

# Actividad Nitrato Reductasa en Hoja, Tallo Raíz y Nódulo de *Lotus corniculatus* en Simbiosis con *Rhizobium loti*<sup>1</sup>

J. Monza\*, M.J. Delgado\*\*, E.J. Bedmar\*\*

## ABSTRACT

The nitrogenase and hydrogen uptake activities of *Rhizobium loti* strains U226 and T1 were studied in symbiosis with *Lotus corniculatus* L. var. Ganador. Leaf, stem, root and nodule nitrate reductase (NR) activities were also determined as well as the contribution of each plant organ to the total plant NR activity. There was no difference in nitrogenase activity (measured as acetylene-dependent ethylene production) between strains U226 and T1 and neither of them expressed hydrogen uptake activity (determined amperometrically). In plants that were only N<sub>2</sub>-dependent, the in vivo leaf, stem, root and nodule NR activities of plants inoculated with strain T1 were higher than those of plants inoculated with strain U226, regardless of the presence or the absence of nitrate in the incubation mixtures. When plants were treated with 5 mM KNO<sub>3</sub>, there was no difference between root NR activity of plants inoculated with either strain. However, leaf, stem and nodule NR activities were greater in plants inoculated with strain T1. In plants not treated with nitrate, leaf NR activity was responsible for 45% of the total plant NR activity, while those of stem, root and nodule accounted for 28.5%, 22% and 4.5%, respectively. When plants were treated with nitrate, the stem was the most active organ in nitrate reduction with 52% of the total plant NR activity, followed by root, stem and nodule with 31%, 14.5% and 2.5%, respectively. The total reduced nitrogen content of plants inoculated with strain T1 was 1.6 times higher than that of plants inoculated with strain U226. These results indicate that plants inoculated with strain T1 had a more efficient nitrate metabolism than plants inoculated with strain U226.

## COMPENDIO

Se ha estudiado la actividad nitrogenasa e hidrogenasa de las razas U226 y T1 de *Rhizobium loti* en simbiosis con *Lotus corniculatus* L., var. Ganador. También, se ha determinado la actividad nitrato reductasa (NR) de hoja, tallo, raíz y nódulo de plantas de *Lotus*, así como la contribución de cada uno de estos órganos a la actividad NR total de la planta. No se encontraron diferencias en la actividad nitrogenasa (medida como reducción del acetileno a etileno) entre las razas U226 y T1 y ninguna de las dos expresó actividad hidrogenasa (determinada amperométricamente). En plantas crecidas, dependiendo exclusivamente de la fijación de N<sub>2</sub>, la actividad NR in vivo de las hojas, tallos, raíces y nódulos de las plantas inoculadas con la raza T1 fue superior a la de las plantas inoculadas con la raza U226, independientemente de que los ensayos de actividad se realizaran en presencia o en ausencia de nitrato en las mezclas de incubación. Cuando las plantas se trataron con 5 mM de NO<sub>3</sub>K, no hubo diferencias en la actividad NR de las raíces de las plantas inoculadas con las razas U226 y T1. Sin embargo, la actividad NR de las hojas, tallos y nódulos fue mayor en las plantas inoculadas con esta raza. En plantas no tratadas con nitrógeno combinado, la actividad NR de las hojas contribuyó con un 45% al total de la actividad NR de la planta, mientras que la del tallo, raíz y nódulos contribuyeron con un 28.5%, 22% y 4.5%, respectivamente. En plantas tratadas con nitrato, el tallo fue el órgano más activo en la reducción del mismo, aportando el 52% de la actividad NR total de la planta, seguido de la raíz con un 31%, las hojas con un 14.5% y los nódulos con un 2.5%. El contenido en nitrógeno total reducido de las plantas inoculadas con la raza T1 fue 1.4 veces mayor que el de las plantas inoculadas con la raza U226. Estos resultados indican que las plantas inoculadas con la raza T1 tuvieron un metabolismo del nitrato más efectivo que el de las inoculadas con la raza U226.

<sup>1</sup> Recibido para publicación el 18 de agosto 1988.

Los autores desean expresar su agradecimiento a las siguientes personas e instituciones: Dr. M. Chamber, por su colaboración en la determinación de actividad hidrogenasa. Este trabajo fue financiado por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (C.I.C.Y.T.), Proyecto No. BF 87-003. Al Instituto de Cooperación Iberoamericana (I.C.I.), por haber financiado al primer autor su permanencia en España para realizar la investigación que sirvió de base para escribir el presente trabajo.

\* Cátedra de Bioquímica. Facultad de Agronomía Montevideo. Uruguay.

\*\* Departamento de Microbiología. Estación Experimental del Zaidín, C.S.I.C. 18008-Granada. España

## INTRODUCCION

Las leguminosas son únicas entre las plantas superiores porque pueden utilizar tanto el nitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>), como el nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) presente en la solución del suelo para su crecimiento y desarrollo

La reducción del N<sub>2</sub> a amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) está catalizada por la enzima nitrogenasa que, simultáneamente, reduce protones (H<sup>+</sup>) a hidrógeno (H<sub>2</sub>) (7). La producción de hidrógeno por los nódulos de las leguminosas representa una pérdida de energía y poder reductor que disminuye la eficacia de la fijación de N<sub>2</sub>

(11) Algunas especies de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* han desarrollado un sistema enzimático independiente, conocido como hidrogenasa (sistema Hup), capaz de oxidar todo o parte del  $H_2$  producido por la nitrogenasa, lo que resulta, a su vez en la recuperación de electrones que pueden ser utilizados por la nitrogenasa o destinados a la producción de ATP (8, 9).

La asimilación de nitrato ocurre en dos etapas. La primera de ellas está catalizada por la enzima nitrato reductasa (NR), que reduce en nitrato a nitrito ( $NO_2^-$ ). Posteriormente, el nitrito es reducido a amonio por la nitrito reductasa (NiR). A diferencia de la nitrogenasa, que sólo se encuentra en los bacteroides, la NR puede localizarse además en las hojas, tallos y raíces de la mayoría de las plantas, incluyendo las leguminosas (1).

A diferencia de otras simbiosis, como las que se establecen entre *Medicago*, *Trifolium*, *Phaseolus*, *Glycine*, etc y sus microsimbiontes específicos, más estudiadas en sus aspectos fisiológicos, bioquímicos, genéticos y agronómicos, son muy escasos los datos que se poseen sobre la asociación *Lotus-Rhizobium loti*. *R. loti* es una raza de rápido crecimiento capaz de infectar no sólo a leguminosas del género *Lotus*, sino también a *Lupinus*, *Ornithopus* y *Anthyllis* (14). En Uruguay, se cultiva *Lotus corniculatus* tanto en condiciones de monocultivo como en asociación con *Festuca arundinacea* y *Lolium multiflorum*.

Estas praderas naturales constituyen la base para la alimentación de ganado y la producción de carne, leche y lana.

Este trabajo se inició con el objeto de estudiar las actividades nitrogenasa e hidrogenasa de *R. loti* en simbiosis con *L. corniculatus*. También, se ha comparado la actividad nitrato reductasa de hoja, tallo, raíz y nódulo de plantas de *L. corniculatus* inoculadas con las razas U226, inóculo comercial, y T1, aislada de un suelo nativo de Uruguay.

## MATERIALES Y METODOS

### Plantas y microorganismos

En el estudio se utilizó *Lotus corniculatus*, var. Ganador. Las semillas se esterilizaron con alcohol (96% v/v) durante 3 min; se lavaron abundantemente con agua estéril y se germinaron en cajas de Petri que contenían papel de filtro humedecido. Las plántulas se colocaron en jarras Leonard (cinco plantas por jarra) provistas de la solución mineral nutritiva descrita por Rigaud y Puppo (22), carente de nitrógeno.

En el momento de la siembra, cada plántula se inoculó, aisladamente, con 1 ml ( $10^8$  células de una suspensión de *R. loti*, razas U226 y T1. Las plántulas se cultivaron en cámaras de crecimiento controlado bajo las siguientes condiciones: ciclo día/noche de 16/8 h, 23/16 °C, 50% humedad relativa y una intensidad luminosa ( $400-700$  nm) de  $500\mu \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ .

Para los estudios de actividad nitrato reductasa en plantas tratadas con nitrato, la solución nutritiva de las jarras Leonard fue sustituida cinco días antes de la toma de muestras por otra idéntica adicionada de 5 mM de  $NO_3K$ .

La raza U226 es un inoculante comercial utilizado en Uruguay (23), y la raza T1 fue aislada originalmente de un suelo de la región de Tacuarembó (Uruguay). Las bacterias se cultivaron asimbióticamente en un medio que contenía manitol, extracto de levadura y triptona.

### Estudios fisiológicos

La actividad nitrogenada se ensayó mediante la técnica de la reducción del acetileno a etileno. Las plantas con las raíces noduladas se colocaron en tubos provistos de tapón de rosca perforable, sustituyéndose el 10% del volumen interior del tubo por acetileno. El etileno producido se determinó por cromatografía gaseosa a los 8 y 18 min, en las condiciones previamente descritas (5).

La actividad hidrogenasa de *R. loti* se determinó registrándose amperométricamente el consumo de  $H_2$  cuando a la suspensión de bacteroides se le suministró  $H_2$  y un aceptor final de electrones, de acuerdo con la metodología descrita por López *et al.* (16). Los bacteroides se aislaron de los nódulos según Emerich *et al.* (10), pero, en condiciones de aerobiosis para impedir la producción de  $H_2$  por la nitrogenasa.

La actividad nitrato reductasa se analizó mediante la técnica descrita por Ligeró *et al.* (15). Para ello, 0.20 g de nódulos enteros y de hojas, tallos y raíces homogéneamente troceados se colocaron en tubos que contenían 4 ml de buffer fosfato potásico 50 mM, pH 7.5, adicionado de EDTA 1 mM, propanol 1% (v/v) y  $NO_3K$  50 mM (ensayos +  $NO_3^-$ ). La infiltración de los tejidos se realizó efectuando un vacío de 40 cm de Hg (50 kPa) durante 10 min y posterior descompresión. Esta operación se repitió dos veces. Los tejidos infiltrados se incubaron en oscuridad, sin agitación, a 30°C y se tomaron varias alícuotas. Los valores de actividad NR que se indican en el capítulo de Resultados corresponden a 60 min de incubación, tiempo durante el cual la liberación de nitrito al medio fue lineal. La producción de nitrito se determinó

en alícuotas de 0.5 ml mediante la reacción de diazotación descrita por Hageman y Hucklesby (12), midiéndose la absorbancia a 540 nm después de 20 min de la adición de los reactivos. En ensayos paralelos, la actividad NR también se determinó en mezclas de incubación carentes de  $\text{NO}_3\text{K}$  (ensayos *in vivo* -  $\text{NO}_3$ ). Estos ensayos están directamente relacionados con los niveles internos de nitrato y se consideran como la mejor determinación de la capacidad de un tejido para reducir nitrato *in situ* (13, 21). Los ensayos de actividad NR en presencia de nitrato se consideran indicadores de la capacidad de un tejido vegetal para reducir nitrato cuando el sustrato no es limitante, y se relacionan con la actividad NR medida *in vitro* (1, 6, 25).

La actividad NR total de la planta se calculó multiplicando la actividad/g peso fresco de cada órgano por el peso fresco total de cada órgano analizado.

Todos los experimentos se realizaron a los 45 días después de la imbibición de las semillas. El contenido en nitrógeno reducido total se determinó mediante análisis Kjeldahl.

#### RESULTADOS

En el Cuadro 1 se presentan los resultados correspondientes a la actividad nitrogenasa de las razas U226 y T1 de *R. loti* en simbiosis con plantas de *L. corniculatus* var. Ganador. No se observaron diferencias significativas en los valores de reducción de acetileno a etileno entre ambas razas. En los dos casos, la adición de 5 mM de  $\text{KNO}_3$  a la solución mineral nutritiva disminuyó la actividad nitrogenasa entre un 75% y un 72% para las razas U226 y T1, respectivamente (Cuadro 1).

Para establecer la presencia o ausencia de actividad hidrogenasa, se determinó la capacidad de incorpora-

Cuadro 1. Actividad nitrogenasa de las razas U226 y T1 de *R. loti* en simbiosis con *L. corniculatus* var. Ganador. Las plantas se trataron o no con 5 mM de  $\text{NO}_3\text{K}$ . Los valores representan la media  $\pm$  SE de seis repeticiones.

Raza de <i>Rhizobium</i>	Actividad nitrogenasa ( $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{g}$ peso seco de nódulo)	
	Plantas - $\text{KNO}_3$	Plantas + $\text{KNO}_3$
	U226	8.2 $\pm$ 0.6
T1	8.7 $\pm$ 0.6	2.4 $\pm$ 0.5

SL: error estándar

ción de  $\text{H}_2$  por los bacteroides aislados de los nódulos formados por las razas U226 y T1. En ningún caso, los bacteroides fueron capaces de utilizar hidrógeno como aceptor final de electrones, según los resultados obtenidos por la técnica amperométrica empleada en este estudio. En estos experimentos se utilizó como control positivo una suspensión de bacteroides de *Bradyrhizobium japonicum*, raza 311b122 (fenotipo Hup<sup>+</sup>, 17).

En el Cuadro 2 se indican los valores de actividad NR de las hojas, tallos, raíces y nódulos de *L. corniculatus* cuando las plantas crecieron en ausencia de nitrato. En plantas inoculadas con la raza U226 no se encontraron diferencias significativas en la actividad de los diferentes tejidos vegetales utilizados, independientemente de la presencia o ausencia de  $\text{NO}_3\text{K}$  en las mezclas de incubación. Sin embargo, en plantas inoculadas con la raza T1, la actividad NR de tallos y nódulos fue superior cuando las mezclas de incubación contenían  $\text{NO}_3\text{K}$ . No se observaron diferencias en hojas y raíces cuando la actividad NR se ensayó en presencia y en ausencia de  $\text{NO}_3\text{K}$ . La actividad NR de las hojas, tallos, raíces y nódulos de las plantas inoculadas con la raza T1 fue, en todos los casos, superior a la de las plantas inoculadas con la raza U226 (Cuadro 2).

Cuando las plantas fueron tratadas con  $\text{NO}_3\text{K}$  (Cuadro 2), la actividad NR de los distintos tejidos vegetales fue superior a las encontradas cuando las plantas crecieron dependiendo exclusivamente de la fijación de  $\text{N}_2$  (Cuadro 2).

Cuadro 2. Actividad nitrato reductasa de hoja, tallo, raíz y nódulo de *L. corniculatus*, var. Ganador, en simbiosis con las razas U226 y T1 de *R. loti*. Las plantas crecieron en ausencia de  $\text{KNO}_3$ . Los ensayos de actividad NR se realizaron en presencia y en ausencia de 50 mM de  $\text{KNO}_3$  en las mezclas de incubación. Los valores representan la media  $\pm$  SE de tres repeticiones.

Raza de <i>Rhizobium</i>	Mezcla de incubación	Actividad nitrato reductasa ( $\text{nmol NO}_2^-/\text{g}$ peso fresco)			
		Hoja	Tallo	Raíz	Nódulo
U226	- $\text{KNO}_3$	24 $\pm$ 2	24 $\pm$ 3	23 $\pm$ 3	12 $\pm$ 2
U226	+ $\text{KNO}_3$	24 $\pm$ 1	25 $\pm$ 3	25 $\pm$ 3	10 $\pm$ 1
T1	- $\text{KNO}_3$	46 $\pm$ 3	34 $\pm$ 4	42 $\pm$ 5	35 $\pm$ 5
T1	+ $\text{KNO}_3$	45 $\pm$ 4	50 $\pm$ 7	39 $\pm$ 5	54 $\pm$ 6

SL: error estándar

Cuadro 3. Actividad nitrato reductasa de hoja, tallo, raíz y nódulo de *L. corniculatus* var. Ganador, en simbiosis con las razas U226 y T1 de *R. loti*. Las plantas se trataron con 5 mM de  $\text{KNO}_3$ . Los ensayos de actividad se realizaron en presencia y en ausencia de 50 mM de  $\text{KNO}_3$  en las mezclas de incubación. Los valores representan la media  $\pm$  SE de tres repeticiones.

Raza de <i>Rhizobium</i>	Mezcla de incubación	Actividad nitrato reductasa ( $\text{nmol NO}_2^-/\text{g}$ peso fresco)			
		Hoja	Tallo	Raíz	Nódulo
U226	- $\text{KNO}_3$	112 $\pm$ 7	656 $\pm$ 16	577 $\pm$ 31	121 $\pm$ 14
U226	+ $\text{KNO}_3$	118 $\pm$ 10	746 $\pm$ 28	573 $\pm$ 30	187 $\pm$ 12
T1	- $\text{KNO}_3$	160 $\pm$ 12	744 $\pm$ 31	580 $\pm$ 29	144 $\pm$ 13
T1	+ $\text{KNO}_3$	163 $\pm$ 16	817 $\pm$ 35	576 $\pm$ 27	207 $\pm$ 16

SE: error estándar

La actividad NR de las raíces fue similar en plantas inoculadas con las razas U226 y T1, tanto en presencia como en ausencia de  $\text{NO}_3\text{K}$  en las mezclas de incubación (Cuadro 3)

En hojas, tallos y nódulos, la actividad NR fue superior en las plantas inoculadas con la raza T1, respecto a las inoculadas con la raza U226 (Cuadro 3). Independientemente de la raza empleada para la inoculación, la actividad NR de las hojas y raíces fue similar en presencia y en ausencia de  $\text{NO}_3\text{K}$  en las mezclas de incubación. Sin embargo, la actividad de los tallos y nódulos fue superior cuando las determinaciones se realizaron en mezclas de incubación que contenían  $\text{NO}_3\text{K}$  (Cuadro 3)

En el Cuadro 4 se muestran los datos correspondientes a la distribución de la actividad NR total en plantas de *L. corniculatus* tratadas con y sin nitrato. En plantas crecidas en ausencia de  $\text{NO}_3\text{K}$ , la actividad NR se distribuyó en el orden siguiente: hojas > tallo > raíz > nódulo. Sin embargo, la adición de  $\text{NO}_3\text{K}$  disminuyó la actividad NR de las hojas en un 32%, al mismo tiempo que se incrementó la del tallo en un 82% y la de la raíz en un 40%

El contenido en nitrógeno total reducido de plantas de *L. corniculatus* inoculadas con las razas U226 y T1 de *R. loti* se presentan en el Cuadro 5. La inoculación con la raza T1 aumentó la cantidad de este elemento alrededor del 40% con respecto a las plantas inoculadas con la raza U226.

#### DISCUSION

En *Rhizobium loti* se ha demostrado que la capacidad de algunas razas para formar simbiosis efectivas está relacionada con su resistencia a las flavonas (19,

20). Las razas U226 y T1 utilizadas en este estudio fueron capaces de formar nódulos activos como lo indican los datos de actividad de reducción de acetileno a etileno que se presentan en el Cuadro 1

No se detectó actividad hidrogenasa en ninguna de las dos razas estudiadas. En este sentido, las razas U226 y T1 se comportan como las razas, hasta ahora estudiadas, de *R. trifolii*, *R. meliloti* y *R. phaseoli*, donde no se ha puesto de manifiesto la capacidad de oxidar el  $\text{H}_2$  producido por la nitrogenasa (11). Estos mismos autores han presentado datos sobre la distribución de la presencia de actividad hidrogenasa en diversas especies de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (11). Sin embargo, la posibilidad de que las razas U226 y T1 puedan expresar dicha actividad, no debe

Cuadro 4. Distribución de la actividad nitrato reductasa total en plantas de *L. corniculatus* var. Ganador, en simbiosis con las razas U226 y T1 de *R. loti*. Las plantas se trataron o no con 5 mM de  $\text{KNO}_3$ . Los ensayos de actividad se realizaron en presencia y en ausencia de 50 mM de  $\text{KNO}_3$  en las mezclas de incubación. Los valores representan el porcentaje de actividad correspondiente a cada tejido vegetal y son la media de las actividades obtenidas en cada una de las simbiosis establecidas.

Tratamiento	Mezcla de incubación	Actividad nitrato reductasa (%)			
		Hoja	Tallo	Raíz	Nódulo
Plantas - $\text{KNO}_3$	- $\text{KNO}_3$	44	30	23	3
Plantas - $\text{KNO}_3$	+ $\text{KNO}_3$	46	27	21	6
Plantas + $\text{KNO}_3$	- $\text{KNO}_3$	15	51	32	2
Plantas + $\text{KNO}_3$	+ $\text{KNO}_3$	14	53	30	3

eliminarse ya que las plantas hospedadoras pueden alterar la expresión de la actividad hidrogenasa del microsimbionte (4)

Los datos del Cuadro 2 indican que las hojas, tallos, raíces y nódulos de las plantas de *L. corniculatus* que crecieron dependiendo exclusivamente de la fijación de  $N_2$  acumularon nitrito en el medio. Estos ensayos *in vivo* demostraron, además, que los diferentes tejidos vegetales de las plantas inoculadas con la raza T1 expresaron mayor actividad NR que los de las plantas inoculadas con la raza U226, tanto en presencia como en ausencia de nitrato en las mezclas de incubación. Otros autores también han encontrado acumulación de nitrito en tejidos vegetales de plantas de *Glycine*, *Medicago* y *Phaseolus* cuando se cultivaron en ausencia de nitrato (24, 25, 26).

La mayor capacidad para reducir nitrato de los tejidos de las plantas inoculadas con la raza T1, respecto a las inoculadas con la raza U226, también se puso de manifiesto cuando las plantas fueron tratadas con nitrato, excepto en el caso de la raíz (Cuadro 3). La NR de raíz es inducible por sustrato (5) y por tanto, es posible que esta ausencia de diferencias sea debida a que el nivel de inducción de la enzima fue similar en las raíces de las plantas inoculadas con las razas T1 y U226.

Hay que señalar, por otra parte, que tanto en plantas inoculadas con la raza T1 como con la U226, la actividad NR de hoja encontradas en los ensayos +  $NO_3^-$  fue similar a la de los ensayos -  $NO_3^-$  (Cuadro 3). Este hecho sugiere que, en las condiciones experimentales empleadas, bien el nitrato o el poder reductor actuó como factor limitante. Nuestros resultados parecen indicar que el factor limitante fue el nitrato ya que la presencia de éste en la solución mineral donde crecieron las plantas, disminuyó la proporción de actividad NR de hoja en un 32% respecto a la de las plantas crecidas en ausencia de nitrógeno combinado (Cuadro 4). Estos datos indican que, en presencia de nitrato, la mayoría de la actividad NR se localiza en el tallo y no en las hojas, como ocurrió cuando las plantas crecieron en ausencia de nitrato. Por lo tanto, aunque el nitrato sea absorbido por la raíz, en su mayor parte fue exportado vía xilema hasta el tallo donde ocurrió su reducción. Consecuentemente, el nitrato disponible para ser reducido en las hojas disminuyó drásticamente. La importancia del tallo por su

contribución al metabolismo nitrogenado de las leguminosas ha sido puesto de manifiesto recientemente (1, 2, 27). Estos mismos autores (1) han comprobado, respecto al metabolismo del nitrato, que las leguminosas de origen templado se caracterizan porque, en presencia de nitrato, la proporción de actividad NR correspondiente al tallo, en relación con la actividad NR total de la planta, se incrementa considerablemente respecto a la de la raíz. Sin embargo, las leguminosas de origen tropical se caracterizan porque la proporción de actividad NR en tallo y raíz es relativamente independiente de la fertilización nitrogenada.

En *L. corniculatus*, la presencia de nitrato disminuyó la proporción de actividad NR de hoja y aumentó la de tallo y raíz. Este incremento fue mayor en el tallo (82%) que en la raíz (41%) (Cuadro 4). Hay que tener en cuenta, sin embargo, que la distribución de actividad NR de los diferentes tejidos vegetales puede ser alterada tanto por el genotipo de la leguminosa hospedadora como por la inoculación con *Rhizobium* (18). Esto podría explicar por qué otros autores encontraron que la capacidad de reducir nitrato en *L. corniculatus* se encontraba fundamentalmente en la raíz de plantas no noduladas (18).

Aunque de los resultados de este estudio puede concluirse que la inoculación con la raza T1 de *R. loti* incrementó la actividad NR y el contenido en nitrógeno (Cuadro 5) de *L. corniculatus*, respecto a las inoculadas con la raza U226, son necesarios posteriores estudios de tipo agronómico para comprobar la superioridad de la raza T1 en condiciones de cultivos naturales.

Cuadro 5. Efecto de la inoculación con las razas U226 y T1 sobre el contenido en nitrógeno (N) total reducido de plantas de *L. corniculatus* var. Ganador. Los valores representan la media  $\pm$  SE de tres repeticiones.

Raza de <i>R. loti</i>	Contenido en N (%)
U226	3.19 $\pm$ 0.06
T1	4.48 $\pm$ 0.08

SE: error estándar.

## LITERATURA CITADA

1. ANDREWS, M. 1986. The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants. *Plant and Cell Environment* 9:511-519.
2. ANDREWS, M.; SUTHERLAND, J.M.; SPRENT, J.I. 1984. Distribution of nitrate reductase activity in six legumes: the importance of the stem. *The New Phytologist* 98:301-310.
3. BEDMAR, E.J.; OLIVARES, J. 1980. Effect of chemical inhibitors of photorespiration on nitrogenase activity in nodulated alfalfa plants. *Planta* 150: 299-302.
4. BEDMAR, E.J.; EDIÉ, S.D.; PHILLIPS, D.A. 1983. Host cultivar effect on hydrogen evolution by *Rhizobium leguminosarum*. *Plant Physiology* 72: 1011-1015.
5. BEEVERS, L.; HAGEMAN, R.H. 1983. Uptake and reduction of nitrate: bacteria and higher plants. In *Encyclopedia of Plant Physiology* Ed by A. Pirson and M.H. Zimmermann. Berlin, Springer-Verlag. p. 351-375.
6. BRUNETTI, N.; HAGEMAN, R.H. 1976. Comparison of in vivo assays of nitrate reductase in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings. *Plant Physiology* 58: 583-587.
7. BURNS, R.C.; HARDY, R.W.F. 1975. Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. New York, Springer-Verlag. p. 121-132.
8. DIXON, R.O.D. 1968. Hydrogenase in pea root nodule bacteroids. *Archives of Microbiology* 62:272-283.
9. DIXON, R.O.D. 1972. Hydrogenase in legume root nodule bacteroids: occurrence and properties. *Archives of Microbiology* 85:193-201.
10. EMERICH, D.W.; RUIZ-ARGÜESTO, I.; CHING, M.T.; EVANS, H.J. 1979. Hydrogen-dependent nitrogenase activity and ATP formation in *Rhizobium japonicum* bacteroids. *Journal of Bacteriology* 137: 153-160.
11. EVANS, H.J.; HARKER, A.R.; PAPAN, H.; RUSSELL, S.A.; HANUS, J.F.; ZUBER, M. 1987. Physiology, biochemistry and genetics of the uptake hydrogenase in rhizobia. *Annual Review of Microbiology* 41:355-361.
12. HAGEMAN, R.H.; HUCKLESBY, D.D. 1971. Nitrate reductase from higher plants. *Methods in Enzymology*. Ed. by A. San Pietro. New York Academic Press. p. 491-503.
13. HUNTER, W.J. 1983. Soybean root and nodule nitrate reductase. *Physiologia Plantarum* 59:471-475.
14. JARVIS, B.D.W.; PANKHURST, C.E.; PATEL, J.J. 1982. *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 32:378-380.
15. LIGERO, F.; LLUCH, C.; OLIVARES, J.; BEDMAR, E.J. 1987. Nitrate reductase activity of pea inoculated with hydrogenase positive and hydrogenase negative strains of *Rhizobium leguminosarum*. *Physiologia Plantarum* 69:313-316.
16. LOPEZ, M.; CARBONERO, V.; CABRERA, E.; RUIZ-ARGÜESTO, T. 1981. Effects of host on the expression of H<sub>2</sub>-up-take hydrogenase of *Rhizobium* in legume root nodules. *Plant Science Letters* 29:191-199.
17. MAIER, R.J.; CAMPBELL, N.E.R.; HANUS, F.J.; SIMPSON, F.B.; RUSSELL, S.A.; EVANS, H.J. 1978. Expression of hydrogenase activity in free-living *Rhizobium japonicum*. *Proceedings of the National Academy of Science (USA)* 75:3258-3262.
18. MELLOR, G.E.; SHEARD, R.W. 1971. Comparison of the nitrate reductase in orchardgrass and birdsfoot trefoil. *Canadian Journal of Plant Science* 51:399-404.
19. PANKHURST, C.E.; JONES, W.T. 1979. Effectiveness of *Lotus* root nodules II. Relationship between root nodule effectiveness and in vitro sensitivity of fast-growing *Lotus* rhizobia to flavolans. *Journal of Experimental Botany* 30:1099-1107.
20. PANKHURST, C.E.; JONES, W.T.; CRAIG, A.S. 1982. Bactericidal effect of *Lotus pedunculatus* root flavolan on fast-growing *Lotus* rhizobia. *Journal of General Microbiology* 128:1567-1576.
21. RADIN, J.W. 1978. A physiological basis for the division of nitrate assimilation between roots and leaves. *Plant Science Letters* 13:21-25.
22. RIGAUD, J.; PUPPO, A. 1975. Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacteroids. *General Journal of Microbiology* 88:223-228.
23. SICARDI DE MALLORCA, M.; LABANDERA, C. 1979. Control de calidad de los inoculantes comerciales para leguminosas en Uruguay (1963-1975). Montevideo, (Uru.) Ministerio de Agricultura y Pesca. p. 1-17. (Boletín Técnico no. 1).
24. STREETER, J.G. 1982. Synthesis and accumulation of nitrite in soybean nodules supplied with nitrate. *Plant Physiology* 69:1429-1434.
25. TIMPO, E.E.; NEYRA, C.A. 1983. Expression of nitrate and nitrite reductase under various forms of nitrogen nutrition in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology* 72:71-75.
26. VANCE, C.P.; HEICHEL, G. 1981. Nitrate assimilation during vegetative regrowth of alfalfa. *Plant Physiology* 68:1052-1056.
27. WALLACE, W. 1986. Distribution of nitrate assimilation between the root and shoot of legumes and a comparison with wheat. *Plant Physiology* 66:630-636.