti*. *En Advances in modular genetics of plant-microbe interactions.* Hennecke, H. Y Verma, D.P.S. (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 195-202

- Bonilla, I., Mergold-Villaseñor, C., Campos, M.E., Sánchez, N., Pérez, H., *et al.* 1997. The aberrant cell walls of boron-deficient bean root nodules have no covalently bound hydroxyproline/proline-rich proteins. *Plant physiol.* 115: 1329-1340.
- Botrel, A. y Kaiser, W. M. 1997. Nitrate reductase activation state in barley roots in relation to the energy and carbohydrate status. *Planta* 201: 496-501.
- Bright, J., Desikan, R., Hancock, J.T., Weir, I.S., y Neill, S.J. 2006. ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. *Plant J.* 45: 113-122.
- Bueno, E., Gómez-Hernández, N., Girard, L., Bedmar, E.J., y Delgado, M.J. 2005. Function of the *Rhizobium etli* CFN42 *nirK* gene in nitrite metabolism. *Biochem. Soc. Trans.* 35: 166-167.
- Bueno, E., Bedmar, E.J., Richardson, D.J., y Delgado, M.J. 2008. Role of *Bradyrhizobium japonicum* cytochrome *c*₅₅₀ in nitrite and nitrate respiration. *FEMS Microbiol. Lett.* 279: 188-194.
- Bueno, E., Mesa, S., Sánchez, C., Bedmar, E.J., y Delgado, M.J. NifA protein is required for maximal expression of denitrification genes in *Bradyrhizobium japonicum*. *Environ. Microbiol.* (*in press*).
- Buttery, B.R. 1987. Some effects of waterlogging and supply of combined nitrogen on soybean growth. *Can. J. Plant Sci.* 67: 69-77.
- Campbell, W.H. y Kinghorn, J.R. 1990. Functional domains of assimilatory nitrate and nitrite reductases. *Trends Biochem. Sci.* 15: 315-319.
- Carpena, R., Esteban, E., Lucena, J.J., Peñalosa, J., Vázquez, S., Zorzona, P., y Gárate, A. 2006. Simbiosis y fitorrecuperación de suelos. *En Fijación biológica de nitrógeno: fundamentos y aplicaciones.* Bedmar, E.J., González, J., Lluch, C., y Rodelas, B. (eds.). Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN), pp. 255-268.
- Casella, S., Shapleigh, J.P., Toffanin, A., y Basaglia, M. 2006. Investigation into the role of the truncated denitrification chain in *Rhizobium sullae* strain HCNT1. *Biochem. Soc. Trans.* 34: 130-132.
- Casella, S., Shapleigh, J.P., y Payne, W.J. 1986. Nitrite reduction in *Rhizobium "hedysari"* strain HCTN1. *Arch. Microbiol.* 146: 233-238.

- Cebron A. y Garnier J. 2005. *Nitrobacter* and *Nitrospira* genera as representatives of nitrite-oxidizing bacteria: detection, quantification and growth along the lower Seine River (France). *Water Res.* 39: 4979-4992.
- Chauhan, S., y O'Brian, M.R. 1993. *Bradyrhizobium japonicum* δ -aminolevulinic acid dehydratase is essential for symbiosis with soybean and contains a novel metal-binding domain. *J. Bacteriol.* 175: 7222-7227.
- Comolli, J.C., y Donohue, T.J. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* RoxR, a response regulator related to *Rhodobacter sphaeroides* PrrA, activates expression of the cyanide-insensitive terminal oxidase. *Mol. Microbiol.* 45: 755-768.
- Corpas, F.J., Barroso, J.B., Carreras, A., *et al.* 2004. Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiol.* 136: 2722-2733.
- Correa-Aragunde, N., Graziano, M., y Lamattina, L. 2004. Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta.* 218: 900-905.
- Costa, C., Macedo, A., Moura, I., Moura, J.J.G., Le Gall, J., Berlier, Y., Liu, M.-Y., y Payne, W.J. 1990. Regulation of the hexaheme nitrite/nitric oxide reductase of *Desulfovibrio desulfuricans*, *Wolinella succinogenes* and *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 276: 67-70.
- Crawford, N.M. y Guo, F.-Q. 2005. New insights into nitric oxide metabolism and regulatory functions. *Trends Plant Sci.* 10: 195-200.
- Cruz-Ramos, H., Crack, J., Wu, G., Hughes, M.N., Scott, C., Thomson, A.J., Green, J., y Poole, R.K. 2002. NO sensing by FNR: regulation of the *Escherichia coli* NO-detoxifying flavohaemoglobin, Hmp. *The EMBO J.* 21: 3235-3244
- Cueto, M., Hernández-Perera, O., Martín, R., Bentura, M.L., Rodigo, J., Lamas, S., y Golvano, M.P. 1996. Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. *FEBS Lett.* 398: 159-164.
- Davies, M.J., Mathieu, C., y Puppo, A. 1999. Leghemoglobin: properties and reactions *Adv. Inorg. Chem.* 46: 495-542.
- de Felipe, M.R. 2006. Fijación biológica de dinitrógeno en vida libre. *En Fijación biológica de nitrógeno: fundamentos y aplicaciones.* Bedmar, E.J., González, J., Lluch, C., y Rodelas, B. (eds.). Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN), pp. 9-16.

- de Vries, S., Pouvreau S., y Pouvreau L.A.M. 2007. Nitric oxide reductase: structural variations and catalytic mechanism. *En Biology of the nitrogen cycle*. Bothe, H., Ferguson, S.J., y Newton, W.E. (eds). Elsevier, pp. 57-66.
- Dean, J.V. y Harper, J.E. 1986. Nitric oxide and nitrous oxide production by soybean and winged bean during the *in vivo* nitrate reductase assay. *Plant Physiol.* 82: 718-723.
- Dean, J.V. y Harper, J.E. 1988. The conversion of nitrite to nitrogen oxide(s) by the constitutive NAD(P)H-nitrate reductase enzyme from soybean. *Plant Physiol.* 88: 389-395.
- Delgado, M.J., Bonnard, N., Tresierra-Ayala, A., Bedmar, E.J., y Müller, P. 2003. The *Bradyrhizobium japonicum napEDABC* genes encoding the periplasmic nitrate reductase are essential for nitrate respiration. *Microbiology.* 149: 3395-3403.
- Delgado, M.J., y Bedmar, E.J. 2006. Metabolismo anaerobio del nitrato en bacterias simbióticas: respiración y desnitrificación. Bedmar, E.J., González, J., Lluch, C., y Rodelas, B. (eds.). Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN), pp. 92-101.
- Delgado, M.J., Casella, S., y Bedmar, E.J. 2007. Denitrification in Rhizobia-Legume Symbiosis. *En Biology of the Nitrogen Cycle*. Bothe, H., Ferguson, S.J., y Newton, W.E. (eds). Elsevier, pp. 83-92.
- Delledonne, M., Xia, V., Dixon, R. A., y Lamb, C. 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature.* 394: 585-588.
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A., y Lamb, C. 2001. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 13454-13459.
- Delledonne, M. 2005. NO news is good news for plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 390-396.
- Desikan, R., Griffiths, R., Hancock, J., y Neill, S. 2002. A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 16314-16318.
- Díaz, M., Achkor, H., Titarenko, E., y Martínez, M.C. 2003. The gene encoding glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase/GSNO reductase is

- responsive to wounding, jasmonic acid and salicylic acid. FEBS Letters 543: 136-139.
- DiSpirito, A.A., Taaffe, L.R., Lipscomb, J.D., y Hooper, A.B. 1985. A 'blue' copper oxidase from *Nitrosomonas europaea*. Biochim. Biophys. Acta. 827: 320-326.
- Dixon, R. y Kahn, D. 2004. Genetic regulation of the biological nitrogen fixation. Nat. Rev. Microbiol. 2: 621-631.
- Dordas, C., Rivoal, J., y Hill, R.D. 2003a. Plant haemoglobins, nitric oxide and hypoxic stress. Ann. Bot. 91: 173-178.
- Dordas, C., Hasinoff, B.B., Igamberdiev, A.U., Manach, N., Rivoal, J., y Hill, R.D. 2003b. Expression of a stress-induced hemoglobin affects NO levels produced by alfalfa root cultures under hypoxic stress. Plant J. 35: 763-770.
- Dordas, C., Hasinoff, B.B., Rivoal, J., y Hill, R.D. 2004. Class-1 hemoglobins, nitrate and NO levels in anoxic maize cell-suspension cultures. Planta. 219: 66-72.
- Dordas, C. 2009. Nonsymbiotic haemoglobins and stress tolerance in plants. Plant Sci. 176: 433-440.
- Downie, J.A. 2005. Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. Curr. Biol. 15: 196-198.
- Dunham, C.M., Dioum, E.M., Tuckerman, J.R., Gonzalez, G., Scott, W.G., y Gilles-González, M.A. 2003. A distal arginine in oxygen-sensing heme-PAS domains is essential to ligand binding, signal transduction, and structure. Biochemistry. 42: 7701-7708.
- Durmowicz, M.C. y Maier, R.J. 1998. The *fixK₂* gene is involved in regulation of symbiotic hydrogenase expression in *Bradyrhizobium japonicum*. J. Bacteriol. 180: 3253-3256.
- Durner, J., Wendehenne, D., y Klessig, D.F. 1998. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP and cyclic ADP-ribose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 10328-10333.
- Dusha, I., Kovalenko, S., Banfalvi, Z., y Kondorosi, A. 1987. *Rhizobium meliloti* insertion element ISRm2 and its use for identification of the *fixX* gene. J. Bacteriol. 169: 1403-1409.
- Eady, R.R. 1996. Structure–function relationships of alternative nitrogenases. Chem. Rev. 96: 3013-3030.

- Earl, C.D., Ronson, C.W., y Ausubel, F.M. 1987. Genetic and structural analysis of the *Rhizobium meliloti* *fixA*, *fixB*, *fixC*, and *fixX* genes. *J. Bacteriol.* 169: 1127-1136.
- Ebeling, S., Hahn, M., Fischer, H.-M., y Hennecke, H. 1987. Identification of *nifE*-, *nifN*- and *nifS*-like genes in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Gen. Genet.* 207: 503-508.
- Ebeling, S., Noti, J.D., y Hennecke, H. 1988. Identification of a new *Bradyrhizobium japonicum* gene (*fixA*) encoding a ferredoxin-like protein. *J. Bacteriol.* 170: 1999-2001.
- Emmerich, R., Hennecke, H., y Fischer, H.-M. 2000. Evidence for a functional similarity between the two-component regulatory systems RegSR, ActSR, and RegBA (PrrBA) in α -Proteobacteria. *Arch. Microbiol.* 174: 307-313.
- Evans, H.J. 1954. Diphosphopyridine Nucleotide-Nitrate Reductase from Soybean Nodules. *Plant Physiol.* 29: 298-301.
- Feechan, A., Kwon, E., Yun, B.W., Wang, Y., Pallas, J.A., y Loake, G.J. 2005. A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102: 8054-8059.
- Ferguson, B.J. y Mathesius, U. 2003. Signaling interactions during nodule development. *J. Plant Growth Regul.* 22: 47-72.
- Ferrarini, A., De Stefano, M., Baudouin, E., Pucciariello, C., Polverari, A., Puppo, A., y Delledonne, M. 2008. Expression of *Medicago truncatula* genes responsive to nitric oxide in pathogenic and symbiotic conditions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21: 781-790.
- Fischer, H.-M. 1994. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol. Rev.* 58: 352-386.
- Fischer, H.-M., Velasco, L., Delgado, M.J., Bedmar, E.J., Schären, S., Zingg, D., Göttfert, M., y Hennecke, H. 2001. One of two *hemN* genes in *Bradyrhizobium japonicum* is functional during anaerobic growth and in symbiosis. *J. Bacteriol.* 183: 1300-1311.
- Flores, E., Frías, J.E., Rubio, L.M., y Herrero, A. 2005. Photosynthetic nitrate assimilation in cyanobacteria. *Photosyn. Res.* 83: 117-133.

- Frustaci, J.M. y O'Brian, M.R. 1992. Characterization of a *Bradyrhizobium japonicum* ferrochelataze mutant and isolation of the *hemH* gene. J. Bacteriol. 174: 4223-4229.
- Fuhrmann, M., Fischer, H.-M., y Hennecke, H. 1985. Mapping of *Rhizobium japonicum nifB*-, *fixBC*-, and *fixA*-like genes and identification of the *fixA* promoter. Mol. Gen. Genet. 199: 315-322.
- Gabaldón, C., Gómez-Ros, L.V., Pedreno, M.A., y Ros-Barceló, A. 2005. Nitric oxide production by the differentiating xylem of *Zinnia elegans*. New Phytol. 165: 121-130.
- Galibert, F., Finan, T.M., Long, S.R., y Puhler, A. 2001. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. Science. 293: 668-672.
- Gálvez, S., Hirsch, A.M., Wycoff, K.L., hunt, S., Laycell, D.B., *et al.* 2000. Oxygen regulation of a nodule-located carbonic anhydrase in alfalfa. Plant physiol. 124: 1059-1068.
- García-Mata, C. y Lamattina, L. 2001. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive cell responses against drought stress. Plant Physiol. 126: 1196-1204.
- García-Mata, C., Gay, R., Sokolovski, S., Hills, A., Lamattina, L., y Blatt, M.R. 2003. Nitric oxide regulated K⁺ and Cl⁻ channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100: 11116-11121.
- Gardner, A.M., Helmick, R.A., y Gardner, P.R. 2002. Flavorubredoxin, an inducible catalyst for nitric oxide reduction and detoxification in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 277: 8172-8177.
- Gardner, P.R., Gardner, A.M., Martin, L.A., y Salzman, A.L. 1998. Nitric oxide dioxygenase: an enzymatic function for flavohemoglobin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 10378-10383.
- Gardner, P.R. 2005. Nitric oxide dioxygenase function and mechanism of flavohemoglobin, hemoglobin, myoglobin and their associated reductases. J. Inorg. Biochem. 99: 247-266.
- Ghiglione, J.F., Gourbiere, F., Potier, P., Philippot, L., y Lensi, R. 2000. Role of respiratory nitrate reductase in ability of *Pseudomonas fluorescens* YT101 to colonize the rhizosphere of maize. App. Environ. Microbiol. 66: 4012-4016.

- Ghiglione, J.F., Richaume, A.P., Philippot, L., y Lensi, R. 2002. Relative involvement of nitrate and nitrite reduction in the competitiveness of *Pseudomonas fluorescens* YT101 to colonize the rhizosphere of maize under non-limiting nitrate conditions. *FEMS Microbiol. Ecol.* 39: 121-127.
- Gilles-González, M.A. y González, G. 1993. Regulation of the kinase activity of heme protein FixL from the two-component system FixL/FixJ of *Rhizobium meliloti*. *J. Biol Chem.* 268: 16293-16297.
- Gilles-González, M.A., González, G., y Perutz, M.F. 1994. Heme-based sensors, exemplified by the kinase FixL, are a new class of heme protein with distinctive ligand binding and autoxidation. *Biochemistry.* 33: 8067-8073.
- Gilles-González, M.A. y González, G. 2005. Heme-based sensors: defining characteristics, recent developments, and regulatory hypotheses. *J. Inorg. Biochem.* 99: 1-22.
- Gong, W., Gong, B., Hao, S.S., Mansy, G., González, G., Gilles-González, M.A., y Chan, M.K. 1998. Structure of a biological oxygen sensor: a new mechanism for heme-driven signal transduction. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 95: 15177-15182.
- Gong, W., Hao, B., y Chan, M.K. 2000. New mechanistic insights from structural studies of oxygen-sensing domain of *Bradyrhizobium japonicum* FixL, *Biochemistry* 39: 3955–3962.
- González, P.J., Correia, C., Moura, I., Brondino, C.D., y Moura, J.J. 2006. Bacterial nitrate reductases: Molecular and biological aspects of nitrate reduction. *J. Inorg. Biochem.* 100: 1015-1023.
- Gould, K.S., Klinguer, A., Pugin, A., y Wendehenne, D. 2003. Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response? *Plant Cell Environ.* 26: 1851-1862.
- Gouvêa, C.M.C.P., Souza, J.F., Magalhães, C.A.N., y Martins, I.S. 1997. NO-releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Regulation.* 21: 183-187.
- Grönger, P., Manian, S.S., Reiländer, H., O'Connell, M., Priefer, U.B., y Pühler, A. 1987. Organization and partial sequence of a DNA region of the *Rhizobium leguminosarum* symbiotic plasmid pRL6JI containing the genes *fixABC*, *nifA*, *nifB* and a novel open reading frame. *Nucl. Acids Res.* 15: 31-49.

- Grün, S., Lindermayr, C., Sell, S., y Durner, J. 2006. Nitric oxide and gene regulation in plants. *J. Exp. Bot.* 57: 507-516.
- Gubler, M. y Hennecke, H. 1986. *fixA*, *fixB* and *fixC* genes are essential for symbiotic and free-living microaerobic nitrogen fixation. *FEBS Lett.* 200: 186-192.
- Guerinot, M.L. y Chelm, B.K. 1986. Bacterial δ -aminolevulinic acid synthase is not essential for leghemoglobin formation in the soybean-*Bradyrhizobium japonicum* symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 1837-1841.
- Guo, F.-Q., Okamoto, M., y Crawford, N.M. 2003. Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signalling. *Science.* 302: 100-103.
- Guo, F.-Q. y Crawford, N.M. 2005. *Arabidopsis* nitric oxide synthase 1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence. *Plant Cell.* 17: 3436-3450.
- Gupta, K.J., Stoimenova, M., y Kaiser, W.M. 2005. In higher plants, only root mitochondria, but not leaf mitochondria reduce nitrite to NO, *in vitro* and *in situ*. *J. Exp. Bot.* 56: 2601-2609.
- Hadri, A.-E., Spaink, H.P., Bisseling, T., y Brewin, J. 1998. Diversity of root nodulation and rhizobial infection processes. *En The Rhizobiaceae: molecular biology of model plant-associated bacteria.* Spaink, H.P., Kondorosi, A., y Hooykaas, P.J.J. (eds.). Kluwer Academic Publishers, pp. 347-360.
- Hanafy, K.A., Krumenacker, J.S., y Murad, F. 2001. NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med. Sci. Monit.* 7: 801-19.
- Hauser, F., Pessi, G., Friberg, M., Weber, C., Rusca, N., Lindemann, A., Fischer, H.-M., y Hennecke, H. 2007. Dissection of the *Bradyrhizobium japonicum* NifA+ σ^{54} regulon, and identification of a ferredoxin gene (*fdxN*) for symbiotic nitrogen fixation. *Mol. Genet. Genomics.* 278: 255-271.
- Hausladen, A., Gow, A., y Stamler, J.S. 1998. Nitrosative stress: metabolic pathway involving the flavohemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 14100-14105.
- He, Y., Tang, R.H., Hao, Y., Stevens, R.D., Cook, C.W., Ahn, S.M., Jing, L., Yang, Z., Chen, L., Guo, F., Fiorani, F., Jackson, R.B., Crawford, N.M., y Pei, Z.M. 2004. Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science.* 305: 1968-1971.

- Hendriks, J., Oubrie, A., Castresana, J., Urbani, A., Gemeinhardt, S., y Saraste, M. 2000. Nitric oxide reductases in bacteria. *Biochem. Biophys. Acta* 1459: 266-273.
- Hennecke, H. 1990. Nitrogen fixation genes involved in the *Bradyrhizobium japonicum*-soybean symbiosis. *FEBS Lett.* 268: 422-426.
- Herold, S. y Puppo, A. 2005a. Oxyleghemoglobin scavenges nitrogen monoxide and peroxyxynitrite: a possible role in functioning nodules? *J. Biol. Inorg. Chem.* 10: 935-945.
- Herold, S. y Puppo, A. 2005b. Kinetics and mechanistic studies of the reactions of metleghemoglobin, ferrylleghemoglobin, and nitrosylleghemoglobin with reactive nitrogen species. *J. Biol. Inorg. Chem.* 10: 946-957.
- Hérouart, D., Baudouin, E., Frendo, P., Harrison, J., Santos, R., Jamet, A., Van de Syne, G., Touati, D., y Puppo, A. 2002. Reactive oxygen species, nitric oxide and glutathione: a key role in the establishment of the legume-*Rhizobium* symbiosis? *Plant Physiol. Biochem.* 40: 619-624.
- Hess, D.T., Matsumoto, A., Kim, S.O., Marshall, H.E., y Stamler, J.S. 2005. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 150-166.
- Holloway, P., McCormick, W., Watson, R.J., y Chan Y.K. 1996. Identification and analysis of the dissimilatory nitrous oxide reduction genes, *nosRZDFY*, of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 178: 1505-1514.
- Hong, J.K., Yun, B.-W., Kang, J.G., Raja, M.U., Kwon, E., Sorhagen, K., Chu, C., Wang, Y., y Loake, G.J. 2008. Nitric oxide function and signalling in plant disease resistance. *J. Exp. Bot.* 59: 147-154.
- Hu, X., Neill, S.J., Tang, Z., y Cai, W. 2005. Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. *Plant Physiol.* 137: 663-670.
- Hunt, S. y Layzell, D.B. 1993. Gas exchange of legume nodules and the regulation of nitrogenase activity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 483-511.
- Hynes, M. F., Quandt, J., Schlüter, A. Paschkowski, T., Weidner, S., y Priefer, U.B. 1992. Abstr. Book Ninth Int. Congr. Nitrogen Fixation, abstr. 464.
- Iannetta, P.P.M., James, E.K., McHardy, P.D., Sprent, J.I., y Minchin, F.R. 1993. An ELISA procedure for quantification of relative amounts of intercellular glycoprotein in legume nodules. *Ann. Bot.* 71: 85-90

- Iannetta, P.P.M., James, E.K., Sprent, J.I., y Minchin, F.R. 1995. Time course of changes involved in the operation of the oxygen diffusion barrier in white lupin nodules. *J. Exp. Bot.* 46: 565-575.
- Igamberdiev, A., Stoimenova, M., Seregelyes, C., y Hill, R.D. 2006. Class-1 hemoglobin and antioxidant metabolism in alfalfa roots. *Planta.* 223: 1041-1046.
- Igamberdiev, A.U. y Hill, R.D. 2004. Nitrate, NO and haemoglobin in plant adaptation to hypoxia: an alternative to classic fermentation pathways. *J. Exp. Bot.* 55: 2473-2482.
- Igamberdiev, A.U., Baron, K., Manac'h-Little, N., Stoimenova, M., y Hill, R.D. 2005. The haemoglobin/nitric oxide cycle: Involvement in flooding stress and effects on hormone signalling. *Ann. Bot.* 96: 557-564.
- Ignarro, L.J. 1990. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric-oxide. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30: 535-560.
- Ignarro, L.J., Ryms, R.E., Buga, G.M., y Word, K.S. 1987. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ. Res.* 61: 866-879.
- Imperial, J., Palacios, J.M., Brito, B., Rey, L., Cabrera, E., Ureta, A.C., y Ruiz Argüeso, T. 2006. El sistema hidrogenasa de las bacterias que nodulan leguminosas. *En Fijación biológica de nitrógeno: fundamentos y aplicaciones.* Bedmar, E.J., González, J., Lluch, C., y Rodelas, B. (eds.). Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN), pp. 35-44.
- Innocenti, G., Pucciarello, C., Le Gleuher, M., Hopkins, J., de Stefano, M., Delledone, M., Puppo, Baudouin, E., y Frendo, P. 2007. Glutathione synthesis is regulated by nitric oxide in *Medicago truncatula* roots. *Planta.* 225: 1597-1602.
- James, E.K., Sprent, J.I., Minchin, F.R., y Brewin, N.J. 1991. Intercellular location of glycoprotein in soybean nodules. Effect of altered rhizosphere oxygen concentration. *Plant Cell Environ.* 14: 467-476.
- James, E.K., Iannetta, P.P.M., Naisbitt, T., Goi, S.R., Sutherland, J.M., Sprent, J.I., *et al.* 1994. A survey of N₂-Fixing nodules in the leguminosae with particular reference to intercellular glycoproteins and the control of oxygen diffusion. *Proc. Roy. Soc. Edin. (B).* 102: 429-432.

- Jensen, E.O., Paludan, K., Hyldig-Nielsen, J.J., Jørgensen, P., y Marcker, K.A. 1981. The structure of a chromosomal leghaemoglobin gene from soybean. *Nature*. 291: 677-679.
- Kaminski, P.A., Batut, J., y Boistard, P. 1998. A survey of symbiotic nitrogen fixation by rhizobia. 1998. *En The Rhizobiaceae: molecular biology of model plant-associated bacteria*. Spaink, H.P., Kondorosi, A., y Hooykaas, P.J.J. (eds.). Kluwer Academic Publishers, pp. 431-460.
- Kanayama, Y., Kimura, K., Nakamura, Y., y Ike, T. 1999. Purification and characterization of nitrate reductase from nodule cytosol of soybean plants. *Physiol. Plant*. 105: 396-401.
- Kanayama, Y., Watanabe, I., y Yamamoto, Y. 1990. Inhibition of nitrogen fixation in soybean plants supplied with nitrate I. Nitrite accumulation and formation of nitrosylhemoglobin in nodules. *Plant Cell Physiol*. 31: 341-346.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Minamisawa, K., Uchiumi, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Iriguchi, M., Kawashima, K., Kohara, M., Matsumoto, M., Shimpo, S., Tsuruoka, H., Wada, T., Yamada, M., y Tabata, S. 2002. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res*. 9: 189-197.
- Kennedy, J.R., Rigaud, J., y Trinchant, J.R. 1975. Nitrate reductase from bacteroids of *Rhizobium japonicum*: enzyme assay and characteristics and possible interaction with nitrogen fixation. *Biochim. Biophys. Acta*. 397: 24-35.
- Keppler, L. 1979. Nitric oxide (NO) and nitrogen oxide (NO₂) emissions from herbicide-treated soybeans plants. *Atmos. Environ*. 13: 537-542.
- Kim, S. y Burgess, B.K. 1996. Evidence for the direct interaction of the *nifW* gene product with the MoFe protein. *J. Biol. Chem*. 271: 9764-9770.
- Klessig, D.F., Durner, J., Noad, R., Navarre, D.A., Wendehenne, D., *et al.* 2000. Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97: 8849-8855.
- Klipp, W., Reiländer, H., Schlüter, A., Krey, R., y Pühler, A. 1989. The *Rhizobium meliloti fdxN* gene encoding a ferredoxin-like protein is necessary for nitrogen fixation and is cotranscribed with *nifA* and *nifB*. *Mol. Gen. Genet*. 216: 293-302.

- Kobayashi, M. y Shoun, H. 1995. The copper-containing dissimilatory nitrite reductase involved in the denitrifying system of the fungus *Fusarium oxysporum*. *J. Biol. Chem.* 270: 4146-4151.
- Kojima, H., Urano, Y., Kikuchi, K., Higuchi, T., y Nagano, T. 1999. Fluorescent indicators for imaging nitric oxide production. *Angew. Chem. Int. Ed.* 38: 3209-3212.
- Kopyra, M. y Gwózdź, E.A. 2003. Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. *Plant Physiol. Biochem.* 41: 1011-1017.
- Kubo, H. 1939 Über hämoprotein aus den wurzelknöllchen von leguminosen. *Acta Phytochimica (Tokyo)* 11: 195-200.
- Lama, A., Pawaria, S. y Dikshit, K. L. 2006. Oxygen binding and NO scavenging properties of truncated hemoglobin, HbN, of *Mycobacterium smegmatis*. *FEBS Lett.* 580: 4031-4041.
- Lamattina, L., García-Mata, C., Graziano, M., y Pagnussat, G. 2003. Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 109-136.
- Lamotte, O., Gould, K., Lecourieux, D., Sequeira-Legrand, A., Lebun-García, A., Durner, J., Pugin, A., y Wendehenne, D. 2004. Analysis of nitric oxide signalling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. *Plant Physiol.* 135: 516-529.
- Lamotte, O., Courtois, C., Barnavon, L., Pugin, A., y Wendehenne, D. 2005. Nitric oxide in plants: the biosynthesis and cell signalling properties of a fascinating molecule. *Planta.* 221: 1-4.
- Lamotte, O., Courtois, C., Dobrowolska, G., Besson, A., Pugin, A., y Wendehenne, D. 2006. Mechanisms of nitric-oxide-induced increase of free cytosolic Ca²⁺ concentration in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Free Radic. Biol. Med.* 40: 1369-1376.
- LaRue, T.A. y Child, J.J. 1979. Sensitive fluorometric assay for leghemoglobin. *Ana. Biochem.* 92: 11-15.
- Leshem, Y.Y. y Haramaty, E. 1996. The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn. *Foliage. J. Plant Physiol.* 148: 158-163.

- Lin, J.T. y Stewart, V. 1998. Nitrate assimilation by bacteria. *Adv. Micro. Phys.* 39: 1-30.
- Lindemann A., Moser A., Pessi G., Hauser F., Friberg M., Hennecke H., y Fischer H.-M. 2007. New target genes controlled by the *Bradyrhizobium japonicum* two-component regulatory system RegSR. *J. Bacteriol.* 189: 8928-8943.
- Lindermayr, C., Saalbach, G., y Durner, J. 2005. Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 137: 921-930.
- Luciński, R., Polcyn, W., y Ratajczak, L. 2002. Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association *Rhizobium*-legumes. *Acta Biochimica Polonica.* 49: 537-546.
- Lukat-Rodgers, G.S. y Rodgers, K.R. 1997. Characterization of ferrous FixL-nitric oxide adducts by resonance Raman spectroscopy. *Biochemistry* 36: 4178-4187.
- Mandon, K., Kaminski, P.A., Mougel, C., Desnoues, N., Dreyfus, B., y Elmerich, C. 1993. Role of the *fixGHI* region of *Azorhizobium caulinodans* in free-living and symbiotic nitrogen fixation. *FEMS Microbiol. Lett.* 114: 185-189.
- Mandon, K., Kaminski, P.A., y Elmerich, C. 1994. Functional analysis of the *fixNOQP* region of *Azorhizobium caulinodans*. *J. Bacteriol.* 176: 2560-2568.
- Mason, M.G., Shepherd, M., Nicholls, P., Dobbin, P.S., Dodsworth, K.S., Poole, R.K., y Cooper, C.E. 2009. Cytochrome *bd* confers nitric oxide resistance to *Escherichia coli*. *Nat. Chem. Biol.* 5: 94-96.
- Matamoros, M.A., Dalton, D.A., Ramos, J., Clemente, M.J., Rubio, M.C., y Becana, M. 2003. Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia-legume symbiosis. *Plant Physiol.* 133: 499-509.
- Mathieu, C., Moreau, S., Frendo, P., Puppo, A., y Davies, M.J. 1998. Direct detection of radicals in intact soybean nodules: presence of nitric oxide-leghemoglobin complexes. *Free. Radic. Biol. Med.* 24: 1242-1249.
- Meakin, G.E., Jepson, B., Bedmar, E.J., Richardson, D.J., y Delgado, M.J. 2006. The role of *Bradyrhizobium japonicum* nitric oxide reductase in nitric oxide detoxification in soya bean root nodules. *Biochem. Soc. Trans.* 34: 195-196.
- Meakin, G.E., Bueno, E., Jepson, B., Bedmar, E.J., Richardson, D.J., y Delgado, M.J. 2007. The contribution of bacteroidal nitrate and nitrite reduction to the formation of nitrosylleghaemoglobin complexes in soybean root nodules. *Microbiology.* 153: 411-419.

- Mesa, S., Velasco, L., Manzanera, M.E., Delgado, M.J., y Bedmar, E.J. 2002. Characterization of the *norCBQD* genes, encoding nitric oxide reductase, in the nitrogen fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Microbiology*. 148: 3553-60.
- Mesa, S., Bedmar, E.J., Chanfon, A., Hennecke H., y Fischer H.-M. 2003. *Bradyrhizobium japonicum* NnrR, a denitrification regulator, expands the FixLJ-FixK₂ regulatory cascade. *J. Bacteriol.* 185: 3978-3982.
- Mesa, S., de Dios Alché, J., Bedmar, E.J., y Delgado, M.J. 2004. Expression of the *nir*, *nor* and *nos* denitrification genes from *Bradyrhizobium japonicum* in soybean root nodules. *Physiol. Plant.* 120: 205-211.
- Mesa, S., Ucurum, Z., Hennecke, H., y Fischer, H.-M. 2005. Transcription activation in vitro by the *Bradyrhizobium japonicum* regulatory protein FixK₂. *J. Bacteriol.* 187: 3329-3338.
- Mesa, S., Hauser, F., Friberg, M., Malaguti, E., Fischer, H.-M., y Hennecke, H. 2008. Comprehensive assesment of the regulons controlled by the FixLJ-FixK₂-FixK₁ cascade in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 190: 6568-6579.
- Meyer, C., Lea, U.S., Provan, F., Kaiser, W.M., y Lillo, C. 2005. Is nitrate reductase a major player in the plant NO (nitric oxide) game? *Photosyn. Res.* 83: 181-189.
- Michiels, J. y Vanderleyden, J. 1993. Cloning and sequence of the *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli *fixA* gene. *Biochim. Biophys. Acta.* 1144: 232-233.
- Mills, C.E., Sedelnikova, S., Søballe, B., Hughes, M.N., y Poole, R.K. 2001. *Escherichia coli* flavohaemoglobin (Hmp) with equistoichiometric FAD and haem contents has a low affinity for dioxygen in the absence or presence of nitric oxide. *Biochem. J.* 353: 207-213.
- Mills, P., Rowley, G., Spiro, S., Hinton, J.C.D., y Richardson, D.J. 2008. A combination of cytochrome *c* nitrite reductase (NrfA) and flavorubedoxin (NorV) protects *Salmonella enterica* serovar Thyphimurium against killing by NO in anoxic enviroments. *Microbiology*. 154: 1218-1228.
- Minchin, F.R. y Pate, J.S. 1975. Effects of water, areation and salt regime on nitrogen fixation in a nodulated legume: definition of an optimum root environment. *J. Exp. Bot.* 26: 60-80.

- Minchin, F.R., Thomas, B.J., y Mytton, L.R. 1995. Ion distribution across the cortex of soybean nodules: Possible involvement in control of oxygen diffusion. *Ann. Bot.* 74: 613-617.
- Minchin, F.R. 1997. Regulation of oxygen diffusion in legume nodules. *Soil Biol. Biochem.* 29: 881-888.
- Minchin, F.R., James, E.K. y Becana, M. 2008. Oxygen diffusion, production of reactive oxygen and nitrogen species, and antioxidants in legume nodules. *En Nitrogen-Fixing Leguminous Symbioses*. Dilworth, M.J., James, E.K., Sprent, J.I. y Newton W.E. (eds.). Springer Science, pp. 321-362.
- Moncada, S., Palmer, R.M.J., y Higgs, E.A. 1991. Nitric-oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43: 109-142.
- Monza, J., Irisarri, P., Díaz, P., Delgado, M.J., Mesa, S., y Bedmar, E.J. 2006. Denitrification ability of rhizobial strains isolated from *Lotus* sp. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 89: 479-84.
- Moreno-Vivián, C. y Flores, E. 2007. Nitrate assimilation in bacteria. *En Biology of the nitrogen cycle*. Bothe, H., Ferguson, S.J., y Newton, W.E. (eds). Elsevier, pp. 263-282.
- Morett, E., y Segovia, L. 1993. The σ^{54} bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains. *J. Bacteriol.* 175: 6067-6074.
- Morón, B., Dardanelli, M.S., Sousa, C., y Megías, M. 2006. Diálogo molecular en la simbiosis rizobio-leguminosa. *En Fijación biológica de nitrógeno: fundamentos y aplicaciones*. Bedmar, E.J., González, J., Lluch, C., y Rodelas, B. (eds.). Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN), pp. 160-171.
- Murgia, I., Delledonne, M., y Soave, C. 2002. Nitric oxide mediates iron-induced ferritin accumulation in *Arabidopsis*. *Plant J.* 30: 521-528.
- Murgia, I., Tarantino, D., Vannini, C., Bracale, M., Carravieri, S., y Soave, C. 2004. *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing thylakoidal ascorbate peroxidase show increased resistance to paraquat induced photooxidative stress and to nitric oxide-induced cell death. *Plant J.* 38: 940-953.
- Nagata, M., Murakami, E., Shimoda, Y., Shimoda-Sasakura, F., Kucho, K., Suzuki, A., Abe, M., Higashi, S., y Uchiumi, T. 2008. Expression of a class 1 hemoglobin

- gene and production of nitric oxide in response to symbiotic and pathogenic bacteria in *Lotus japonicus*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21: 1175–1183.
- Neill, S.J., Desikan, R., y Hancock, J.T. 2003. Nitric oxide signalling in plants. *New Phytol.* 159: 11-35.
- Neill, S., Barros, R., Bright, J. Desikan R., Hancock, J. Harrison, J, Morris, P., Ribeiro, D., y Willson, I. 2007. Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *J. Exp. Bot.* 59: 165-176.
- Neill, S., Bright, J. Desikan R., Hancock, J. Harrison, J, y Willson I. 2008. Nitric oxide evolution and perception. *J. Exp. Bot.* 59: 25-35.
- Nellen-Anthamatten, D., Rossi, P., Preisig, O., Kullik, I., Babst, M., Fischer, H.-M. y Hennecke, H. 1998. *Bradyrhizobium japonicum* FixK₂, a crucial distributor in the FixLJ-dependent regulatory cascade for control of genes inducible by low oxygen evels. *J. Bacteriol.* 180: 5251-5255.
- Nienaber, A., Huber, A., Göttfert, M., Hennecke, H., y Fischer, H.-M. 2000. Three new NifA-regulated genes in the *Bradyrhizobium japonicum* symbiotic gene region discovered by competitive DNA-RNA hybridization. *J. Bacteriol.* 182:1472-80.
- O'Hara, G.M. y Daniel, R.M. 1985. Rhizobial denitrification: a review. *Soil. Biol. Biochem.* 17: 1-9.
- Oldroyd, G.E.D. y Downie, J.A. 2004. Calcium, kinases, and nodulation signalling in legumes. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 5: 566-576.
- Oldroyd, G.E.D. y Downie, J.A. 2008. Coordination nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 519-546.
- Olivares, J. 2006. Nitrogenasa. Enzima clave de la fijación. *En Fijación biológica de nitrógeno: fundamentos y aplicaciones.* Bedmar, E.J., González, J., Lluch, C., y Rodelas, B. (eds.). Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN), pp. 29-34.
- Ostrowski, J., Wu, J.-Y., Rueger, D.C., Miller, B.E., Siegel, L.M., y Kredich, N.M. 1989. Characterization of the *cysJIIH* regions of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* 264: 15726-15737.
- Ott, T., van Dongen, J.T., Gunther, C., Krusell, L., Desbrosses, G., Vigeolas, H., Bock, V., Czechowski, T., Geigenberger, P., y Udvardi, M.K. 2005. Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Curr. Biol.* 15:531-535

- Ott, T., Sullivan, J., James, E.K., Flemetakis, E., Günther, C., Gibon, Y., Ronson, C., y Udvardi, M. 2009. Absence of Symbiotic Leghemoglobins Alters Bacteroid and Plant Cell Differentiation During Development of *Lotus japonicus* Root Nodules. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 22: 800-808.
- Ouellet, H., Ouellet, Y., Richard, C., Labarre, M., Wittenberg, B., Wittenberg, J., y Guertin, M. (2002). Truncated hemoglobin HbN protects *Mycobacterium bovis* from nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 5902-5907.
- Page, K.M. y Guerinot, M.L. 1995. Oxygen control of the *Bradyrhizobium japonicum* *hemA* gene. *J. Bacteriol.* 177: 3979-3984.
- Pagnussat, G.C., Simontacchi, M., Puntarulo, S., Lamattina, L., 2002. Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiol.* 129: 954-956.
- Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G., y Moncada, S. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 327: 524-526.
- Parani, M., Rudrabhatla, S., Myers, R., Weirich, H., Smith, B., Leaman, D.W., y Goldman, S.L. 2004. Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol. J.* 2: 359-366.
- Pauly, N., Pucciariello, C., Mandon, K., Innocenti, G., Jamet, A., Baudouin, E., Hérouart, D., Frendo, P., y Puppo, A. 2006. Reactive oxygen and nitrogen species and glutathione: key players in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *J. Exp. Bot.* 57: 1769-1776.
- Perazzolli, M., Dominici, P., Romero-Puertas, M.C., Zago, E., Zeier, J., Sonoda, M., Lamb, C., y Delledonne, M. 2004. *Arabidopsis* nonsymbiotic hemoglobin AHb1 modulates nitric oxide bioactivity. *Plant Cell.* 16: 2785-2794.
- Perazzolli, M., Romero-Puertas, M.C., Delledonne, M., 2006. Modulation of nitric oxide bioactivity by plant haemoglobins. *J. Exp. Bot.* 57: 479-488.
- Philippot, L., Clays-Josserand, A., y Lensi, R. 1995. Use of Tn5 mutants to assess the role of the dissimilatory nitrite reductase in the competitive abilities of two *Pseudomonas* strains in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1426-1430.
- Pii, Y., Crimi, M., Cremonese, G., Spena, A., y Pandolfini, T. 2007. Auxin and nitric oxide control indeterminate nodule formation. *BMC Plant Biol.* 8: 7-21.
- Planchet, E., Kapuganti, J.G., Sonoda, M., y Kaiser, W.M. 2005. Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *Plant J.* 41: 732-743.

- Polverari, A., Molesini, B., Pezzotti, M., Buonauro, R., Marte, M., y Delledonne, M. 2003. Nitric oxide-mediated transcriptional changes in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16: 1094-1105.
- Poock, S.R., Leach, E.R., Moir, J.W.B., Cole, J.A., y Richardson, D.J. 2002. Respiratory detoxification of nitric oxide by the cytochrome *c* nitrite reductase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 277: 23664-23669.
- Poole, R.K. 2005. Nitric oxide and nitroative stress tolerance in bacteria. *Biochem. Soc. Trans.* 33: 176-180.
- Prado, A.M., Porterfield, D.M., y Feijo, J.A. 2004. Nitric oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes. *Development.* 131: 2707-2714.
- Preisig, O., Anthamatten, D. y Hennecke, H. 1993. Genes for a microaerobically induced oxidase complex in *Bradyrhizobium japonicum* are essential for a nitrogen-fixing endosymbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 3309-3313.
- Preisig, O., Zufferey, R., Thöny-Meyer, L., Appleby, C. A., and Hennecke, H. 1996a. A high-affinity *cbb₃*-type cytochrome oxidase terminates the symbiosis-specific respiratory chain of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 178: 1532-1538.
- Preisig, O., Zufferey, R., y Hennecke, H. 1996b. The *Bradyrhizobium japonicum* *fixGHIS* are required for the formation of the high-affinity *cbb₃*-type cytochrome oxidase. *Arch. Microbiol.* 165: 297-305.
- Pullan, S.T., Gidley, M.D., Jones, R.A., Barrett, J., Stevanin, T.M., Read, R.C., Green, J., y Poole, R.K. 2007. Nitric oxide in chemostat-cultured *Escherichia coli* is sensed by Fnr and other global regulators: unaltered methionine biosynthesis indicates lack of *S* nitrosation. *J. Bacteriol.* 189: 1845-1855.
- Qiao, W. y Fan, L.-M. 2008. Nitric oxide signaling in plant responses to abiotic stress. *J. Integr. Plant Biol.* 50: 1238-1246.
- Radi, R. 2004. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 4003-4008.
- Rae, A.L., Perotto, S., Knox, J.P., Kannenberg, E.L., y Brewin, N.J. 1991. Expression of extracellular glycoproteins in the uninfected cells of developing pea nodule tissue. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4: 563-570.
- Rajagopalan T. 1938. Studies on groundnut nodule organism. IV Physiology of the organism: intermediary metabolism. *Indian J. Agr. Sci.* 8: 379-402.

- Rey, F.E., Oda, Y., y Harwood C.S. 2006. Regulation of uptake hydrogenase and effects of hydrogen utilization on gene expression in *Rhodospseudomonas palustris*. *J. Bacteriol.* 188: 6143-6152.
- Richardson, D.J. van Spanning, R.J., y Ferguson, S.J. 2007. The procariotic nitrate reductases. *En Biology of the nitrogen cycle*. Bothe, H., Ferguson, S.J., y Newton, W.E. (eds). Elsevier, pp. 21-36.
- Riedel, K.U., Jouanneau, Y., Masepohl, B., Pühler, A., y Klipp, W. 1995. *Eur. J. Biochem.* 231: 742-746.
- Rinaldo, S. y Cutruzzolà, F. 2007. Nitrite reductases in denitrification. *En Biology of the nitrogen cycle*. Bothe, H., Ferguson, S.J., y Newton, W.E. (eds). Elsevier, pp 37-56.
- Robles, E.F., Sánchez, C., Bonnard, N., Delgado, M.J., y Bedmar, E.J. 2006. The *Bradyrhizobium japonicum napEDABC* genes are controlled by the FixLJ-FixK₂-NnrR regulatory cascade. *Biochem. Soc. Trans* 34: 108-110.
- Robles, E.F., Delgado, M.J., Krell, T., Cutruzzolà, F., y Bedmar, E.J. Nitrogen oxides regulation of denitrification genes and molecular characterization of the *Bradyrhizobium japonicum* NnrR transcriptional regulator. *Submitted to J. Bacteriol.*
- Rockel, P., Strube, F., Rockel, A., Wildt, J., y Kaiser, W. M. 2002. Regulation of nitrite oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. *J. Exp. Bot.* 53: 103-110.
- Rustérucci, C., Carme-Espunya, M., Díaz, M., Chabannes, M., y Carmen-Martínez, M. 2007. GSNO reductase affords protection against pathogens in *Arabidopsis thaliana*, both locally and systemically. *Plant Physiol.* 143: 1282-1292.
- Ruvkun, G.B. y Ausubel, F.M. 1980. Interspecies homology of nitrogenase genes *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 191-195.
- Sánchez, C., Gates, A.J., Meakin, G.E., Uchiumi, T., Girard, L., Richardson, D.J., Bedmar, E.J., y Delgado, M.J. Production of nitric oxide and nitrosylhaemoglobin complexes in soybean nodules in response to flooding. *Submitted to Mol. Plant-Microbe Interact.*
- Sangwan, I. y O'Brian, M.R. 1991. Evidence for an interorganismic heme biosynthetic pathway in symbiotic soybean root nodules. *Science.* 251: 1220-1222.

- Santana, M.A., Pihakaski-Maunsbach, K., Sandal, D., Marcker, K.A., y Smith A.G. 1998. Evidence that the Plant Host Synthesizes the Heme Moiety of Leghemoglobin in Root Nodules. *Plant Physiol.* 116: 1259-1269.
- Sasakura, F., Uchiumi, T., Shimoda, Y., Suzuki, A. Takenouchi, K., Higashi, S., y Abe, M. 2006. A class 1 hemoglobin gene from *Alnus firma* functions in symbiotic and nonsymbiotic tissues to detoxify nitric oxide. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19: 441-450.
- Schopfer, F.J., Baker, P.R., y Freeman, BA. 2003. NO-dependent protein nitration: a cell signalling event or an oxidative inflammatory response? *Trends Biochem. Sci.* 28: 646-54.
- Schopfer, F.J., Baker, P.R., y Freeman, BA. 2003. NO-dependent protein nitration: a cell signalling event or an oxidative inflammatory response? *Trends Biochem. Sci.* 28: 646-54.
- Sciotti, M.-A., Chanfon, A., Hennecke, H., y Fischer, H.-M. 2003. Disparate oxygen responsiveness of two regulatory cascades that control expression of symbiotic genes in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 185: 5639-5642.
- Serraj, R., Fleurat-Lessard, P., Jaillard, B., y Drevon, J.J. 1995. Structural changes in the inner-cortex cells of soybean root nodules are induced by short-term exposure to high salt or oxygen concentrations. *Plant Cell Environ.* 18: 455-462.
- Shimoda, Y., Nagata, M., Suzuki, A., Abe, M., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Higashi, S., y Uchiumi, T. 2005. Symbiotic *Rhizobium* and nitric oxide induce gene expression of non-symbiotic hemoglobin in *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol.* 46: 99-107.
- Shimoda, Y., Shimoda-Sasakura, F., Kucho, K., Kanamori, N., Nagata, M., Suzuki, A., Abe, M., Higashi, S., y Uchiumi, T. 2009. Overexpression of class 1 plant hemoglobin genes enhances symbiotic nitrogen fixation activity between *Mesorhizobium loti* and *Lotus japonicus*. *Plant J.* 57: 254-263.
- Siegel, L.M. y Davis, P.S. 1974. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-sulfite reductase of enterobacteria. *J. Biol. Chem.* 249: 1587-1598.
- Siegel, L.M., Rueger, D.C., Barber, M.J., y Krueger, R.J. 1982. *Escherichia coli* sulfite reductase hemoprotein subunit. *J. Biol. Chem.* 257: 6343-6350.
- Simontacchi, M., Jasid, S., y Puntarulo, S. 2004. Nitric oxide generation during early germination of sorghum seeds. *Plant Sci.* 167: 839-847.

- Smaghe, B.J., Hoy, J.A., Percifield, R., Kundu, S., Hargrove, M.S., Sarath, G., Hilbert, J.L., Watts, R.A., Dennis, E.S., Peacock, W.J., Dewilde, S., Moens, L., Blouin, G.C., Olson, J.S., Appleby, C.A. 2009. Correlations between oxygen affinity and sequence classifications of plant hemoglobins. *Biopolymers* [Epub ahead of print].
- Sokolovski, S., Hills, A., Gay, R., García-Mata, C., Lamattina, L., y Blatt, MR.. 2005. Protein phosphorylation is a prerequisite for intracellular Ca²⁺ release and ion channel control by nitric oxide and abscisic acid in guard cells. *Plant J.* 43:520–29.
- Stach, P., Einsle, O., Schumacher, W., Kurun, E., y Kroneck, P.M. 2000. Bacterial cytochrome *c* nitrite reductases: new structural and functional aspects. *J. Inorg. Biochem.* 79: 381-385.
- Stamler, J.S., Singel, D.J., y Loscalzo, J. 1992. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science.* 258: 1898-1902.
- Stöhr, C., Strube, F., Marx, G., Ullrich, W. R., y Rockel, P. 2001. A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta.* 212: 835-841.
- Stöhr, C. y Stremlau, S. 2006. Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. *J. Exp. Bot.* 57: 463-470.
- Stoimenova, M., Libourel, I.G.L., Ratcliffe, R.G., y Kaiser, W.M. 2003. The role of nitrate reduction in the anoxic metabolism in roots II. Anoxic metabolism of tobacco roots with or without nitrate reductase activity. *Plant Soil.* 253: 155-167.
- Stouthamer, A.H., de Boer, A.P., van der Oost, J., y van Spanning, R.J. 1997. Emerging principles of inorganic nitrogen metabolism in *Paracoccus denitrificans* and related bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 71: 33-41.
- Takaya, N. 2002. Dissimilatory nitrate reduction metabolisms and their control in fungi. *J. Biosci Bioeng.* 94:506-10.
- Thöny, B., Fischer, H.-M., Anthamatten, D., Bruderer, T., y Hennecke, H. 1987. The symbiotic nitrogen fixation regulatory operon (*fixRnifA*) of *Bradyrhizobium japonicum* is expressed aerobically and is subject to a novel, *nifA*-independent type of activation. *Nucleic Acids Res.* 15: 8479-8499.

- Thöny-Meyer, L., Stax, D., y Hennecke, H. 1989. An unusual gene cluster for the cytochrome *bc*₁ complex in *Bradyrhizobium japonicum* and its requirement for effective root nodule symbiosis. *Cell*. 57: 683-697.
- Toffanin, A., Wu, Q., Maskus, M., Casella, S., Abruna, H.D., y Shapleigh, J.P. 1996. Characterization of the gene encoding nitrite reductase and the physiological consequences of its expression in the nondenitrifying *Rhizobium "hedysari"* strain HCNT1. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4019-4025.
- Toffanin, M., Basaglia, C., Ciardi, P., Vian, S., Povolò, S., y Casella, S. 2000. Energy content decrease and viable-not-culturable status induced by oxygen limitation coupled to the presence of nitrogen oxides in *Rhizobium "hedysari"*. *Biol. Fertil. Soils*. 31: 484-488.
- Trinchant, J.-C. y Rigaud, J. 1980. Nitrite inhibition of nitrogenase from soybean bacteroids. *Appl. Environ. Microbiol.* 124: 49-54.
- Trinchant, J.-C. y Rigaud, J. 1982. Nitrite and nitric oxide as inhibitors of nitrogenase from soybean bacteroids. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 1385-1388.
- Tuckerman, J.R., González, G., y Gilles-González, M.A. 2001. Complexation precedes phosphorylation for two-component regulatory system FixL/FixJ of *Sinorhizobium meliloti*. *J. Mol. Biol.* 308: 449-455.
- Tuckerman, J.R., González G., Dioum, E.M., y Gilles-González, M.A. 2002. Ligand and oxidation-state specific regulation of the heme-based oxygen sensor FixL from *Sinorhizobium meliloti*. *Biochemistry*. 41: 6170-6177.
- Tun, N.N., Santa-Catarina, C., Begum, T., Silveira, V., Nadro, W., *et al.* 2006. Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell Physiol.* 47: 346-354.
- Uchida, A., Jagendorf, A.T., Hibino, T., y Takabe, T. 2002. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant. Sci.* 163: 515-523.
- van Spanning, R.J., Delgado, M.J., y Richardson, D.J. 2005. The nitrogen cycle: denitrification and its relationship to N₂ fixation. *En Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology and the environment*. Werner, D. y Newton, W.E. (eds). Springer Netherlands, pp. 277-342.
- van Spanning, R.J., Richardson, D.J., y Ferguson, S.J. 2007. Introduction to the biochemistry and molecular biology of denitrification. *En Biology of the*

- nitrogen cycle. Bothe, H., Ferguson, S.J., y Newton, W.E. (eds). Elsevier, pp. 3-20.
- VandenBosch, K.A., Bradley, D.J., Knox, J.P., Perotto, S., Butcher, G.W., y Brewin, N.J. 1989. Common components of the infection thread matrix and the intercellular space identified by immunocytochemical analysis of pea nodules and uninfected roots. *EMBO J.* 8: 335-342.
- Vasse, J., de Billy, F., Camut, S. y Truchet, G. 1990. Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J. Bacteriol.* 172: 4295-4306.
- Velasco, L., Mesa, S., Delgado, M.J., y Bedmar, E.J. 2001. Characterization of the *nirK* gene encoding the respiratory, Cu-containing nitrite reductase of *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1521: 130-134.
- Velasco, L., Mesa, S., Xu, C., Delgado, M.J., y Bedmar, E.J. 2004. Molecular characterization of *nosRZDFYLX* genes coding for denitrifying nitrous oxide reductase of *Bradyrhizobium japonicum*. *Antonie van Leeuwenhoek.* 85: 229-235.
- Velázquez, E., Mateos, P.F., Trujillo, M., Rivas, R., y Martínez-Molina, E. 2006. Diversidad de bacterias rizoendosimbióticas de plantas. Bedmar, E.J., González, J., Lluch, C., y Rodelas, B. (eds.). Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN), pp. 45-52.
- Vieweg, M.F., Hohnjec, N., y Küster, H. 2005. Two genes encoding different truncated hemoglobins are regulated during root nodule and arbuscular mycorrhiza symbioses of *Medicago truncatula*. *Planta* 220: 757-766.
- Watts, R.A., Hunt, P.W., Hvitved, A.N., Hargrove, M.S., Peacock, W.J., y Dennis, E.S. 2001. A hemoglobin from plants homologous to truncated hemoglobins of microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 98: 10119-10124.
- Wei, H., y Layzell, D.B. 2006. Adenylate-coupled ion movement. A mechanism for the control of nodule permeability to O₂ diffusion. *Plant Physiol.* 141: 280-287.
- Winkler, W.C., González, G., Wittenberg J.B., Hille, R., Dakappagari, N., Jacob, A., González, L.A., y Gilles, M.A. 1996. Nonsteric factors dominate binding of nitric oxide, azide, imidazole, cyanide, and fluoride to the Rhizobial heme-based oxygen sensor FixL. *Chem. Biol.* 3: 841-850.

- Witty, J. y Minchin, F. 1990. Oxygen diffusion in the legume root nodule. *En Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives*. Gresshoff, P.M., Roth, L.E., Stacey G., y Newton, W.E. (eds.). Chapman & Hall, New York, pp. 285-292
- Wycoff, K.L., Hunt, S., Gonzales, M.B., VandenBosch, K.A., Layzell, D.B., y Hirsch, A.M. 1998. Effects of oxygen on nodule physiology and expression of nodulins in alfalfa. *Plant Physiol.* 117: 385-395.
- Yamasaki, H., Sakihama, Y., y Takahashi, S. 1999. An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends Plant Sci.* 4: 128-129.
- Yamasaki, H. y Sakihama, S. 2000 Simultaneous production of nitric oxide and peroxyxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett* 468: 89-92.
- Yamasaki, H. y Cohen, M.F. 2006. NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants? *Trends Plant Sci.* 11: 522-24.
- Zago, E., Morsa, S., Dat, J.F., Alard, P., Ferrarini, A., Inzé, D., Delledonne, M., y Van Breusegem, F. 2006. Nitric oxide- and hydrogen peroxide-responsive gene regulation during cell death induction in tobacco. *Plant Physiol.* 141: 404-411.
- Zeidler, D., Zähringer, U., Gerber, I., Dubery, I., Hartung, T., Bors, W., Hutzler, P. y Durner, J. 2004. Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 15811-15816.
- Zeier, J., Delledonne, M., Severi, E., Sonoda, M., y Lamb, C. 2004. Genetic elucidation of nitric oxide signaling in incompatible plant-pathogen interactions. *Plant Physiol.* 136: 2875-2886.
- Zemojtel, T., Fröchlich, A., Palmieri, M.C., *et al.* 2006. Plant nitric oxide synthase: a never-ending story? *Trends Plant Sci.* 11: 524-525.
- Zhang, H., Shen, W.B., Zhang, W., y Xu, L.L. 2005. A rapid response of β -amylase to nitric oxide but not gibberellin in wheat seeds during the early stage of germination. *Planta.* 220: 708-716.
- Zhang, Y.Y., Wang, L.L., Liu, Y.L., Zhang, Q., Wei, Q.P., y Zhang, W.H. 2006. Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na^+/H^+ antiport in the tonoplast. *Planta.* 224: 545-555.

- Zhao, M.G., Zhao, X., Wu, Y., y Zhang, L. 2007a. Enhanced sensitivity to oxidative stress in an *Arabidopsis* nitric oxide synthase mutant. *J. Plant Physiol.* 164: 737-745.
- Zhao, M.G., Tian, Q.Y., Zhang, W.H. 2007b. Nitric oxide synthase dependent nitric oxide production is associated with salt tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 144: 206-217.
- Zheng, L., White, R.H., Cash, V.L., Jack, R.F., y Dean, D.R. 1993. Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 2754-2758.
- Zufferey, R., Preisig, O., Hennecke, H., y Thöny-Meyer, L. 1996a. Assembly and function of the cytochrome *cbb*₃ oxidase subunits in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Biol. Chem.* 271: 9114-9119.
- Zufferey, R., Thöny-Meyer, L., y Hennecke, H. 1996b. Histidine 131, not histidine 43, of the *Bradyrhizobium japonicum* FixN protein is exposed towards the periplasm and essential for the function of the *cbb*₃-type oxidase. *FEBS Letters.* 394: 349-352.
- Zufferey, R., Arslan, E., Thöny-Meyer, L., y Hennecke, H. 1998. How replacement of the 12 conserved histidines of subunit I affect assembly, cofactor binding, and enzymatic activity of the *Bradyrhizobium japonicum* *cbb*₃-type oxidase. *J. Biol. Chem.* 273: 6452-6459.
- Zumft, W.G. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 533-616.
- Zumft, W.G. 2005. Nitric oxide reductases of prokaryotes with emphasis on the respiratory, heme-copper oxidase type. *J. Inorg. Biochem.* 99: 194-215.
- Zumft, W.G. y Kroneck, P.M. 2007 Respiratory transformation of nitrous oxide (N₂O) to dinitrogen by Bacteria and Archaea. *Adv Microb Physiol.* 52:107-227.

APÉNDICE

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

En esta lista sólo se comentan las abreviaturas y símbolos más relevantes, los demás aparecen explicados a lo largo del texto.

ADN/DNA	ácido desoxirribonucleico
ARA	actividad reductora de acetileno
ARN/RNA	ácido ribonucleico
BDO	barrera de difusión de oxígeno
bp	pares de bases
BSA	albúmina sérica bovina
bv	biovariedad
°C	grado centígrado
C ₂ H ₂	acetileno
<i>cd</i> ₁ Nir	nitrito reductasa tipo <i>cd</i> ₁
cDNA	DNA complementario
cm	centímetro
cNor	óxido nítrico reductasa de tipo c
cPTIO	del inglés, carboxy-2-phenyl-4,4,5,5-tetramethyl-imidazoline-1-oxyl-3-oxide
CuNir	nitrito reductasa tipo cobre (NirK)
cv	cultivar
DAF	diamonifluoresceína
DAF-2 DA	del inglés, 4,5-diaminofluorescein diacetate
DAF-FM	del inglés, 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein
DAF-FM DA	del inglés, 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate
DWN	peso seco de nódulo/dry-weight nodule
eds	editores
EPR	resonancia paramagnética electrónica
<i>et al</i>	y colaboradores
Fd-Nir	nitrito reductasa dependiente de ferredoxina
FSN	fijación simbiótica de nitrógeno
Fig	figura

FN	nitrógeno fijado/fixed nitrogen
FWN	peso fresco de nódulos/fresh-weight nodule
g	gramo
g	RFC (fuerza centrífuga relativa)
GHz	gigahercio
h	hora
Hb	hemoglobina
Hb/Lb(Fe ²⁺)	hemoglobina/leghemoglobina en estado ferroso (reducida)
Hb/Lb(Fe ²⁺)O ₂	Hb/LbO ₂ , oxihemoglobina/leghemoglobina
Hb/Lb(Fe ³⁺)	hemoglobina/leghemoglobina en estado férrico (oxidada)
Hb-1	hemoglobina de clase 1
K	Kelvin
kDa	kiloDalton
KNO ₃	nitrate potásico
Lb	leghemoglobina
LB	Luria-Bertani
Lb(Fe ²⁺)NO	LbNO, complejo nitrosil-leghemoglobina
Lb(Fe ⁴⁺)=O	ferril-leghemoglobina
M	molar
mg	miligramo
min	minuto
ml	mililitro
mm	milímetro
mT	miliTesla
MV	metil viológeno
mW	milivatio
N	nitrógeno
N ₂	nitrógeno molecular/dinitrógeno
N ₂ O	óxido nitroso
Nap	nitrate reductasa periplásmica
Nar	nitrate reductasa respiratoria
Nas	nitrate reductasa asimilatoria
%Ndfa	proporción de nitrógeno derivado de la atmósfera
NDW	peso seco de los nódulos (por planta)/nodule dry weight

ng	nanogramo
NH_4^+	amonio
NI-NOR	nitrito:óxido nítrico reductasa de membrana plasmática
Nir	nitrito reductasa
NiRa	nitrito reductasa asimilatoria
NirK	nitrito reductasa tipo cobre (CuNir)
nM	nanomolar
nm	nanometro
nmol	nanomol
NN	número de nódulos (por planta)/nodule number
NNEDA	del inglés, naphthylethylene diamine dihydrochloride
NO	óxido nítrico
NO_2^-	nitrito
NO_3^-	nitrato
Nor	óxido nítrico reductasa
Nos	óxido nitroso reductasa
NOS	óxido nítrico sintasa
NOx	óxidos de nitrógeno
NR	nitrato reductasa
NRc/cNR	nitrato reductasa citosólica/cytosolic nitrate reductase
nsHb	hemoglobinas no simbióticas
O_2	oxígeno molecular
OD	densidad óptica
ORF	marco de lectura abierto
PBM	membrana peribacteroidea
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
$p\text{O}_2$	presión de oxígeno
pp	páginas
prot	proteína
PSY	del inglés, peptone-salts-yeast extract
PVPP	polivinilpirrolidona
$q\text{Cu}_A\text{Nor}$	óxido nítrico reductasa tipo $q\text{Cu}_A$
$q\text{Nor}$	óxido nítrico reductasa tipo q
RFU	unidad de fluorescencia relativa

RNS	especies reactivas de nitrógeno
ROS	especies reactivas de oxígeno
rpm	revoluciones por minuto
RT-PCR	del inglés, reverse transcription polymerase chain reaction
s	segundo
SDW	peso seco del tallo/shoot dry weight
SE	error estándar
SH	longitud del tallo/shoot height
SNAP	del inglés, <i>S</i> -nitro- <i>N</i> -acetylpenicillamine
SNP	nitroprusiato sódico
Tm	tonelada métrica
TN	nitrógeno total/total nitrogen
µg	microgramo
µl	microlitro
µM	micromolar
UV	ultravioleta
v	volumen
vol	volumen
WT	wild-type
YEM	yeast extract-mannitol

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
INTRODUCCIÓN	
Figura 1.1. Especies de NO.....	4
Figura 1.2. Señalización por NO en células vegetales.....	7
Figura 1.3. Síntesis de NO en plantas.....	7
Figura 1.4. Ciclo nsHb/NO y su implicación en la tolerancia frente a condiciones hipóxicas.....	20
Figura 2.1. Ciclo biológico del nitrógeno.....	21
Figura 2.2. Proceso de nodulación.....	25
Figura 2.3. Representación esquemática de nódulos indeterminados y determinados.....	26
Figura 2.4. Estructura del complejo nitrogenasa de <i>Azotobacter vinelandii</i>	27
Figura 2.5. Representación esquemática del ciclo de la Fe-proteína.....	29
Figura 2.6. Organización de los genes <i>nif</i> y <i>fix</i> en <i>B. japonicum</i>	30
Figura 2.7. Representación esquemática de las dos cascadas reguladoras que controlan los genes requeridos para la fijación de simbiótica de dinitrógeno en <i>B. japonicum</i>	34
Figura 2.8. Representación de la estructura modular de la proteína reguladora NifA.....	37
Figura 3.1. Organización de los genes <i>nap</i> , <i>nir</i> , <i>nor</i> y <i>nos</i> en <i>B. japonicum</i>	52
Figura 3.2. Representación esquemática de la localización de las proteínas implicadas en el proceso de la desnitrificación en <i>B. japonicum</i>	53
Figura 3.3. Regulación de los genes de la desnitrificación por el sistema FixLJ-FixK ₂ -NnrR de <i>B. japonicum</i>	57
Figura 3.4. Detección <i>in situ</i> de la actividad β -glucosidasa en cortes longitudinales de nódulos de plantas de soja inoculadas con <i>B. japonicum</i> USDA110 que contiene una fusión transcripcional P _{nirK} -lacZ.....	59
Figura 4.1. Representación esquemática de las posibles fuentes de NO en nódulos.....	61
Figura 4.2. Espectros de resonancia paramagnética electrónica (EPR) de nódulos de soja procedentes de plantas inoculadas con <i>B. japonicum</i> o la cepa mutante <i>napA</i> tratadas con nitrato en condiciones control o sometidas a hipoxia.....	62
 CAPÍTULO 1	
Figure 1. EPR spectra of intact nodules from plants inoculated with WT <i>B. japonicum</i> USDA110, <i>napA</i> GRPA1, <i>nirK</i> GRK308 or <i>norC</i> GRC131 strains. Plants were subjected or not (control) to flooding conditions.....	81
Figure 2. (A) LbNO proportion determined from the UV-visible spectra, (B) NO detection using DAF-FM and expressed as relative fluorescence units (RFU), and (C) nitrite accumulation in nodules. Plants were inoculated with WT <i>B. japonicum</i> USDA110, <i>napA</i> GRPA1, <i>nirK</i> GRK308, or <i>norC</i> GRC131 strains. Nodules were isolated from control plants or plants subjected to flooding conditions.....	83
Figure 3. Expression of <i>nifH</i> in nodules by quantitative reverse transcription-PCR. Plants were inoculated with WT <i>B. japonicum</i> USDA110, <i>napA</i> GRPA1, <i>nirK</i> GRK308, or <i>norC</i> GRC131 strains. Nodules were	

isolated from control plants or plants subjected to flooding conditions. Flooded nodules were incubated with 2 mM of c-PTIO.....86

Figure 4. (A) β -galactosidase activity from a *nifD'*-*lacZ*, translational fusion in WT *B. japonicum* 1042, *nirK* 0110 and *norC* 0410 strains, and (B) nitrite and nitric oxide produced by WT *B. japonicum* USDA110, *nirK* GRK308 and *norC* GRC131 strains. Cells were incubated in YEM medium supplemented with 10 mM KNO₃ under aerobic or anaerobic conditions.....88

CAPÍTULO 2

Figure 1. Nodule number (NN) and nodule dry weight (NDW) of plants inoculated with the wild-type *B. japonicum* USDA110, and *nirK* GRK308 or *norC* GRC131 mutant strains. Nodules were isolated from control plants or plants subjected to flooding conditions for 7 and 14 days117

CAPÍTULO 3

Figure 1. (A) Schematic diagram of the putative *B. japonicum* nitrate assimilation gene cluster. In (A), construction of the plasmid pBG1901 (B) is also indicated.....139

Figure 2. (a) aerobic growth in complete PSY medium, (b) nitrate-dependent aerobic growth, and (c) nitrate-dependent anaerobic growth in Bergersen minimum medium supplemented with 10 mM of wild-type *B. japonicum* USDA110 strain, and *nirB* 1901 and *nirK* GRK308 mutant strains.....140

Figure 3. Reverse transcription-PCR detection of *nirK*, *norC*, *nirB* and *hmpA* transcripts in nodules isolated from soybean plants that were inoculated with *B. japonicum* USDA110.....142

Figure 4. EPR spectra from intact nodules of plants inoculated with wild type (WT) *B. japonicum* USDA110, and *nirB* 1091 and *nirK* GRK308 mutant strains.....143

Figure 5. (a) LbNO proportion determined from the UV-visible spectra, (b) NO detection using DAF-FM and expressed as relative fluorescence units (RFU), and (c) nitrite accumulation in nodules. Plants were inoculated with wild-type (WT) *B. japonicum* USDA110, and *nirB* 1901 and *nirK* GRK308 mutant strains.....144

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
INTRODUCCIÓN	
Tabla 1.1. Resumen de la función conocida de los genes <i>nif</i> y <i>fix</i> en <i>B. japonicum</i> según la información publicada en la Rhizobase.....	30
 CAPÍTULO 1	
Table 1. (A) MV-dependent nitrate reductase (NR), (B) nitrite reductase (Nir) and (C) nitric oxide reductase (Nor) activities in bacteroids. Plants were inoculated with wild type (WT) <i>B. japonicum</i> USDA110, <i>napA</i> GRPA1, <i>nirK</i> GRK308, or <i>norC</i> GRC131 strains. Nodules were isolated from control plants or plants subjected to flooding conditions.....	84
Table 2. Expression of of <i>nifH</i> , <i>nifD</i> , <i>fixA</i> and <i>nifS</i> by quantitative reverse transcriptase-PCR in nodules from plants inoculated with <i>B. japonicum</i> USDA110. Nodules were isolated from control plants or plants subjected to flooding conditions.....	86
Table 3. Acetylene reduction activity (ARA) and leghaemoglobin (Lb) content in nodules. Plants were inoculated with the WT USDA110, <i>napA</i> GRPA1, <i>nirK</i> GRK308 or <i>norC</i> GRC131 strains. Nodules were isolated from control plants or plants subjected to flooding conditions.....	87
Table 4. (A) MV-dependent nitrate reductase (NR), (B) nitrite reductase (Nir) and (C) nitric oxide reductase (Nor) activities in free-living cells. <i>B. japonicum</i> USDA110, <i>napA</i> GRPA1, <i>nirK</i> GRK308 and <i>norC</i> GRC131 strains were incubated in YEM medium supplemented with 10 mM KNO ₃ under aerobic or anaerobic conditions.....	89
Table S1. Primers used for quantification of transcripts from bacteroids.....	105
 CAPÍTULO 2	
Table 1. Shoot dry weight (SDW) and shoot height (SH) of uninoculated plants and plants inoculated with the wild-type <i>B. japonicum</i> USDA110, and <i>nirK</i> GRK308 or <i>norC</i> GRC131 mutant derivatives. Plants were subjected or not (control) to flooding conditions for 7 and 14 days.....	115
Table 2. Dry weight per nodule (ratio between nodule dry weight (NDW) and nodule number (NN) per plant). Plants were inoculated with the wild-type <i>B. japonicum</i> USDA110, and <i>nirK</i> GRK308 or <i>norC</i> GRC131 mutant strains. Nodules were isolated from plants subjected or not (control) to flooding flooding conditions for 7 and 14 days.....	118
Table 3. Leghaemoglobin (Lb) content in nodules. Plants were inoculated with the wild-type USDA110, and <i>nirK</i> GRK308 or <i>norC</i> GRC131 mutant strains. Nodules were isolated from plants subjected or not (control) to flooding conditions for 7 and 14 days.....	119
Table 4. ¹⁵ N enrichment (%atom ¹⁵ N excess), estimation of the proportion of nitrogen derived from atmosphere (%Ndfa), total nitrogen content (TN), and fixed-nitrogen content (FN) of shoot tissue of uninoculated plants and plants inoculated with the wild-type USDA110, and <i>nirK</i> GRK308 or <i>norC</i> GRC131 mutant strains. Plants were subjected or not (control) to flooding conditions for 14 days.....	120

CAPÍTULO 3

Table 1. MV-dependent nitrite reductase (Nir) and nitric oxide reductase (Nor) activities in wild type (WT), and *nirB* 1901, *nirK* GRK308 and *norC* GRC131 mutant strains. Nir and Nor activities were determined in cell-free extracts of cells that were incubated under aerobic or anaerobic conditions in Bergersen's minimum medium with 10 mM nitrate as the sole nitrogen source.....142

Table 2. MV-dependent nitrite reductase (Nir) and nitric oxide reductase (Nor) activities in bacteroids. Plants were inoculated with wild type (WT) *B. japonicum*, and *nirB* 1901, *nirK* GRK308 and *norC* GRC131 mutant strains.....145

Table S1. Primer pairs for the amplification of upstream and downstream *nirB* regions.....159

Table S2. Primers used for quantification of transcripts from bacteroids.....159

