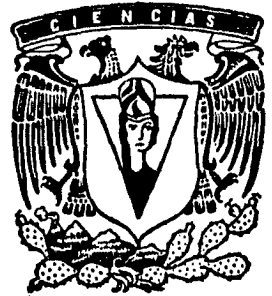




UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Ciencias



DETECCION Y PURIFICACION PARCIAL DE LA
LEGHEMOGLOBINA DE Crotalaria pumila, Ort.
(LEGUMINOSEAE).

T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a :

RAUL ARREDONDO PETER



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE.

Agradecimientos.....	1
Abreviaturas.....	2
I. Resumen.....	3
II. Antecedentes.....	4
III. Objetivos.....	21
IV. Materiales y Métodos.....	23
V. Resultados.....	30
VI. Discusión y Conclusiones.....	38
VII. Apéndices.....	43
VIII. Referencias.....	58

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS.

Quiero agradecer de manera muy especial a la Dra. Elena Irma Villareal Moguel, al Dr. Jesús Manuel León-Cázares y al M. en C. Miguel Angel Villavicencio Nieto, el gran apoyo y la orientación que me han brindado, sin los cuales el presente trabajo no se hubiera podido desarrollar.

Agradezco al Dr. José Edgardo Escamilla Marván, la Biól. María Teresa Peña Rangel y al Biól. Luis Felipe Jiménez García, por su valiosa cooperación en la revisión crítica del escrito y las sugerencias hechas para mejorar el mismo.

A todos aquellos que de una u otra manera colaboraron con el desarrollo de este trabajo.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS.

- \AA - Angstroms (10^{-10} m).
 $A_{(280)}$ - Absorbancia detectada a 280 nm.
 $A_{(D0)}$ - Detección de absorbancia, unidades en Densidad Optica.
 AIA - Acido Indolacético.
 ASB - Albúmina Sérica de Bovino.
 d - Daltones.
 DDSA - Dadocetil Succínico Anhidro.
 H_2O_2 - Peróxido de Hidrógeno.
 Kb - Kilobases (10^3 bases).
 $K_3Fe(CN)_6$ - Ferricianuro de Potasio.
 λ - Longitud de Onda (nm).
 Lb - Leghemoglobina.
 μm - Micrómetro (10^{-6} m).
 NAD^+ - Nicotinamin de Adenin Dinucleótido Oxidado.
 $NADH$ - Nicotinamin de Adenin Dinucleótido Reducido.
 $Na_2S_2O_4$ - Hidrosulfito de Sodio o Ditionita.
 $(NH_4)_2SO_4$ - Sulfato de Amonio.
 nm - nanómetro (10^{-9} m).
 NMA - Nádico Metil Anhidro.
 O_2^- - Anión Superóxido.
 pb - Pares de Bases.
 $ppCO$ - Presión Parcial de CO .
 ppO_2 - Presión Parcial de O_2 .
 $R_{560/620}$ - Cociente de la absorbancia dada a 560 y 620 nm.
 R_f - Velocidad de Flujo (Range of Flow).
 SOD - Superóxido Dismutasa.

R E S U M E N

I. RESUMEN.

La Lb es una proteína que forma parte de la familia de proteínas conocidas como globinas, y las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en el reino animal; por su parte, en el reino vegetal, la Lb es el primer y único caso concluyentemente demostrado de la presencia de una globina en este reino, donde es casi exclusiva de Leguminosas, y está intrínsecamente relacionada con el proceso de la Fijación Biológica de Nitrógeno. El incremento en el estudio de esta proteína puede ayudar a resolver algunas interrogantes planteadas.

El presente trabajo se llevó a cabo con nódulos radicales de Crotalaria pumila, Ort., los cuales fueron homogenizados; la solución resultante fué precipitada con sulfato de amonio al 80% y tratada con ferricianuro de potasio para eliminar el ácido nicotínico endógeno, entonces, la solución fué filtrada por una columna de Sephadex G-10 y determinado el R. 560/620 de la fracción proteica; posteriormente, esta fracción fué filtrada a través de una columna de DEAE-Celulosa y el eluido monitoreado a 280 y 546 nm. La Lb fué detectada y cuantificada por el método de piridina-hemocromo.

Los resultados obtenidos permiten establecer que, de manera general, la Lb de Crotalaria pumila, Ort. presenta algunas características semejantes a las Lb's ya reportadas, como es el polimorfismo típico de este grupo de proteínas, aunque, sin embargo, presente algunas diferencias, principalmente en el perfil de elución en la DEAE-Celulosa, lo que conduce a una serie de inferencias y alternativas de investigación.

A N T E C E D E N T E S

II. ANTECEDENTES.

IIa. GENERALIDADES SOBRE LAS GLOBINAS.

El término globina incluye a un grupo de proteínas muy relacionadas entre sí y con la función común de almacenar y transportar oxígeno, las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en el reino animal, donde abarcan tanto a grupos de invertebrados como de vertebrados. Entre los primeros son abundantes en Anélidos, se encuentran en la mayoría de los Poliquetos y muchos Oligoquetos; también en otros Phyla tales como Platelminfos, Nemertinos, Nematelminfos, Moluscos, Equinodermos Holotúridos, Equiuroideos y Sipuncúlidos, y unos cuantos Crustaceos e Insectos, entre otros. En vertebrados su presencia es prácticamente universal. Además, se ha reportado su existencia en niveles bajos en la escala filogenética, como los Hongos, Levaduras y Protozoarios, lo cual, como se verá mas adelante, es de gran importancia desde el punto de vista evolutivo (Keilin y Tissieres, 1954, en Fox, 1976).

El inicio del estudio comparativo en diferentes organismos de la estructura tridimensional de las globinas debe ser asignado al trabajo de Reichert y Brown de 1909 (Lesk y Chothia, 1980), quienes investigaron la variación evolutiva de los ejes axiales de los cristales de hemoglobinas aislados de especies diferentes. Pero el estudio verdadero de la relación entre la secuencia y la estructura, necesariamente tuvo que esperar a la aplicación de la cristalografía de rayos-X a las proteínas por Zuckerkandl y Pauling en 1965.

Los análisis de la estructura cristalina han permitido dilucidar, a nivel de resolución atómica, la estructura para 11 globinas. Estas son, las cadenas alfa y beta de las hemoglobinas huma-

nas y de caballo, la subunidad gamma de la hemoglobina humana fetal, la mioglobina del esperma de ballena, las hemoglobinas monoméricas de la lamprea marina y el anélido Glicera dibranchata, una eritrocruorina de la larva del insecto Chironomus thummi, y la leghemoglobina de los nódulos de las raíces del Lupino amarillo (Lesk y Chothia, 1980).

Estas 11 moléculas tienen secuencias de aminoácidos muy diferentes pero estructuras secundaria y terciaria muy semejantes. Son comunes a todas ocho hélices marcadas como A, B, C, D, E, F, G y H, excepto para cuatro estructuras que carecen de la hélice D. Las hélices se presentan en un patrón común, que encierran al grupo hemo en receptáculos de geometría similar, formados de porciones homólogas de las moléculas, con una simetría en espejo.

La estructura secundaria de las globinas tiene una serie de regiones helicoidales, contiguas en algunos casos, pero separadas por vueltas en otras. No hay una manera clara de decidir exactamente donde se inicia una hélice y donde termina, ya que las terminales de las hélices están a menudo distorsionadas, lo que las aparta de la geometría ideal de la hélice. Lesk y Chothia (1980) basaron su criterio en la descripción original de la estructura, en la geometría de los puentes de hidrógeno entre péptidos y en el examen de la conformación molecular, facilitada por modelos generados por computadora. Ellos consideran que cualquier aminoácido puede formar parte de la hélice, si participa razonablemente bien en el patrón de puentes de hidrógeno de la hélice, sea como donador o como aceptor.

La estructura de las globinas muestra homología en sus secuen-

cias secundarias: las hélices están formadas en su mayor parte de residuos homólogos en las porciones comunes de las secuencias alineadas. Excepto en sus terminales, las regiones helicoidales no están sujetas a inserciones y deleciones. Las deleciones de más de dos residuos se encuentran en las siguientes hélices: desoxihemoglobina humana normal subunidad alfa (D en H-Hb_a), desoxihemoglobina humana normal subunidad beta (H-Hb_b), methemoglobina de caballo subunidad beta (E-Hb_p), metmioglobina del esperma de ballena Physeter catodon (SW-Mb), cianohemoglobina de la lamprea marina Petromyzon marinus (L-Hb), carbomonoxihemoglobina del anélido Glycera dibranchata (G-Hb) y leghemoglobina de los nódulos de las raíces de Lupinus luteus, L. (Lb-Hb); el inicio de B en la eritrocruorina de la larva del insecto Chironomus thummi (C-Er) y el inicio de H en Lb-Hb. E en Lb-Hb es aproximadamente cinco residuos más larga que E en otras globinas.

Por otro lado, el grupo prostético de las globinas, el hemo, es una porfirina que contiene hierro con ocho substituyentes, dos grupos de ácido propiónico, dos grupos vinilo y cuatro metilos. Los dos grupos de ácido propiónico distinguen una zona hidrofílica única y la distribución asimétrica de los grupos vinilo y metilo rompen con la simetría de espejo.

La cadena polipeptídica de cada globina forma un receptáculo dentro del cuál se acomoda el hemo, con solo la orilla hidrofílica expuesta al medio. El átomo de hierro del hemo forma un enlace covalente con el N-E2 de una His en posición 109 de la hélice F; en algunas estructuras uno o ambos ácidos propiónicos forman enlaces de hidrógeno con un lado de la cadena del polipéptido. La por

ción no polar del hemo interactúa con el polipéptido por medio de interacciones hidrofóbicas.

La figura 1 muestra el arreglo espacial de estas regiones alrededor del hemo. En términos de la orientación del hemo, en la parte (a) de esta figura, la hélice F y la esquina FG cubren casi toda la parte superior del grupo hemo; la hélice G cubre un costado del hemo en la región del anillo 3, el final de la hélice C, la región opuesta de la última. Adyacente al hierro del hemo hay una cavidad donde se pueden acomodar ligandos. El residuo de His en la posición 75 en la hélice E, o Leu en G, actúan como una puerta de entrada en esta cavidad (Marimoto et al., 1971, en Lesk y Chothia, 1980). Como resultado de las posiciones relativamente diferentes de la hélice F, en la H-Hb_a y b, E-Hb_a y b, y Lb-Hb, también forman enlaces con la parte superior del hemo dos residuos de la hélice H.

IIb. HISTORIA DE LA LEGHEMOGLOBINA.

En 1940, Allison y col. (Fox, 1976) concluyeron que la respiración de los nódulos radicales de la Soya, estaba restringida a la concentración atmosférica normal de oxígeno; aproximadamente al mismo tiempo, Kubo (1939, en Fox, 1976) descubrió que el color rosa de los nódulos de la Soya y otras Leguminosas fijadoras de nitrógeno, era debido a un pigmento soluble; es decir, no unido a membranas, semejante a la hemoglobina, y concluyó que estas hemoglobinas estaban relacionadas con el consumo de oxígeno en los nódulos. Posteriormente, Keilin y Wang (1945, en Fox, 1976), determinaron que el contenido de hemina de sus preparaciones, estima-

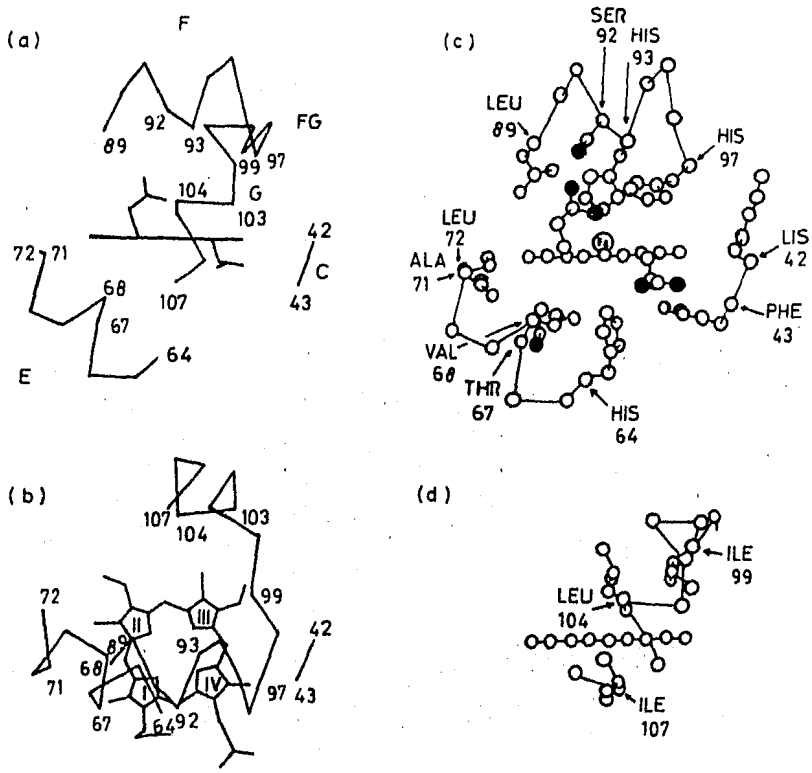


Fig.1. Estructura del empaque del hemo de la mioglobina del esperma de ballena. (b), Vista superior del hemo a través de la hélice F. Note. la distribución asimétrica sobre la porfirina de los grupos propiónico, vinil y metil. (a), Vista dentro del empaque del hemo. (c), Empaque de los residuos de las hélices C, E y F alrededor del grupo hemo. (d), Empaque de la hélice G contra la parte posterior del hemo. (Tomado de Lesk y Chothia, 1980).

das como piridina- hemocromógeno, contitúan aproximadamente el 2 % del peso seco de los nódulos, y que el intenso color rojo de su solución exhibía todas las características espectrales y reacciones químicas de una hemoglobina. La identificación de ésta hemoglobina nodular, actualmente denominada Leghemoglobina, es la primera demostración de la presencia de una proteína de tipo globina en una planta, aunque otros hemo derivados tales como la catalasa y el citocromo hayan sido conocidos tiempo atrás en el reino vegetal (Fox, 1976; Bergersen et al., 1979).

IIc. ESTRUCTURA DE LA LEGHEMOGLOBINA.

Las Lb's son hemoproteínas con un peso molecular de 15 a 17000 d, que contienen un Protohemo IX como grupo prostético. Las características principales de la estructura de la Lb_a de la Soya, a una resolución de 3.3 Å, concuerdan con las descritas para otras hemoglobinas monoméricas (tabla I), con la excepción de la carencia de un segmento helicoidal. La molécula es un elipsoide aplanado con ejes principales de 40, 47 y 25 Å de longitud aproximadamente. Hay siete segmentos helicoidales que representan el 77 % de la estructura, y se encuentran arreglados en el ya bien conocido plegamiento de la mioglobina. El hemo está comprendido en una cavidad hidrofóbica, mantenido por residuos de las hélices B, C, E, F, G y H, y la molécula en su totalidad se encuentra formada por aproximadamente 145 residuos de aminoácidos, este número varía de acuerdo al tipo y la especie a la cuál corresponda (Ollis et al., 1983).

Tabla I.

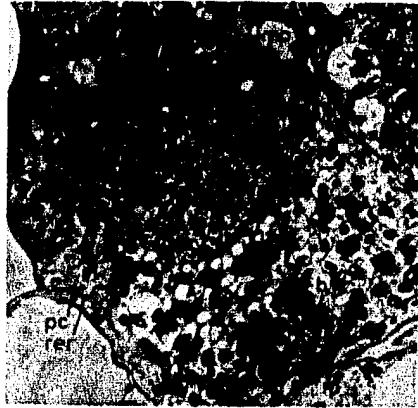
Comparación de algunas características comunes entre una Globina de origen animal, la Mioglobina, y una de origen vegetal, la Leghemoglobina.

	LOBINA VEGETAL	LOBINA ANIMAL
	LEGHEMOGLOBINA	MIOGLOBINA
UBICACION	Nódulos Radiculares	Tejido Muscular
FUNCION	Acarrear y Almacenar O ₂	Almacenar O ₂
NATURALEZA	Monómero (polimórfico)	Monómero (monomórfico)
PESO MOLECULAR	15 a 17,000 d	17,000 d
No. RESIDUOS A. A.	145 aproximadamente	150 aproximadamente
GPO. PROSTETICO	Fe - Hemo	Fe - Hemo
No. DE HELICES	7 (A,B,C,E,F,G,H)	8 (A,B,C,D,E,F,G,H)
DIMENSIONES	40 x 47 x 25 Å	40 x 35 x 25 Å
CONF. α-HELICOIDAL	77 %	75 %
No. DE EXONES	4	3
No. DE INTRONES	3	2

IIa. FUNCION DE LA LEGHEMOGLOBINA.

La presencia de la Lb en tejidos radicales fijadores de nitrógeno se encuentra bien establecida. Los nódulos radicales fijadores de nitrógeno se forman como respuesta a la infección por bacterias del género Rhizobium, las cuales proliferan dentro de las células vegetales del nódulo en desarrollo, como se observa en la figura 2 (las electromicrografías son material original, para su preparación referirse a la sección de Mat. y Mét. y al Apéndice 5). Estas bacterias al modificarse para la vida simbiótica son llamados bacteroides. Dentro del nódulo, la fijación de nitrógeno atmosférico, y su conversión en amoníaco, se lleva a cabo por un complejo enzimático denominado Nitrogenasa, el cuál se encuentra dentro de los bacteroides. Este complejo enzimático es destruido por trazas de oxígeno, pero al mismo tiempo la actividad nitrogenasa de los bacteroides intactos depende del suministro de ATP, formado seguramente por la fosforilación oxidativa bacteriana. La fijación de nitrógeno en el nódulo intacto es deficiente en presencia de oxígeno y se incrementa en respuesta a un aumento en la presión ambiental del mismo. La presión promedio de este elemento en las células del tejido central de los nódulos de la Soya se estima en 0.01 mmHg aproximadamente, y se mantiene en este nivel por un vigoroso consumo de oxígeno, de lo cuál los bacteroides son los principales responsables. Una paradoja de la función del nódulo radical, la cuál requiere de una explicación, es, como se sostiene el gran flujo de oxígeno, mientras que la presión de él dentro de los bacteroides se mantiene a tan bajo nivel, y la relación que tiene esto con las tasas de fijación de nitrógeno (Witteberg, 1974).

A



B

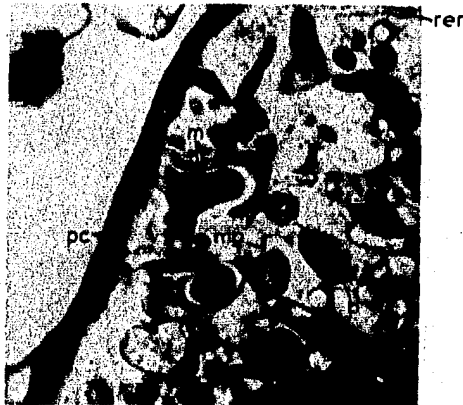


Fig. 2. Micrografías al microscopio electrónico de células nodulares de *Phaseolus vulgaris*, L. infectadas por *Rhizobium phaseoli*. (A), vista general del grado de infección del citoplasma de la célula vegetal. 1795 X. (B), desplazamiento de los organelos hacia la periferia de la célula por los bacteroides. 7500 X. (b), bacteroide, (mp), membrana peribacteroidal, (m), mitocondria, (n), núcleo, (pc), pared celular, (rer), retículo endoplásmico rugoso. Los aumentos corresponden a los originales del microscopio electrónico.

Se han propuesto diversos papeles fisiológicos para explicar la relación observada entre la concentración de Lb y la fijación de nitrógeno. La Lb no juega un papel directo en el sistema fijador de nitrógeno, sin embargo, se ha sugerido que pudiera actuar facilitando la difusión de oxígeno en el tejido nodular con la baja ppO_2 existente en este tejido denso. La producción de ATP para la fijación de nitrógeno por los nódulos radicales parece estar limitada por las concentraciones atmosféricas de oxígeno. Este papel propuesto para la Lb podría ser similar al de la difusión facilitada del oxígeno en las fibras musculares de mamíferos por la mioglobina (Bergersen et al., 1973).

Se ha demostrado en experimentos realizados con nódulos intactos, la presencia de una vía sensible al CO por medio de niveles bajos de $ppCO$. Estas fueron efectivas en inhibir la incorporación de oxígeno al sistema, e indican la presencia de elementos con alta afinidad por el CO, y se sabe que únicamente la Lb tiene esta propiedad. Otros elementos posibles en la célula son mucho menos sensibles al CO. Además, en estos ensayos, y en los realizados con suspensiones de bacteroides, la Lb estimuló la reducción del acetileno por estas suspensiones; se consideró como responsable de esto no al incremento de la transferencia o activación del acetileno, ya que primeramente, no hay evidencias del espectro de absorción que demuestre la unión de éste a la Lb; segundo, el acetileno es aproximadamente 33 veces más soluble que el oxígeno, y los intervalos de incorporación del último son mucho mayores que los intervalos de reducción de acetileno; tercero, la observación espectroscópica sugiere una correlación entre el grado de oxigena

ción de la Lb y los intervalos de reducción de acetileno en ensayos con bacteroides. Por lo tanto, se ha concluido que la Lb funciona, en nódulos intactos, por medio de su capacidad para captar y liberar el oxígeno a bajas concentraciones (Bergersen, et al., 1973).

Los ensayos realizados con suspensiones de bacteroides, en los que se detectó la tasa de reducción de acetileno y la incorporación de oxígeno, en que se tuvo como transportadores de este elemento diferentes tipos de globinas, han mostrado que la Lb presenta uno de los valores más afines hacia el oxígeno ($P_{50} = 0.04$ mmHg) y como consecuencia una alta eficacia funcional en el sistema (Wittenberg, 1974). Además, se han encontrado fuertes evidencias que indican que la Lb es sintetizada antes que el complejo nitrogenasa activo sea detectable. En nódulos radicales de Chicharos, la síntesis de Lb siempre precede la reducción de acetileno (Bisseling et al., 1980).

IIe. FIJACION DE LIGANDOS POR LA LEGHEMOGLOBINA.

Como se ha encontrado con otras hemoproteínas, el átomo de hierro del hemo en las Lb's puede unir ligandos tales como el cianuro, fluoruro, o hidroxilo. La reacción entre las Lb's férrica y ferrosa con H_2O_2 se ha podido estudiar y se ha reportado actividad peroxidásica de las Lb's. Un ligando de especial interés es el ácido nicotínico (3- carboxipiridina), el cuál se acumula en los nódulos radicales durante la fase más activa de la fijación de nitrógeno, a una concentración tal que es comparable con la de las Lb's, y tanto la forma férrica como la ferrosa de esta proteína

exhiben una alta afinidad por este ligando. La unión del ácido nicotínico excluye la del CO, y pudiera considerarse como un regulador natural de la función de la Lb, debido, además, a que la reacción con el ácido nicotínico presenta una constante de disociación muy baja para el complejo ligando- hemoproteína (Job et al., 1980).

Dentro del metabolismo celular normal de los nódulos, se produce el anión O_2^- , el cuál es capaz de reaccionar con la oxilb, donde la forma férrica de esta hemoproteína es incapáz de captar el oxígeno; así, muchas reacciones en la célula pueden generar este ión tóxico, una de ellas es la autooxidación de la Lb, favorecida por un pH ligeramente ácido en el nódulo. La enzima SOD presente en la célula vegetal parece poder captar el anión O_2^- y evita la oxidación de la Lb. Por lo tanto, esta enzima pudiera jugar un papel de protección celular contra oxidaciones no controladas. La ferriLb también es oxidada por el H_2O_2 para dar Lb IV, una forma muy estable de Lb completamente inactiva; la catalasa aislada de células del hospedero pudiera asegurar el suministro de oxígeno a los bacteroides al captar el H_2O_2 tan pronto como es formado (Puppo et al., 1982). Además, otro mecanismo de protección de la Lb contra este último radical es la formación del complejo nicotinato- ferriLb, el cuál no está sujeto a desnaturalización como ocurre durante la reacción de la forma férrica libre con compuestos oxidantes tales como el H_2O_2 (figura 3) (Job et al., 1980).

III. POLIMORFISMO EN LA MOLECULA DE LEGHEMOGLOBINA.

La mayoría de las Leguminosas tienen muchos tipos de Lb's en

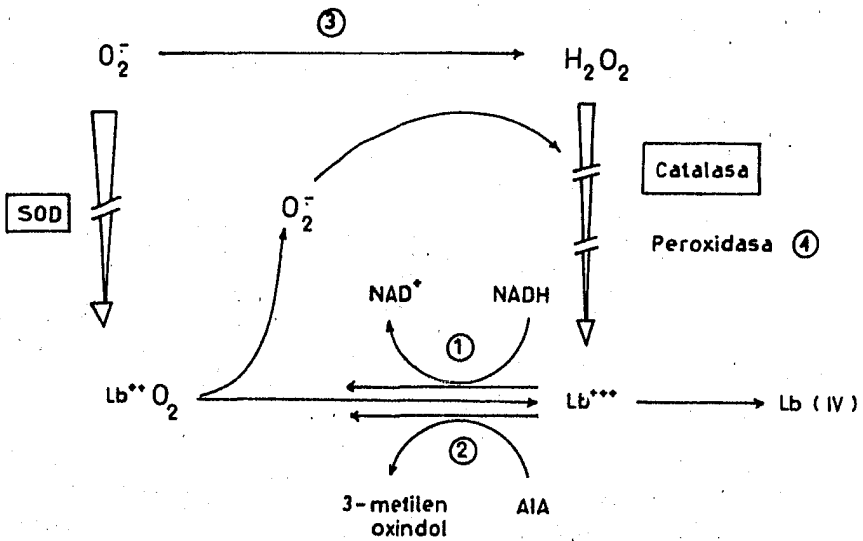


Fig. 3. Diferentes mecanismos involucrados en la protección de la leghemoglobina (Lb). Los números se refieren a: 1, reducción de la ferrilb por una reductasa del nódulo. 2, reducción de la ferrilb durante la oxidación simultánea del AIA. 3, dismutación del O_2^- . 4, eliminación del H_2O_2 por una peroxidasa del nódulo. (Tomado de Puppo y Rigaud, 1982).

los nódulos de las raíces, distinguibles electroforéticamente. En la Soya hay dos formas principales: la Lb S y la F, las cuales son distinguibles electroforéticamente. Además, por cromatografía en DEAE- Celulosa, la Lb F puede resolverse en dos componentes, y se han detectado otras especies menores (Appleby et al., 1975). Se ha demostrado que las proporciones de las dos formas mayores de la Lb en los nódulos de la raíz de la Soya, cambia durante su desarrollo. Por ejemplo, en la Soya se han detectado 4 componentes denominados a, b, c y d, igualmente en el Chicharo, pero denominados I, II, III y IV, los cuales, para ambos casos, pueden ser resueltos en componentes menores. La proporción de los componentes mayores de estas proteínas cambia durante el desarrollo del nódulo; este cambio, así como las diferencias en la secuencia de aminoácidos y dos secuencias genómicas distintas de Lb aisladas por clonación, son evidencias de que los genes que codifican para los componentes de la Lb son distintos y su síntesis es regulada por separado (Uheda y Syóno, 1982a).

Los componentes que tienen menor afinidad por el oxígeno, la Lb_c en la Soya y la Lb I en el Chicharo, son sintetizados principalmente en nódulos jóvenes, y por el contrario, los componentes sintetizados principalmente en nódulos maduros, Lb_a en la Soya y Lb IV en el Chicharo, muestran una mayor afinidad por el oxígeno. Estos hechos sugieren que la heterogeneidad de la Lb es una adaptación para una fijación de nitrógeno más efectiva (Uheda y Syóno 1982b).

IIg. GENETICA DE LA LEGHEMOGLOBINA.

Los nódulos de las Leguminosas, en su mayoría, parecen contener más de una especie de Lb. Esta multiplicidad dentro de una especie y la relación intrínseca entre las Lb de Leguminosas relacionadas, sugiere que los genes para este grupo de proteínas se han conservado durante la evolución. Las diferentes Lb son producto de genes distintos, y esto se ha hecho evidente con los datos de secuencias de aminoácidos de proteínas (Brisson et al., 1982; Sievers et al., 1978), como también con la traducción del ARNm de de los nódulos in vitro, el cuál produce los polipéptidos correspondientes a las distintas especies de Lb (Verma et al., 1979).

La naturaleza simbiótica de la biosíntesis de la Lb, en la que el hemo es sintetizado por la bacteria Rhizobium, mientras que la apoproteína es sintetizada por la Leguminosa, ha sido apoyada por datos genéticos, los cuales muestran que la infección con mutantes de Rhizobium no permite la producción del hemo en nódulos no efectivos, es decir, incapaces de fijar nitrógeno, y carecen, como consecuencia, de Lb funcional. Sin embargo, los nódulos no efectivos contienen cantidades significativas de ARNm de Lb, el cual puede ser traducido in vitro en una apoproteína, lo que sugiere que la inducción de la Lb es independiente de la capacidad de los nódulos para fijar nitrógeno.

Un análisis detallado de los fragmentos de ADN genómico aislados de la Soya, revelaron que el fragmento Eco RI (GM II) de 11.5 kb contiene dos genes de la Lb separados por aproximadamente 2 kb de ADN, mientras que el fragmento GM IV contiene un gene truncado. Las regiones que flanquean a estos genes parecen ser únicas.

El análisis de ARNasa y los datos de secuencias del ADN, muestran que un gene que codifica para la Lb_{c3} en el fragmento GM II, está interrumpido por tres intrones e incluye secuencias potencialmente reguladoras, por ejemplo, paquetes TATA y CAT. Otro gene de Lb localizado en el fragmento Eco RI de 7.5 kb, tambien muestra la presencia de secuencias interruptoras en las mismas localizaciones. Basados en estos datos, la estructura general de los genes de la Lb de la Soya, puede ser esquematizada como en la figura 4, la cuál muestra características comunes a otros genes de eucariontes (Brisson et al., 1982).

En adición a las dos secuencias interruptoras que se encuentran en todos los genes de globinas, hay un tercer intrón presente en los genes de Lb, que da como resultado la interrupción de la región codificante en cuatro exones. La longitud de los intrones varía entre los diferentes genes de Lb de la Soya.

La organización génica de las diferentes Lb's mencionadas anteriormente, en particular la de la Soya, se encuentran agrupadas en un cromosoma de manera similar a la situación observada para los genes de globinas animales. La sección intergénica entre los genes de Lb es más pequeña en comparación con las globinas de animales (figura 5). Una secuencia comparable a la región 3' que flanquea los loci de Lb no se ha observado en los loci de globinas de mamíferos. Como muchos otros loci de globinas, el locus de Lb de la Soya consiste de un pseudogene central flanqueado por genes verdaderos relacionados; este pseudogene no muestra alta homología en la secuencia con algún miembro en particular de la familia de los genes de Lb, lo que sugiere que la duplicación, la cual dió

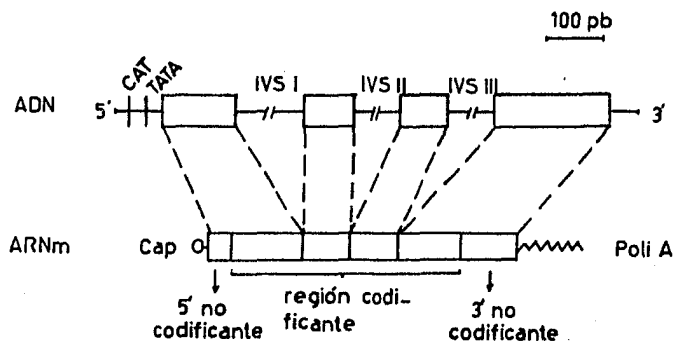


Fig.4. Estructura general de los genes de leghemoglobina en la Soya.
(Tomado de Brisson *et al.*, 1982).

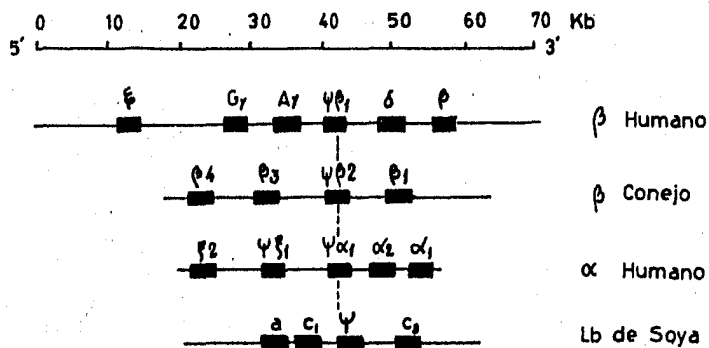


Fig.5. Comparación de la organización del locus principal de leghemoglobina (Lb) con loci representativos de genes de globinas de mamíferos.
(Tomado de Lee *et al.*, 1983).

lugar a esta secuencia, ocurrió previa o concomitantemente con los grandes eventos de duplicación de los genes de Lb. La presencia de una secuencia de nucleótidos en la terminal 3' del pseudogene de la Lb, la cuál pudiera codificar para aminoácidos extraño ha sido encontrada en las Lb's de la Soya, pero sí en los de Lb's de otras especies; esto podría sugerir que, de hecho, pudiera ser un reminisciente de un gene ancestral (Lee et al., 1983).

La conservación de la posición de los residuos de aminoácidos clave en las globinas y Lb's, y la posición de los dos intrones comunes, sugiere que estas clases de globinas han evolucionado del mismo gene ancestral. A nivel de secuencia de nucleótidos, sin embargo, se observa poca homología entre los dos tipos de genes. Por ejemplo, los valores de divergencia de las secuencias entre las regiones codificantes para la Lb_{c3} y los genes de α -globina del ratón, exceden el 100 % de sitios de reemplazamiento y el 200 % de los sitios silenciosos. Una región con posible significado regulador, la cuál está relativamente conservada, se encuentra en la región 5' flanqueante de estos genes. Cuando una secuencia consenso derivada de las secuencias flanqueantes 5' no-codificantes de 10 genes semejantes a β -globina, se comparan con la región correspondiente de los genes de Lb, se observa una secuencia significativa de homología (30 pb) en la región que rodea al sitio CAP. La conservación de esta secuencia, como también la de los paquetes ATA y CCAAT, indica que estas regiones son probablemente esenciales para la función de los genes de globina en plantas y animales (Lee et al., 1983).

IIIh. SITIO INTRACELULAR DE SINTESIS DE LA LEGHEMOGLOBINA.

Se ha observado que la Lb está confinada a las células que con tienen bacteroides, sin embargo existe controversia respecto al sitio intracelular de síntesis y su localización en la célula. Con base en técnicas de autorradiografía y de marcaje con peroxidasa, para detectar el hemo, se ha llegado a la conclusión de que la Lb está localizada dentro de los sacos membranales que contienen a los bacteroides. Sin embargo, recientemente se ha podido de terminar que el citoplasma de la célula vegetal contiene a la pro teína libre, es decir, no confinada en dichos sacos (Verma et al. 1976). Como resultado de algunas observaciones indirectas, donde la Lb pudiera estar presente dentro de los sacos membranales que contienen a los bacteroides, Verma et al. (1976), re- examinaron el aspecto del sitio intracelular de síntesis en los nódulos de la raíz. Se ha sugerido que el saco membranal se deriva del retículo endoplásmico en los nódulos de las raíces de la Alfalfa (Jordan et al., 1963), y también en el caso de las células de las raíces de la Soya (Goodchild y Bergersen, 1966). Si es correcta la inter pretación, y si las moléculas de Lb pueden pasar a través de la membrana, un sitio posible de síntesis podría ser en los polisomas unidos a membranas en el citoplasma de la célula hospedera. Además, la membrana que rodea a los bacteroides es una estructura dinámica y debido a la ruptura de la estructura membranosa aparece un material denso a los electrones dentro del saco membranal; ya que el espacio entre los bacteroides y la membrana que les rodea está libre de ribosomas y Lb, y si la apoproteína utiliza el hemo sintetizado por los bacteroides, el ensamble de la Lb pudie-

ra llevarse a cabo en el citoplasma de la célula hospedera (Verma et al., 1976).

III. DISTRIBUCION DE LA LEGHEMOGLOBINA.

La Lb es una proteína que ha sido principalmente estudiada en grupos de Leguminosas de importancia económica, particularmente en especies de la subfamilia Papilionoideae, como por ejemplo, Glycine max (Soya) (Hurrell y Leach, 1977), Pisum sativum (Chícharo) (Lehtovaara et al., 1980), Vicia faba (Haba) (Richardson et al., 1975), Phaseolus vulgaris (Frijol) (Broughton y Dilworth, 1971), Trifolium subterraneum (Trebol) (Thulborn et al., 1979) y Lupinus luteus (Lupino) (Dilworth, 1969). Sin embargo, y a pesar del número reducido de especies estudiadas, se puede considerar como amplio el espectro de la distribución de esta proteína en Leguminosas fijadoras de nitrógeno.

Aunque por mucho tiempo la presencia de la Lb en sistemas fijadores de nitrógeno diferentes a la asociación Rhizobium- Leguminosa había sido desconocida, en 1983 Appleby et al., reportan haber encontrado una hemoglobina en los nódulos radicales fijadores de nitrógeno de Parasponia, un miembro de la familia Ulmaceae. Esta planta es nodulada por cepas de Rhizobium que también nodulan a ciertos miembros de la familia Leguminosae (Akkermans et al., 1978).

Es posible que, in vivo, la hemoglobina de Parasponia esté fuertemente unida a la superficie bacteroidal de Rhizobium, y esto pudiera haber sido la razón de la incapacidad para detectarla en investigaciones previas. En 1960, Davenport (Appleby et al.

1983) reportó la presencia de una hemoglobina insoluble, es decir unida a membranas, en nódulos radicales fijadores de nitrógeno que contenían actinomicetes endofíticos. Estas observaciones han sido confirmadas con preparaciones de nódulos de muchas familias de plantas y ha sido posible extraer una hemoglobina soluble, no unida a membranas, de Casuarina cunninghamiana, Miq. (Appleby et al., 1983).

IIj. ORIGEN Y EVOLUCION DE LA LEGHEMOGLOBINA.

La pregunta referente a como adquirieron los vegetales el grupo de genes para sintetizar esta globina, ha sido escasamente abordada, sin embargo, se han planteado algunas hipótesis que intentan resolver esta cuestión.

Jeffreys (1982, en Lewin, 1982) ha sugerido que las Lb's se produjeron como resultado de una transferencia horizontal de genes de globina desde un animal a una planta Leguminosa ancestral en épocas recientes, donde el gene fue acarreado en un virus patógeno a las plantas, portado por un insecto. Esta posibilidad podría implicar que la hemoglobina del insecto también tuviera tres intrones y que la línea evolutiva que dió lugar a las globinas de vertebrados perdió el intrón extra antes que el gene primordial se duplicara para establecer los grupos α y β (Lewin, 1981). Sin embargo, recientemente (Lewin, 1984) se ha encontrado que los genes que codifican para la síntesis de las globinas de los insectos carecen de intrones en su estructura, lo que no concuerda con lo planteado por Jeffreys, y además, el análisis de la filogenia de las globinas indica que las Lb's están igualmente re

lacionadas a todas las clases de globinas animales, aunque una posible explicación para esto es que, ya que los genes de globina han estado presentes en las plantas, en ellas pudieron haber divergido más rápidamente que aquellas de la línea de descendencia animal. Las Lb's de la Soya y del Lupino difieren en aproximadamente la mitad de las posiciones de aminoácidos, las cuales son aproximadamente las mismas entre la divergencia de las globinas de los peces óseos y otros vertebrados verdaderos. La última divergencia, sin embargo, ocurrió hace aproximadamente 350 millones de años, mientras que la divergencia Soya- Lupino debió haber ocurrido después del origen de las Angiospermas, hace menos de 140 millones de años. Por lo tanto, las globinas vegetales parecen estar evolucionando más rápidamente que sus correspondientes en animales (Lee et al., 1983).

Otra idea que ha intentado explicar el origen de la Lb, sugiere que el gene que la codifica pudo haber venido de la bacteria simbiote Rhizobium, como un brinco de genes de un protocariote a un eucariote, hecho ya demostrado (Lewin, 1982); sin embargo, la presencia de intrones en el gene inducen a rechazar esta hipótesis.

El descubrimiento, ya mencionado, de una hemoglobina en una planta no- Leguminosa, por Appleby et al. (1983), sugiere que los genes de globinas pudieran ser comunes a muchas familias de plantas, por lo tanto, parece razonable pensar que los genes de Lb surgieron de un gene primordial común a plantas y animales.

OBJETIVOS

III. OBJETIVOS.

De lo expuesto en la sección anterior se puede apreciar que la Lb ha sido estudiada en un grupo muy reducido de Leguminosas, aun que se han podido establecer una serie de características para estas Lb's. Sin embargo, es necesario incrementar el número de especies de Leguminosas en las que se estudie esta proteína, con el objeto de buscar semejanzas y diferencias que nos permitan tener una idea más clara de la situación de las Lb's dentro de esta familia de vegetales.

Para iniciar con este tipo de estudios es necesario montar diversas técnicas, tales como las de purificación de proteínas, las cuales constituyen un medio confiable para poder alcanzar otras metas planteadas, y que además, sea posible dentro de este proceso manejar las diferentes variables que la técnica pudiera presentar. Uno de los objetivos del presente trabajo fué el de montar en el laboratorio una técnica de purificación de Lb.

Para aumentar el conocimiento de las Lb's en el grupo de las Leguminosas, se decidió trabajar con Crotalaria pumila, Ort., conocida vulgarmente como Tronadora, Cascabelillo, Chipilin o Chépil; la cuál es una planta que en muchas regiones de nuestro país es utilizada como abono verde, por lo que se supuso que contendría altas cantidades de nitrógeno combinado como consecuencia de una fijación de nitrógeno muy activa, y paralelamente con ello presentaría altas cantidades de Lb. Ya habiendo montado la técnica de purificación, el siguiente objetivo del trabajo fué el de detectar, purificar y cuantificar la Lb de Crotalaria pumila, Ort.

Por último, como consecuencia del proceso de purificación se planteó el tercer objetivo, el cuál consistió en caracterizar parcialmente a la Lb de esta especie, y comparar cada una de las características obtenidas con las de Lb's de otras especies estudiadas para poder establecer semejanzas y diferencias interespecíficas.

MATERIALES

Y

MÉTODOS

IV. MATERIALES Y METODOS.

Los nódulos utilizados en el presente trabajo provienen de plantas colectadas en el estado de Morelos, en una localidad ubicada a 3 Km del pueblo de Oaxtepec sobre la autopista a Cuautla, en la cuál hay gran abundancia de Crotalaria pumila, típicamente como una especie ruderal y por lo general está asociada con pastos, aunque en algunos casos se colectó en manchones formados por poblaciones densas. Las colectas se llevaron a cabo en los meses de Junio y Julio, y se obtuvo aproximadamente un total de 200 ejemplares de 30 cm de altura, los que todavía no alcanzaban el estado de floración y presentaban abundantes nódulos en las raíces, de los cuales la mayoría eran de color rojizo con un tamaño promedio de 2 mm.

De esta cantidad de ejemplares se obtuvieron 38.6 g de nódulos los cuales fueron congelados en una solución amortiguadora de NaCl 0.15 M - KH_2PO_4 50 mM, pH 7.6 (Reibach et al., 1981).

La detección y purificación de la Lb, se llevaron a cabo de acuerdo con Appleby et al. (1975), de la siguiente manera: los nódulos ya descongelados fueron homogenizados en un mortero con un pistilo en la solución amortiguadora mencionada anteriormente, hasta tener una solución muy densa y de un color café oscuro, la cuál fué filtrada a través de una gasa dando varios lavados con el amortiguador al bagazo del tejido, aún de color café, de la que se colectó una solución clara color miel. Esta solución fué centrifugada a 6,000 rpm durante 5 min para aclararla; posteriormente, la solución fué saturada al 80 % con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Apéndice

ce 1) e incubada a 4°C durante dos horas. Al cabo de ese tiempo se decantó el sobrenadante y se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 min para precipitar las proteínas; el sobrenadante se deshechó y el botón fué resuspendido en un volúmen mínimo del amortiguador de Tris - HCl 0.1 M, pH 7.7, con EDTA 10^{-4} M, y dializado contra el mismo durante 24 horas.

De esta solución se tomó una alícuota para determinar la cantidad de proteína total, soluble e insoluble, por el método de Lowry et al. (1951), y la cantidad de hemoproteína por el método de piridina - hemocromo (de Duve, 1948; Paul et al., 1953), como se detalla en el Apéndice 2.

La solución dializada fué centrifugada a 19,500 rpm durante 45 min en una centrífuga de alta velocidad (Ivan Sorvall, Inc., Connecticut) con el cabezal SS - 34 y con un intervalo de temperatura de -5 a -10°C , con el objeto de aclararla. El sobrenadante fué concentrado aproximadamente a la mitad de su volúmen, de la siguiente manera: en una hoja de papel encerado, se colocaron aproximadamente 20 g de Aquacide (Calbiochem, San Diego, Cal.), el cuál es un elemento altamente higroscópico, y la solución en un tubo de diálisis completamente seco, el que fué cubierto con dicho elemento, colocado en un frasco seco y mantenido a 4°C hasta alcanzar el volúmen deseado. Este procedimiento de concentración de la solución se eligió ya que es más confiable que la ultrafiltración en un aparato Amicon con una membrana Diaflo UM 10, en la cuál se determinó una alta pérdida de proteínas en soluciones con valores de pH menores a 6.0 .

La Lb fué oxidada completamente al estado Fe(III) y de esta ma

nera estabilizada, al utilizar 4 equivalentes de $K_3Fe(CN)_6$ a pH 9.2, como sigue: se enfrió a $2^\circ C$ el amortiguador de Tris 0.1 M, pH 9.2 (15 ml) y se añadió a la solución de Lb (50 ml) a $2^\circ C$. El $K_3Fe(CN)_6$ (176 mg) se agregó a la solución, y ésta se agitó cuidadosamente hasta que cesó la producción de oxígeno. Para eliminar el oxidante y el ácido nicotínico endógeno, el cuál se encuentra fuertemente unido a la Lb a un pH de 5.2, los 50 ml de la solución se filtraron en una columna de Sephadex G - 10 (para la preparación del gel y el montado de la columna, consultar a Fischer, 1975) de 20 x 3 cm, equilibrada con el amortiguador de Tris - HCl 0.1 M, pH 9.2 a $2^\circ C$, el cuál a su vez fué utilizado como eluyente con una velocidad de flujo de 3 ml/ 1.5 min, y se colectaron 20 fracciones de 3 ml cada una en un colector de fracciones (Vol. Inst. Spetialist, Nebraska). Estas últimas fueron detectadas en un espectrofotómetro (Hitachi - Perkin Elmer, Vis - UV) a 280 nm y se determinó la fracción proteica pico, la cuál a simple vista presenta un color miel, seguida de una banda amarilla que corresponde al exceso de ferricianuro y al ácido nicotínico desplazado. Las fracciones correspondientes al pico de la Lb se probaron para Lb(III) nicotinato; se diluyeron las muestras diez veces con el amortiguador de Mes 0.1 M, pH 5.2, y se determinó su espectro visible en el R 560/620 nm, para el cuál se ha reportado un valor de 1.7 para la ferriLb libre del nicotinato (Appleby et al., 1975).

Después de concentrar la solución de la manera ya descrita, y de dializar durante 36 horas contra dos cambios del amortiguador de acetatos 0.01 M, pH 5.2 a $2^\circ C$, se clarificó centrifugándola a 6,000 rpm durante 15 min, entonces, los 2 ml del sobrenadante se

aforaron a 6 ml con el amortiguador descrito anteriormente, y se filtraron a través de una columna de DEAE - Celulosa (para la preparación del gel y el montado de la columna, consultar a Peterson, 1975) de 30 x 1.8 cm, equilibrada con la misma solución. La velocidad de flujo para el desarrollo fué de 1 ml/ min y se aplicó un gradiente lineal del amortiguador de acetato de sodio de 0.01 M a 0.1 M, pH 5.2 . Se colectaron fracciones de 3.5 ml las cuales fueron detectadas en un espectrofotómetro a 280 y 546 nm.

Las fracciones pico se concentraron y se dializaron contra el amortiguador de fosfatos 0.01 M, pH 7.0, para dar volúmenes finales de 5 a 10 ml por fracción. La concentración de proteína en cada fracción fué cuantificada por el método de Lowry et al. (1951), y de hemoproteína por el método de piridina - hemocromo (de Duve, 1948; Paul et al., 1953) (Apéndice 2).

Las fracciones correspondientes a la Lb fueron corridas en electroforesis discontinua, según el sistema de Davis (1964), tanto aniónica como catiónica (Apéndice 3). Previamente a ello, las fracciones fueron concentradas aproximadamente a la mitad de su volumen original, y posteriormente dializadas contra el amortiguador de Tris - Gly, el cuál corresponde al amortiguador de la cámara de los electrodos, durante toda la noche. Se corrieron doce tubos, dos para cada fracción, en los que se colocaron 0.4 ml de la muestra. El tiempo de corrimiento fué de 3 horas aproximadamente, y los geles fueron teñidos con Amido Negro y desteñidos con ácido acético al 7 % durante toda la noche (Apéndice 3).

Con el objeto de obtener más evidencias como criterios de pureza, se realizaron corrimientos en cromatografía en gel en placa

delgada de acuerdo con Fischer (1975) (Apéndice 5), y cromatografía en Sephadex G - 50, en ambos casos para cada una de las fracciones con Lb. En el primer caso se utilizó como eluyente al amortiguador de Tris - HCl 1 M, pH 7.2, y se corrieron aproximadamente 100 μ l de muestra en cada carril, que contenía Azul Dextrán (1 mg/ ml) para marcar el frente de elución; en uno de los carriles se corrió ASB al 6 % como patrón, y en los tres restantes la solución de Lb. La velocidad de flujo fué de 1 cm/ h y el tiempo total de corrido fué de 16 horas. Las sustancias fueron detectadas y teñidas con Amio Negro, y destañadas con agua corriente (Apéndice 4).

En el segundo caso, cada una de las fracciones fueron filtradas a través de una columna de Sephadex G - 50 de 20 x 3 cm, eluidas con el amortiguador de Tris - HCl 0.1 M, pH 9.2, y con una velocidad de flujo del eluyente de 3 ml/ 4.5 min; se colectaron fracciones de 3 ml cada una.

Además, debido a que en la mayoría de los perfiles de elución de Lb's reportados para diferentes especies de Leguminosas, la primer fracción de hemoproteína corresponde al citocromo c, en el presente trabajo se corrió su espectro de absorción de 410 a 800 nm tanto para la forma oxidada como reducida al adicionar un exceso de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, para determinar sus máximos de absorción.

Este sistema general de purificación ha sido bien establecido por diversos trabajos, sin embargo, Uheda y Syóno (1982 a y b) reportan la obtención de buenos resultados al someter a electroforesis discontinua (Davis, 1964) los extractos semicrudos de los nodulos radicales de la Soya.

En este trabajo se intentó reproducir el ensayo mencionado, pero con nódulos de Crotalaria pumila, de la siguiente manera: 5.1 g de C. pumila se homogenizaron en el amortiguador de Tris - Gly, pH 7.2, y se filtraron y centrifugaron para aclarar como ya se ha descrito. De esta solución se tomó una alícuota para el corrimiento electroforético, el resto de la solución fué precipitada al 80 % con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, centrifugada y resuspendida en el amortiguador de Tris - HCl 0.1 M, pH 7.7 con EDTA 10^{-4} M y dializada contra el mismo. De esta solución, ya dializada y concentrada se tomó una alícuota y se congeló. Por último, la solución resultante fué filtrada a través de la columna de Sephadex G - 10, como ya se ha mencionado, y la fracción proteica fué concentrada para el corrimiento electroforético.

Se determinaron los Rf de cada una de las bandas en los geles de las alícuotas corridas y se compararon y se compararon con los Rf relativos obtenidos de los esquemas publicados por Uheda y Syóno (1982 a y b).

Por otro lado, previamente a los ensayos realizados con nódulos de Crotalaria pumila, se trabajó con nódulos del Trebol blanco, Trifolium repens, con el objeto de iniciar con el montado de la técnica; esto se llevó a cabo siguiendo el mismo sistema de purificación ya mencionado, con la única diferencia en la cantidad de nódulos procesados, la cuál fué de 11 g para el Trebol. Se obtuvo el perfil de elución en la columna de Sephadex G - 10, el R 560/620, el perfil de elución en la columna de DEAE - Celulosa y la cantidad de Lb por gramo de nódulo, lo que permitió comparar las Lb's de Crotalaria pumila y Trifolium repens.

Por último, como un ensayo para obtener material para ilustrar los Antecedentes de este trabajo, se realizó el procesado de nódulos radicales de Phaseolus vulgaris, L., para microscopía óptica y electrónica; la técnica detallada se presenta en el Apéndice 5.

RESULTADOS

V. RESULTADOS.

Diversos autores (revisado por Dilworth, 1980) han utilizado y establecido diferentes técnicas para purificar la Lb de las especies estudiadas por ellos, sin embargo, la mayoría de éstas son modificaciones de la técnica general establecida por Appleby et al. (1975), la cuál es la más comunmente utilizada y la que proporciona los mejores resultados. El presente trabajo, como ya se ha mencionado, se llevó a cabo siguiendo este esquema general de purificación, aunque se presentaron algunas dificultades en determinadas partes de la técnica, debidas al tamaño de los nódulos de la especie trabajada, según se discutirá más adelante.

De la homogenización de los nódulos se obtuvo una solución de color café oscuro, la cuál después de las sucesivas centrifugaciones y de la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, presentó una coloración café claro - rojizo, además, el botón de esta precipitación era de un color rojo - rosado. Estas apreciaciones cualitativas son de gran importancia, ya que de manera macroscópica y aproximada es posible suponer la presencia de la Lb en la solución, además de haber sido cuantificada la proteína total y el hemo por mililitro y por gramo de tejido nodular (tabla IIa.). De los 38.6 g de nódulos se obtuvieron 1,260 μg de proteína/ ml de solución, que corresponden a 33.1 μg de proteína/ g de nódulos; la cantidad de proteína total incluye tanto a la soluble como a la insoluble. Como es de esperarse, es mayor la cantidad de proteína soluble que la insoluble, en una proporción de 3 : 1 aproximadamente. Del total proteico, el 18 % corresponde al hemo total, aunque esta

Tabla II. (a). Cantidad de proteína total y de hemo por gramo de tejido nodular de *Crotalaria pumila*; extracto crudo precipitado al 80 % con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La cantidad total de hemo corresponde al 18 % de la proteína total.

Lowry (1951)			Piridina-Hemocromo	
	$\mu\text{g prot./ml}$	$\mu\text{g prot./g nódulo}$	$\mu\text{g hemo/ml}$	$\mu\text{g hemo / g nódulo}$
prot. soluble	910	23.9	230	6.0
prot. insol.	350	9.2		
Total	1260	33.1		

(b). Cantidad de hemoproteína total y de hemo por gramo de tejido nodular de *Crotalaria pumila* de cada fracción de leghemoglobina proveniente de la elución en DEAE- Celulosa (Fig. 7). La cantidad de hemo corresponde al 9 % de la hemoproteína total.

Lowry (1951)			Piridina-Hemocromo	
Frc.	$\mu\text{g hemoprot./ml}$	$\mu\text{g hemoprot./g nódulo}$	$\mu\text{g hemo/ml}$	$\mu\text{g hemo / g nódulo}$
CpI	40	1	13	0.3
CpII	60	1.5	19	0.5
CpIII	230	6.0	3	0.07
CpIV	140	3.6	5	0.13
CpV	70	1.8	9	0.23
CpVI	80	2.1	9	0.23
Total	620	16	58	1.46

cantidad incluye no sólo a la Lb, sino a otras hemoproteínas como el citocromo, la peroxidasa, la catalasa, etc.

En este estado, la mayor parte de la Lb se encuentra combinada con el ácido nicotínico y presenta un R 560/620 de 8.1, en estado ferroso; la eliminación de este compuesto mediante la adición del $K_3Fe(CN)_6$ permitió obtener a la Lb en estado férrico libre del ácido nicotínico. Al filtrar esta solución a través de una columna de Sephadex G - 10 (fig. 6) se obtiene una alta cantidad de proteína, detectada por la absorbancia obtenida, eluida en una sola banda color miel que corresponde a FI, y una fracción bien definida y claramente separada de una banda amarilla que contiene al ácido nicotínico desplazado y al exceso de $K_3Fe(CN)_6$, denominada FII. La Lb de FI presenta un valor del R 560/620 característico de 1.7 comparado con el valor reportado por Appleby et al. (1975) para la Lb de la Soya.

La fracción proteica FI, obtenida de la filtración en Sephadex G - 10, fué cromatografiada en una columna de DEAE - Celulosa, sin embargo, previamente a esto es importante hacer notar que la solución proteica debe ser aclarada por centrifugación, ya que de no ser así, las impurezas evitarán un corrimiento homogéneo depositándose en la parte superior de la columna como una gruesa capa de material color café claro, y como consecuencia de todo esto será muy difícil determinar las fracciones que contengan Lb.

El eluado de la cromatografía en DEAE - Celulosa fué detectado a 280 y 546 nm; se utiliza esta última longitud de onda debido a que es uno de los valores en los que la Lb presenta máximos de absorbancia. La elución de FI en esta columna (fig. 7) muestra cla-

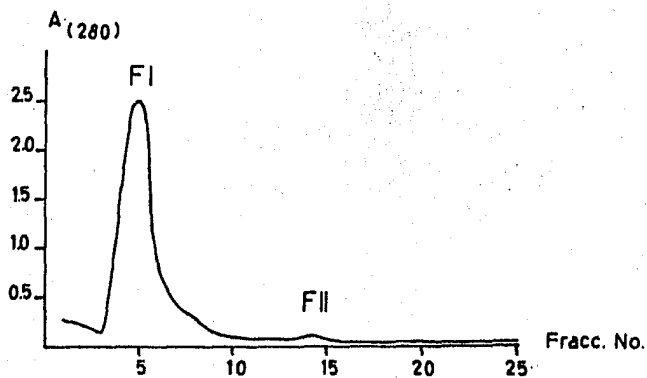


Fig. 6. Perfil de elución del extracto nodular de *Crotalaria pumila* en una columna de Sephadex G-10 (17 x 1.5 cm). Como eluyente se tuvo al amortiguador de Tris-HCl 0.1 M, pH=9.2, con un rango de flujo de 3 ml/5 min. Se colectaron fracciones de 3 ml que fueron registradas a 280 nm. La FI corresponde a la fracción proteica y FII al ácido nicotínico desplazado y al exceso de ferricianuro.

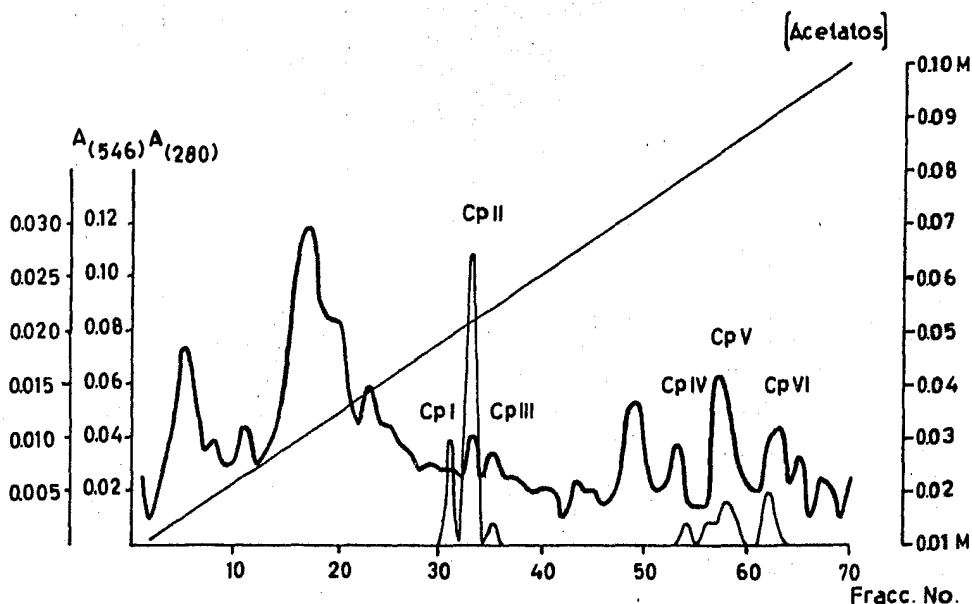


Fig. 7. Perfil de elución del extracto proteico nodular de *Crotalaria pumila* en una columna de DEAE-Celulosa (30 x 18 cm). Como eluyente se aplicó un gradiente de concentración del amortiguador de acetatos de 0.01M a 0.1M, pH=5.2, el cual tuvo un rango de flujo de 1ml / 2min. Se colectaron fracciones de 3.5 ml que fueron detectadas a 280 (—) y a 546 nm (—). Se detectan seis fracciones correspondientes a leghemoglobina.

ramente la presencia de dos bloques formados por tres fracciones cada uno, lo que representa la presencia de un total de seis fracciones correspondientes a Lb. La elución de cada una de estas Lb's se llevó a cabo a diferentes concentraciones de acetatos dentro del gradiente de elución. Los valores para cada una de ellas son los siguientes: CpI (0.049 M), CpII (0.052 M), CpIII (0.055 M), CpIV (0.079 M), CpV (0.084 M) y CpVI (0.090 M).

Dentro de los dos bloques de Lb, el primero, es decir, el formado por CpI, CpII y CpIII, contiene a las fracciones con mayor absorbancia y que deben ser consideradas como los componentes mayores en este estado fisiológico de la planta, particularmente CpII (fig. 7); por lo tanto, los trespicos restantes comprendidos en el segundo bloque, deben ser considerados como los componentes menores en este estado. Estas observaciones se ven apoyadas por la cantidad de hemo y hemoproteína, principalmente la primera, cuantificadas para cada una de las fracciones de Lb (tabla I Ib.) en la que CpII y CpI presentan la cantidad más alta de hemo por gramo de nódulos, 0.5 y 0.3 μ g, respectivamente. Aunque los valores para la cantidad de hemoproteína por fracción no coincidan ni en el perfil de elución ni en los valores obtenidos por esta cuantificación, con lo arriba establecido, una explicación posible para ello pudiera ser la diferencia de la cantidad de los diversos tipos de residuos de aminoácidos que constituyen a cada una de las Lb's y el grado de reacción de éstos con el reactivo de Folin - fenol en la técnica de Lowry et al. (1951).

En la elución de la columna de DEAE - Celulosa, CpI, CpII, CpIII, CpIV y CpVI, presentan picos bien definidos y suficientemen

te simétricos (fig. 7), como para pensar en que cada uno de ellos contiene un solo tipo de Lb fácilmente distinguible de las demás. A diferencia de éstas fracciones, CpV presenta un hombro que bien podría ser otra Lb no separada claramente, lo que daría como resultado la mezcla de las dos Lb's con diferencias mínimas en una sola fracción.

La cuantificación de hemoproteína total y de hemo por gramo de nódulos (tabla IIB.) de cada una de las fracciones de Lb, permite establecer que el hemo corresponde aproximadamente al 9 % de la hemoproteína total, lo que indica que otras hemoproteínas han sido excluidas en el procedimiento, y se puede considerar, entonces, que cada fracción de Lb es relativamente pura, aunque esto esté sujeto a la verificación por diferentes criterios de pureza.

El criterio principal de pureza para cada una de las fracciones que se intentó obtener, fué mediante la electroforesis discontinua (ver Materiales y Métodos) tanto aniónica como catiónica, sin embargo, en ningún caso fué posible obtener resultados positivos, debido seguramente a la pequeña cantidad de proteína de cada una de las fracciones, y a pesar de haber concentrado casi al máximo las diferentes fracciones no fué posible detectar ninguna banda.

Otro criterio de pureza tomado en cuenta fué el corrimiento de cada fracción en una cromatografía en placa delgada de gel. Sin embargo, al igual que en la electroforesis, no fué posible detectar las proteínas, a excepción de los patrones utilizados para am los casos, los cuales fueron claramente observados. Esto indica nuevamente que el problema radica seguramente en la cantidad de muestra utilizada.

Sin embargo, como un criterio parcial de pureza, el corrimiento de cada fracción de Lb en una columna de Sephadex G - 50 dió resultados de sumo interés (fig. 8). Las fracciones CpI, CpIV y CpV son eluidas en una sola fracción simétrica, lo que indica parcialmente que se tiene una fracción pura constituida de una sola Lb. En cambio, con las fracciones CpII, CpIII y CpVI, se presentan hombros pequeños y tenues, lo que indica una posible mezcla de dos o más Lb's en cada una de ellas; seguramente la filtración de cada una de estas fracciones a través de un gel de poro más grande, por ejemplo, Sephadex G - 75, o una recromatografía en DEAE - Celulosa, daría una idea más clara del grado de pureza de cada fracción, sin embargo, esto no fué posible realizarlo por temor a perder las proteínas por dilución.

Cabe hacer notar en este punto que el uso del término parcial, con respecto al grado de pureza determinado por esta técnica, es debido a que no se puede tener la confianza plena de tener una fracción pura, comparada con el grado de certidumbre que proporcionan otras técnicas, como por ejemplo la electroforesis.

Otro resultado interesante de esta recromatografía en Sephadex G - 50 (fig. 8), es que existen diferencias en los volúmenes de elución de cada fracción: CpI a los 18 ml, CpII a los 27 ml, CpIII a los 21 ml, CpIV a los 27 ml, CpV a los 18 ml y CpVI a los 24 ml. Estas diferencias podrían dar una idea de la condición estructural o conformacional de cada una de ellas, en las cuales además de haber diferencias en sus estructuras primarias, sugeridas por las diferentes afinidades por la DEAE - Celulosa, hay diferencias conformacionales que impiden que todas ellas sean eluidas en el mis-

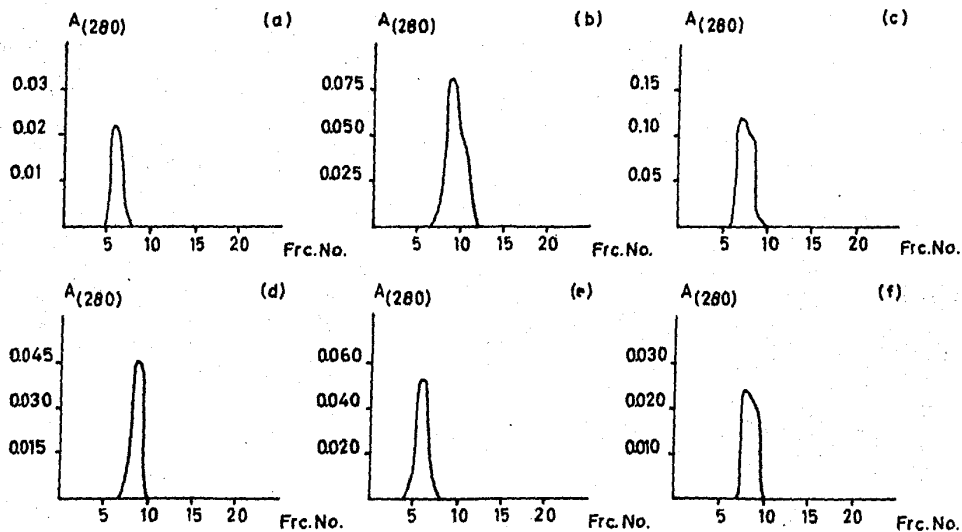


Fig. 8. Recromatografía en Sephadex G-50 de cada fracción de leghemoglobina proveniente de la columna de DEAE - Celulosa. Las condiciones de desarrollo de la cromatografía fueron las mismas que las mencionadas en la fig. 6. Cada gráfica corresponde a: (a), Cp I; (b), Cp II; (c), Cp III; (d), Cp IV; (e), Cp V; y (f), Cp VI.

mo volúmen a través del Sephadex G - 50.

Como ya se mencionó en la sección anterior, generalmente se reporta (Appleby et al., 1975) que el grupo de las Lb's al ser separadas a través de la DEAE - Celulosa, son encabezadas por el citocromo c. Sin embargo, en el presente caso, el barrido espectrofotométrico de CpI, en forma reducida y oxidada (fig. 9), no presenta máximos de absorbancia como los característicos de los citocromos, por lo que se descarta la posibilidad de que pertenesca a este grupo de proteínas, y por presentar absorbancia a 546 nm (fig. 7), reacción con piridina (tabla IIb.) y un perfil de elución en Sephadex G-50 semejante a CpV (fig. 8), es considerada como Lb, denominada CpI.

Por otro lado, el ensayo del corrimiento electroforético de extractos crudos y semicrudos de nódulos de Crotalaria pumila (fig. 10 y tabla III), muestra que conforme se aumenta el grado de pureza de las proteínas tratadas, se pueden apreciar un mayor número de bandas; seguramente se debe a que en extractos crudos la alta cantidad de impurezas evita el corrimiento de la fracción proteica, y conforme se eliminan estas impurezas hay mayor posibilidades de corrimiento. De esta manera se puede observar que en un extracto crudo únicamente se detectan un par de bandas (fig. 10a.) y que el producto de la filtración en Sephadex G - 10 presenta once bandas bien definidas (fig. 10d.). Mediante la comparación de este último gel con los valores de Rf obtenidos de Uheda y Syó no (1982 a y b) para la Lb de la Soya (tabla III), fué posible de terminar cuales bandas corresponden a Lb; se consideraron cinco, 21, 22, 23, 25 y 27, que presentan el Rf más cercano al reportado

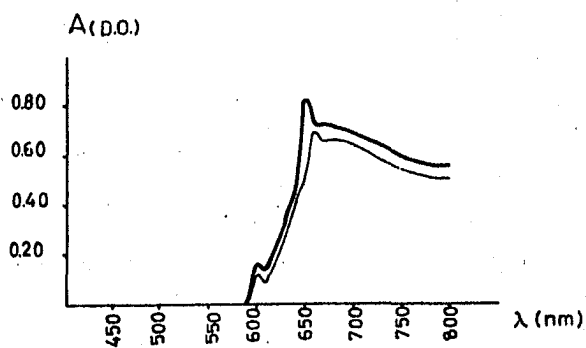


Fig. 9. Barrido espectrofotométrico de Cpl en forma reducida (—) y en forma oxidada (---) la cual presenta máximos de absorción a 600 y 650 nm y a 600 y 660 nm, respectivamente.

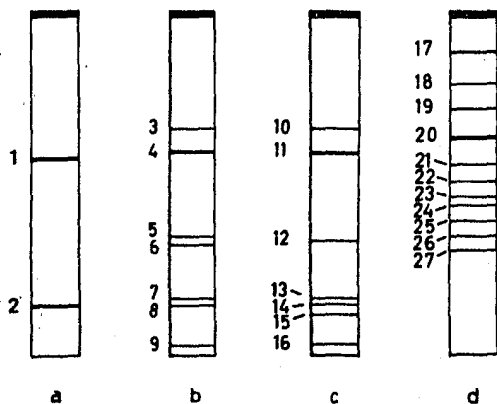


Fig. 10. Electroforesis aniónica en gel de poliacrilamida de extractos crudos y semicrudos de nódulos de *Crotalaria pumila*. Cada gel corresponde a: (a), muestra de un extracto crudo únicamente homogenizado y aclarado. (b), extracto producto de la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. (c), igual al anterior pero aclarado por centrifugación. (d), muestra de la fracción proteica procedente de la filtración en Sephadex G-10. Los números identifican cada banda, de las cuales su R_f se muestra en la tabla III.

Tabla III. Valores de Rf para las bandas obtenidas en electroforesis de extractos crudos y semicrudos de nódulos de *Crotalaria pumila* (ver fig. 10) comparados con los valores obtenidos teóricamente de Uheda y Syño (1982 a y b) para la leghemoglobina de la Soya.

a		b		c		d		Uheda y Syño*	Identidad**
Bd	Rf	Bd	Rf	Bd	Rf	Bd	Rf	Rf	
1	0.41	3	0.31	10	0.32	17	0.09		
2	0.84	4	0.37	11	0.38	18	0.19		
		5	0.64	12	0.64	19	0.25		
		6	0.66	13	0.80	20	0.32		
		7	0.80	14	0.84	21	0.42	0.39	Lb V
		8	0.84	15	0.88	22	0.46	0.48	Lb IV
		9	0.94	16	0.94	23	0.53	0.54	Lb III
						24	0.55		
						25	0.63	0.64	Lb II
						26	0.67		
						27	0.73	0.73	Lb I

Bd = número de banda.

Lb = leghemoglobina.

* = de acuerdo con Uheda y Syño (1982 a y b).

** = de acuerdo con la denominación de la leghemoglobina de la Soya.

para estas proteínas de la Soya. Se aprecian ligeras diferencias en la comparación de estos valores, las cuales eran de esperarse debido a las variaciones interespecíficas; además, únicamente se pudieron identificar, con base en esta comparación, cinco bandas correspondientes a Lb de Crotalaria pumila, siendo que se han establecido seis fracciones en DEAE - Celulosa. Al tomar como base esto último, se puede suponer que la fracción faltante pudiera ser la banda 26, y de esta manera establecer los dos bloques de fracciones; otra alternativa podría ser, que no se separó completamente de alguna fracción, o que no llegó a ser detectable.

Por lo tanto, de esta manera, fué posible obtener valores aproximados del Rf de cada fracción de la Lb de Crotalaria pumila en corrimiento electroforético, lo que no pudo ser obtenido para cada fracción ya purificada.

Por otro lado, en el ensayo realizado con el Trébol blanco, Trifolium repens, la filtración de la fracción proteica a través de la DEAE - Celulosa (fig. 11), permite observar un patrón de elución diferente al encontrado con Crotalaria pumila, sea la fracción proteica en general, detectada a 280 nm, o las Lb's, detectadas a 546 nm. En Trifolium repens se detectan dos bloques formados por dos fracciones cada uno y una fracción eluida posteriormente, lo que da como resultado la presencia de cinco fracciones correspondientes a Lb, las cuales son eluidas en diferentes concentraciones de acetatos dentro del gradiente de elución: TrI (0.024 M), TrII (0.028 M), TrIII (0.041 M), TrIV (0.047 M) y TrV (0.078 M). En la tabla VI se puede apreciar que el hemo corresponde aproximadamente al 6.6 % de la proteína total, y que las fracciones domi-

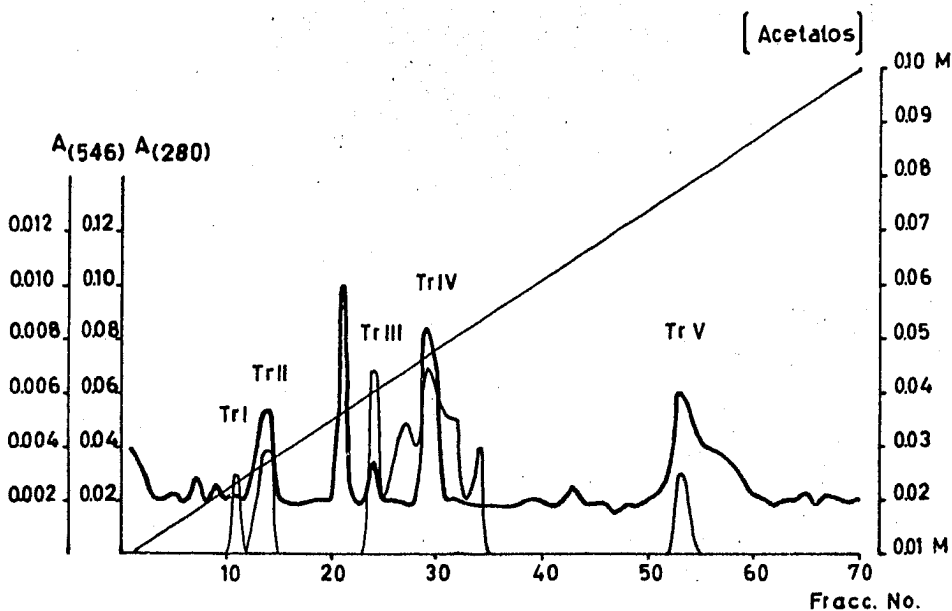


Fig. 11. Perfil de elución del extracto proteico nodular de *Trifolium repens* en una columna de DEAE-Celulosa (25x5 cm). Como eluyente se aplicó un gradiente de concentración del amortiguador de acetatos de 0.01 a 0.1 M, pH=5.2, el cual tuvo un rango de flujo de 1ml/min. Se colectaron fracciones de 5ml que fueron detectadas a 280 nm (—) y 546 nm (---). Se detectan cinco fracciones correspondientes a leghemoglobina.

Tabla IV. Cantidad de hemoproteína total y de hemo por tejido nodular de Trifolium repens de cada una de las fracciones de leghemoglobina - provenientes de la elución en DEAE-Celulosa (fig. 11). La cantidad de hemo corresponde al 66 %/o de la hemoproteína total.

Lowry (1951)			Piridina-Hemocromo	
Frc	µg hemoproteína/ml	µg hemoprot./g de nódulos	µg hemo/ml	µg hemo/g de nódulos
TrI	32	29	1	0.09
TrII	300	272	24	2.18
TrIII	115	104	7	0.63
TrIV	50	45	2	0.18
TrV	32	29	1	0.09
Total	529	48	35	3.18

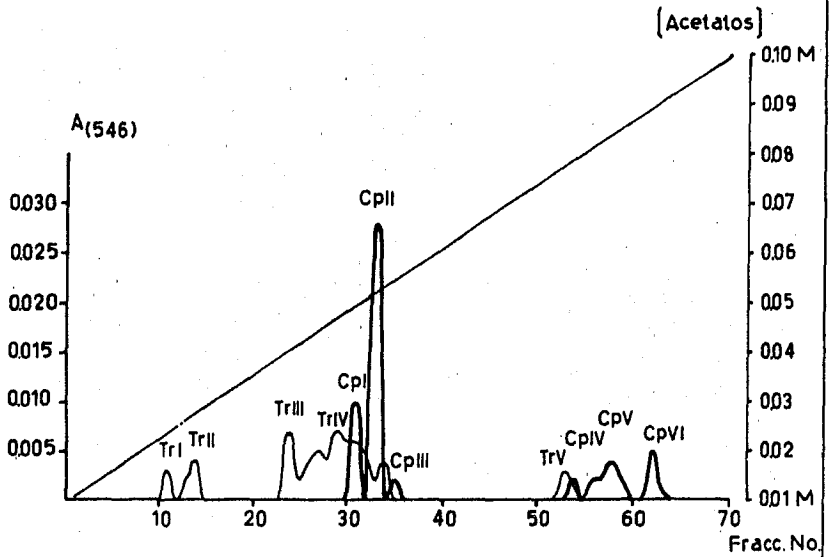


Fig. 12. Comparación del perfil de elución en DEAE-Celulosa de las diferentes leghemoglobinas de *Crotalaria pumila* (—) y *Trifolium repens* (---). Hemoproteínas detectadas a 546 nm; las condiciones de elución fueron como las mencionadas en las figs. 7 y 11, respectivamente.

nantes, con base en la cantidad de hemoproteína y de hemo, son TrII y TrIII, las cuales deben ser los componentes dominantes del estado fisiológico en el que se encuentra la planta, y el resto de las fracciones los componentes menores.

Por último, de la comparación de los perfiles de elución de las Lb's de Crotalaria pumila y Trifolium repens en DEAE - Celulosa (fig. 12), se observa la típica variación interespecífica de este tipo de proteínas, diferencias en el número de fracciones de Lb, diferencias en la concentración de acetatos en las cuales son eluidas cada una de ellas, y la diferente repartición de las fracciones en los bloques a través del volúmen de elución, son las principales comparaciones que se pueden llevar a cabo en este esquema.

DISCUSSION

Y

CONCLUSIONES

VI. DISCUSION Y CONCLUSIONES.

Por medio de la técnica utilizada en el presente trabajo, fué posible detectar y purificar parcialmente la Lb de Crotalaria pumila, Ort. (Leguminosae), además de establecer algunas de las características de la molécula con base en los procedimientos utilizados, y compararlos con las ya establecidas para otras especies.

Lo anterior se puede resumir de la siguiente manera: de un extracto proteico semicrudo de nódulos de Crotalaria pumila, aproximadamente el 18 % de las proteínas totales corresponde a diferentes hemoproteínas (tabla IIa.), dentro de las cuales la mitad, es decir, el 9 %, está formado por las diferentes Lb's (tabla IIb); la cantidad de cada una de ellas varía de acuerdo con el estado fisiológico de la planta. La cantidad restante de hemoproteínas contaminantes, el otro 9 %, son excluidas por las diferentes secuencias de purificación.

Es necesario y recomendable la eliminación del ácido nicotínico endógeno para que los procedimientos posteriores den resultados de un estado homogéneo de la Lb, ya que de no ser así se pueden presentar variaciones no confiables en los resultados obtenidos. El valor característico del R 560/620 de 1.7 es una indicación confiable de la eliminación del ácido nicotínico del sitio activo de la Lb. Al igual que en otras especies estudiadas (Dilworth, 1980), la Lb de Crotalaria pumila presenta el mismo valor de 1.7 para el estado férrico, y además la separación de la fracción proteica del ácido nicotínico y el exceso de ferricianuro, se lleva a cabo de un solo paso mediante la filtración en Sephadex

G - 10 (fig. 6).

La elución de la fracción proteica total en la columna de DEAE - Celulosa (fig. 7), fué la que permitió establecer el mayor número de las características de la Lb de Crotalaria pumila. Esta proteína, al igual que las reportadas para otras especies vegetales, presenta un alto grado de polimorfismo, aunque el número y algunas de las características de cada una de ellas sean diferentes. En esta especie se presentan por lo menos seis monómeros distintos, los cuales son eluidos en la resina de intercambio iónico en dos bloques de tres fracciones cada uno, a concentraciones de acetatos particulares para cada uno. Esto sugiere, debido a la afinidad hacia la resina, que existen diferencias físico - químicas entre cada una de las Lb's, seguramente diferencias en la estructura primaria, y una mayor abundancia de ciertos residuos de aminoácidos electronegativos, los cuales proporcionan dicha afinidad hacia la resina. Además, como una consecuencia de esto, y apoyado por la recromatografía en Sephadex G - 50 (fig. 8), deben existir ligeras diferencias conformacionales entre las seis fracciones de Lb.

Se ha podido establecer la estructura primaria de algunas Lb's como por ejemplo, de Pisum sativum (Lehtovaara et al., 1980), Vicia faba (Richardson et al., 1975) y Glycine max (Sievers et al. 1978), y se ha determinado que existen diferencias en la secuencia de los residuos de aminoácidos que las forman, por lo que las diferencias en la estructura primaria de las Lb's de Crotalaria pumila en comparación con las de otras especies, y las de ellas mismas, deben seguir un patrón semejante de variación. Sin embar-

go, los estudios realizados mediante difracción de rayos - X de cristales de Lb del Lupino (Vainshtein et al., 1975) y de la Soya (Ollis et al., 1983), han mostrado que la estructura general de la conformación de estas proteínas es muy semejante, y que no ha variado apreciablemente a través de la evolución, por lo que cabría esperar que de manera general las Lb's de Crotalaria pumila se mantuvieran en este patrón de plegamientos, aunque se necesiten un mayor número de estudios para poder proponer algo.

La Lb es una proteína polimórfica cuyos genes se expresan diferencialmente durante el desarrollo de las células nodulares. En Crotalaria pumila, las tres fracciones componentes del primer bloque, es decir, CpI, CpII y CpIII, constituyen la mayor cantidad de hemoproteína del total cuantificado (tabla IIb.), las cuales deben ser características del estado fisiológico de la planta, antes de la floración y aproximadamente de 60 a 80 días después de la germinación. Como ocurre con otras especies estudiadas, en este vegetal se debe llevar a cabo un recambio entre los componentes dominantes, donde de la etapa de la floración hacia la senectud del nódulo, los componentes del segundo bloque sean los dominantes es decir, CpIV, CpV y CpVI. Los estudios de afinidad hacia el oxígeno y de recambio por el CO, de cada una de las fracciones, podrían apoyar esta suposición.

Con respecto a los ensayos realizados con la Lb del Trébol blanco, Trifolium repens, el perfil de elución en DEAE - Celulosa (fig. 11) concuerda en alto grado con el perfil reportado por Thulborn et al. (1979) para Trifolium subterraneum, aunque para este caso se detecten cuatro fracciones correspondientes a Lb, y para

el Trebol blanco sean cinco. Esta diferencia se puede deber al estado fisiológico en el que se encuentra el material recolectado, o a diferencias intragenéricas como ya ha sido reportado por Holl et al. (1983).

La variación interespecífica de este tipo de proteínas en las diferentes especies trabajadas, se mantiene evidente en las Lb's de Crotalaria pumila; esto está apoyado, principalmente, por la comparación del perfil de elución en DEAE - Celulosa de las Lb's de Crotalaria pumila y Trifolium repens (fig. 12), en donde se aprecian diferencias marcadas en los parámetros evaluados (ver sección de Resultados).

El estudio de la Lb en un mayor número de especies de Leguminosas y no - Leguminosas debe aumentar, y conforme esto suceda habrá la necesidad de identificar cada una de ellas de acuerdo a la especie a la que corresponda y se diferencie de las demás. Al tomar como base el criterio aplicado para denominar las diferentes enzimas Nitrogenasas conocidas (Posgate, 1974), se propone el uso de un sistema semejante para denominar a las diferentes Lb's, que de hecho es el sistema utilizado en el presente trabajo, y el cuál consiste en tomar la letra inicial del género y la especie en cuestión más la fracción cromatográfica o electroforética, a la cuál corresponda la Lb. Por ejemplo, en el caso de la primer fracción de la Lb de Crotalaria pumila se le denomina CpI.

Por último, y para concluir, es conveniente hacer notar la importancia que reviste el estudio de esta proteína, la Lb. Desde el punto de vista fisiológico, es una proteína que se encuentra estrechamente ligada al proceso de la fijación simbiótica de ni-

trógeno. Desde el punto de vista sistemático, es una molécula que ha sido utilizada en estudios quimiotaxonómicos y filogenéticos (Murrell et al., 1977) de las Leguminosas. Y desde el punto de vista evolutivo, quizás el más intrigante, algún día llegar a establecer como fué que un reducido grupo de vegetales adquirió la capacidad de sintetizar esta proteína característica del reino Animal, y en general que papel tuvo en la evolución de las globi-
nas.

trógeno. Desde el punto de vista sistemático, es una molécula que ha sido utilizada en estudios quimiotaxonómicos y filogenéticos (Hurrell et al., 1977) de las Leguminosas. Y desde el punto de vista evolutivo, quizás el más intrigante, algún día llegar a establecer como fué que un reducido grupo de vegetales adquirió la capacidad de sintetizar esta proteína característica del reino Animal, y en general que papel tuvo en la evolución de las globi-
nas.

A P E N D I C E S

APENDICE 1.

Precipitación de Proteínas con Sulfato de Amonio.

La precipitación de las moléculas proteicas puede llevarse a cabo añadiendo sales a la solución de proteínas, tales como el sulfato de amonio. Las moléculas de proteína y los iones inorgánicos compiten por las moléculas de agua para su hidratación. A una concentración de sales característica, las interacciones proteína - proteína llegan a ser predominantes sobre las interacciones proteína - agua, y ocurre entonces la agregación y precipitación. Esta técnica es ampliamente utilizada en la purificación preliminar de las proteínas (Williams y Wilson, 1979).

Los cálculos para determinar la cantidad de sulfato de amonio necesario para llevar la solución a un cierto porcentaje de concentración, pueden realizarse fácilmente empleando la fórmula propuesta por Segel (1976):

$$\text{Wtg} = \frac{505 (S_2 - S_1)}{1 - 0.285 (S_2)}$$

donde, Wtg = peso de sulfato de amonio sólido para ser agregado a 1,000 ml.

S_2 = la saturación final (como decimal).

S_1 = la saturación inicial (como decimal).

505 = gramos de sulfato de amonio por 1,000 ml para 100 % de saturación.

APENDICE 1.

Continuación.

Por ejemplo, si se desean saturar al 80 % con sulfato de amonio 5l ml de una solución de proteína, el procedimiento es el siguiente:

$$\text{Wtg} = \frac{505 (0.8 - 0)}{1 - 0.285 (0.8)} = \frac{404}{0.772} = 523 \text{ g}$$

por lo tanto, se adicionarán 523 g a 1,000 ml de solución para alcanzar el 80 % de saturación. A 5l ml se agregarán 25.6 g .

APENDICE 2.

a) Determinación de Proteínas por el Método de Lowry et al. (1951).

Las proteínas reaccionan con el reactivo de Folin - fenol para dar un complejo coloreado. El color que se forma es debido a la reacción del cobre alcalino con la proteína, tal como sucede con el ensayo de Biuret, y la reducción del fosfomolibdato por la tirosina y el triptófano presentes en la proteína. La intensidad del color depende del número de aminoácidos aromáticos presentes y cambiará según la clase de proteína.

1) Reactivos.

Reactivo A. Para proteínas solubles: Na_2CO_3 al 2 % en NaOH 0.1M.

Para proteínas insolubles: Na_2CO_3 al 2 % en agua destilada.

Reactivo B. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.5 % en citrato de sodio al 1 %.

Reactivo C. Mezcla de 50 volúmenes del reactivo A con un volumen del reactivo B. SE PREPARA AL MOMENTO DE USARSE.

NaOH 0.1 M.

2) Técnica.

Para proteínas solubles: se toman alícuotas de la solución problema hasta de 1 ml, que contiene de 50 a 350 μg de proteína (hágase la dilución adecuada), y se afora a 1 ml con agua destilada.

Para proteínas insolubles: se toman alícuotas de la solución problema hasta de 0.5 ml, que contiene de 50 a 350 μg de proteína

APENDICE 2.

Continuación.

(hágase la dilución adecuada), y se afora a 0.5 ml con agua destilada. Se agregan 0.5 ml de NaOH 0.1 M y se deja solubilizar por 30 min o más a temperatura ambiente.

Se añaden 5 ml del reactivo C, se homogeniza la mezcla y se deja reposar durante 10 min o más a temperatura ambiente.

Se añaden 0.5 ml del reactivo D, se homogeniza la muestra AGITANDO INMEDIATAMENTE Y ENERGICAMENTE POR EXACTAMENTE 15 s, se deja reposar por 30 min o más a temperatura ambiente.

Se lee la absorbancia a 750 nm (filtro rojo) contra el blanco de reactivos. Se hace una curva tipo con ASB cristalizada entre 50 y 500 μg .

b) Determinación de Hemoproteínas por el Método de Piridina - Hemocromo (de Duve, 1948; Paul et al., 1953).

La concentración de hemoproteína en una solución determinada es estimada por el método de piridina - hemocromo (de Duve, 1948) y se utiliza un E_{mm} a 556 nm de 34.6 (Paul et al., 1953); las muestras se preparan adicionando 3 ml de una solución que contenga 100 ml de piridina, 30 ml de NaOH 1 N, 300 ml de agua destilada, a 1 ml de una solución patrón de mioglobina o hemoglobina y a 1 ml de la muestra. Cuando se haya formado el complejo piridina - hemocromo, el cuál es un compuesto relativamente estable y antes de llevar a cabo las lecturas espectrofotométricas, se añade un exce

APENDICE 2.

Continuación.

so de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, el cuál será cuidadosamente disuelto por agitación. El hemocromógeno no es estable por 5 a 10 min, por lo tanto las lecturas deben ser tomadas rápidamente, y se llevan a cabo a una $A_{557.5}$ (máximo) y A_{540} (mínimo).

APENDICE 3.

Electroforesis Discontinua en Geles de Poliacrilamida, Sistema Davis (1954).

El gel de poliacrilamida se prepara polimerizando acrilamida y una pequeña cantidad de reactivo de entrecruzamiento, metilenobis acrilamida, en presencia del catalizador, persulfato de amonio. Se incluye también tetrametiletlenodiamina (TEMED) para iniciar y controlar la polimerización. Se deja polimerizar la mezcla en un tubo sellado en su extremo inferior por un tapón de caucho. Luego se coloca un poco de agua encima del gel para asegurar la obtención de una superficie plana y también para excluir el oxígeno que inhibe la polimerización.

El tamaño del poro del gel puede variarse de acuerdo a la concentración del monómero en la solución. Las proteínas pueden separarse convenientemente en acrilamida al 7.5 %, pero moléculas más grandes requieren un gel más poroso de acrilamida al 2.5 %.

a) Electroforesis Analítica Aniónica.

La preparación del gel de poliacrilamida para la electroforesis analítica aniónica se lleva a cabo de la siguiente manera:

Solución A: HCl 1 N - 48 ml

Tris - 36.6 g (concentración final 0.5 M)

TEMED - 0.23 ml

Agua destilada - a 100 ml

*ajustar pH a 8.9 con HCl 1 N.

APENDICE 3.

Continuación.

Solución B: HCl 1 N - 48 ml

Tris - 5.98 g

TENED - 0.46 ml

Agua destilada - a 100 ml

*ajustar pH a 6.7 con HCl 1 N.

Solución C: Acrilamida - 28.0 g

Bisacrilamida - 0.735 g

Agua destilada - a 100 ml

Solución D: Acrilamida - 10.0 g

Bisacrilamida - 2.5 g

Agua destilada - a 100 ml

Solución E: Riboflavina - 4 mg

Agua destilada - a 100 ml

Solución F: Agua destilada.

Solución de trabajo (gel resolvidor) para gel al 7 %

Solución 1: 1 parte de A (3 ml)

2 partes de C (6 ml)

1 parte de agua (3 ml)

Solución 2: Persulfato de

amonio desecado, 0.14 g

/100 ml de agua destilada

(preparar antes de

usarse, 12 ml).

Solución del gel resolvidor:

1 parte de la solución 1 (12 ml)

1 parte de la solución 2 (12 ml)

APENDICE 3.

Continuación.

Solución del gel concentrador:

1 parte de la solución B (0.5 ml)

2 partes de la solución D (1 ml)

1 parte de la solución E (0.5 ml)

4 partes de la solución F (2 ml)

Regulador de la cámara de electrodos:

Tris - 6.0 g

Glicina - 28.8 g

Agua destilada - 1,000 ml

A la muestra que contiene de 50 a 100 µg de proteína se le agrega sacarosa para dar una concentración del 10 % y una gota de Azul de Bromofenol al 0.01 %. Se corre la muestra aplicando una corriente de 2 mA por tubo hasta que el Azul de Bromofenol alcance la parte final del gel. Después de ello, se sacan los geles de los tubos y se tiñen por 15 min con Amido Negro al 1 % en ácido acético al 10 %, y se destiñen en ácido acético al 7 % por 24 horas y en constante agitación.

b) Electroforesis Analítica Catiónica.

La preparación de los geles se lleva a cabo de la siguiente manera:

Soluciones del gel resoledor:

Acrilamida - 8 g

Bisacrilamida - 0.25 g

Agua destilada - a 50 ml

Regulador: Acido acético 1 N

KOH 1 N

pH 5.0

APENDICE 3.

Continuación.

TEMED: TEMED - 0.1 ml

Persulfato de amonio: 10 mg/7.5 ml

Agua destilada - 9.9 ml

	Agua dest.	Acrilamida	Regulador	TEMED	Persulfato
Gel al 3 %	8.0	3.0	2.0	1.0	2.0
Gel al 7.5 %	2.25	3.75	1.0	0.5	0.5

Soluciones del gel concentrador:

Acrilmd.: Acrilamida - 5 g

Regulador: Acido acético 1 N

Bisacrilamida - 1.25 g

KOH 1 N

Agua destilada - a 50 ml

pH 5.5

TEMED: TEMED - 0.1 ml

Persulfato de amonio: 10 mg/

Agua destilada - 9.9 ml

7.5 ml

Agua dest. Acrilamida Regulador TEMED Persulfato

1.75 1.0 0.5 0.25 0.5

Regulador de la cámara de electrodos: Glicina 17.2 g; ácido acético 1 M, 10.8 ml; llevar a 1,000 ml (pH 4.5).

La muestra se prepara, corre, tiñe y destiñe, de igual manera que el sistema aniónico.

APENDICE 4.

Cromatografía en Placa Delgada de Gel.

La preparación y el desarrollo de la cromatografía en placa delgada de gel se puede llevar a cabo de acuerdo con Fischer (1975), de la siguiente manera. Después que se ha dejado que el gel (Sephadex G - 25) se hinche por el lapso de tiempo adecuado, se deja asentar, para posteriormente decantar casi completamente el líquido sobrenadante; se agita suavemente el gel y se coloca sobre una placa de vidrio, en este caso, de 11 x 16 cm, previamente lavada con detergente caliente y enjuagada con agua destilada varias veces. Para extender el gel se utiliza una varilla de cristal o acero con collares adaptados a ambos extremos, y moviéndola hacia adelante y hacia atrás se obtiene una capa de gel de aproximadamente 1 mm de grosor. Una vez extendida la capa, se deja reposar unos minutos y entonces se trazan tres canales para tener cuatro carriles de corrimiento, uno para cada muestra; posteriormente, se conectan las tiras de papel filtro (Whatman 3MM) y se deja equilibrar por toda la noche en el amortiguador de corrimiento. Después de este periodo de equilibrio se aplican aproximadamente 100 μ l de la muestra conteniendo Azul Dextrán (1 mg/ml) para marcar el frente de elución. La placa se deja correr durante toda la noche con una velocidad de flujo de 1 cm/h.

Para la detección y teñido de las sustancias en la capa, se coloca papel filtro (Whatman 3MM) sobre la placa, y después de cerca de 5 min el líquido de la capa se transfiere al papel, y este es removido y secado; entonces, se tiñe con una solución de

APENDICE 4.

Continuación.

metanol: agua: ácido acético: Amido Negro 10B (45: 45: 10: 0.06)
durante 15 min en agitación, y desteñido en agua corriente con
tres cambios de 30 min cada uno.

APENDICE 5.

Microscopía Electrónica de Nódulos Radicales de Phaseolus vulgaris, L.

- Fijación.

Los nódulos con un tamaño mayor a 1 mm se cortan en pequeños trozos, con el objeto de obtener una mejor penetración de los diferentes componentes a lo largo de la técnica. Estos nódulos, fragmentados o completos, son sumergidos en el fijador de Karnovsky (1965) modificado, que contiene glutaraldehído al 2.5 % y paraformaldehído al 1 % en el amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M, pH 7.4, durante 18 horas. La solución de paraformaldehído se prepara disolviendo 1 g de éste en 100 ml de agua destilada, se calienta la mezcla a 60°C y mientras se agita se agrega una gota de NaOH 1 N para aclarar la solución; esta solución debe prepararse en el momento (Hayat, 1972).

Posteriormente, los nódulos se lavan en el amortiguador de cacodilato de sodio con tres cambios de una hora cada uno, y al cabo de las tres horas se colocan en una solución de tetróxido de osmio (OsO_4) al 1 % por tres horas para ser postfijados. Al término de esta postfijación, a los nódulos se le dá una lavada rápida con agua destilada.

- Deshidratación.

La deshidratación de los nódulos se lleva a cabo utilizando alcohól etílico a concentraciones de orden creciente, de acuerdo con el siguiente esquema:

APENDICE 5.

Continuación.

- a) Alcohol etílico al 70 % por 30 min.
- b) Alcohol etílico al 80 % por 30 min.
- c) Alcohol etílico al 90 % por 30 min.
- d) Alcohol etílico al 95 % por 30 min.
- e) Alcohol etílico al 100 % por 30 min (dos cambios).
- f) y por último, bañados en óxido de propileno con dos cambios de 30 min cada uno.

- Impregnación e Inclusión.

Antes de la inclusión definitiva, se llevó a cabo la impregnación correspondiente, de acuerdo con el siguiente esquema (Luft, 1961):

- a) Oxido de propileno - Epón 812, en proporción 1 : 1, por 24 horas.
- b) Oxido de propileno - Epón 812, en proporción 1 : 2, por 24 horas.
- c) Epón 812 puro, por 24 horas.

Y por último, la inclusión, que se llevó a cabo con la siguiente mezcla: 7 ml de la solución epoxi A + 3 ml de la solución epoxi B + 0.15 ml de DMP - 30. En esta solución son colocados los núcleos impregnados, y llevada a cabo la polimerización a 60°C durante 24 horas, en cápsulas de gelatina o moldes especiales.

Antes de proceder a realizar la inclusión en Epón es preciso preparar las soluciones mezclas de Epón - DDSA y de Epón - NMA para formar, respectivamente, la solución A y la solución B en pro-

APENDICE 5.

Continuación.

porciones determinadas. En general, las proporciones de la mezcla para las soluciones A y B pueden quedar establecidas de acuerdo con lo propuesto por Luft (1961):

Solución A:	Solución B:
Epón 812 - 62 ml	Epón 812 - 100 ml
DDSA - 100 ml	NMA - 89 ml

Como la resina mezcla debe ser recién preparada, su preparación debe ser en el momento y para cada vez que se vaya a hacer una inclusión. La resina mezcla se prepara mezclando en ciertas proporciones la solución A + la solución B + DMP - 30.

Ya preparada la resina mezcla, se coloca en el agitador circular durante dos horas a fin de que se mezclen íntimamente las tres partes y se haga una mezcla uniforme, aunque debe evitarse una velocidad excesiva la cuál deja la mezcla blanca por la numerosísima cantidad de burbujas; aunque no se estropea, tiene el inconveniente de que tarda muchas horas, días a veces, para aclararse por la desaparición de las microburbujas (Santander, 1968).

- Microtomía.

Se rebaja el bloque con una navaja hasta hacerse una pirámide, luego se utiliza el ultramicrotomo equipado con navajas de cristal, se obtienen los cortes semifinos con un grosor de 1.5 a 2.0 μ y se tiñen con Azul de Toluidina caliente; posteriormente, se les dan 3 ó 4 baños de agua destilada, y entonces el corte se monta en un portaobjetos sobre una platina caliente. La observación

APENDICE 5.

Continuación.

de estas preparaciones en el microscópio fotónico permite determinar el área más adecuada para realizar cortes finos.

Una vez localizada esta área, se talla una pirámide más pequeña y se obtienen los cortes finos en serie; se escogen cortes dorados y plateados, los cuales varían de un grosor de 1,000 a 700 Å respectivamente, y se montan en rejillas de cobre de 300 mallas. Estos cortes son contrastados con citrato de plomo durante 2 min, en un ambiente con lentes NaOH.

Después de ser contrastados los cortes con el citrato de plomo, son lavados al chorro de agua destilada y secados a temperatura ambiente en una caja de Petri protegidos de las partículas de polvo.

Las rejillas se observan al microscópio electrónico Zeiss EM - 4, y son electromicrografiadas.

REFERENCIAS

VIII. REFERENCIAS.

- Akkermans, A. D. L., Abdulkadir, S. and Trinick, M. J. (1978). Nitrogen - Fixing Root Nodules in Ulmaceae. NATURE. 274: 190.
- Appleby, C. A., Nicola, N. A., Hurrell, G. R. and Leach, S. J. (1975). Characterization and Improved Separation of Soybeans Leghemoglobins. BIOCHEMISTRY. 14 (20): 4444 - 4450.
- Appleby, C. A. (1983). Hemoglobin in a Nonleguminous Plant, Parasponia: Possible Genetic Origin and Function in Nitrogen Fixation. SCIENCE. 220: 951 - 953.
- Bergersen, F. J., Turner, G. L. and Appleby, C. A. (1973). Studies of the Physiological Role of Leghemoglobin in Soybean Root Nodules. BIOCHEM. BIOPHYS. ACTA. 292: 271 - 282.
- Bergersen, F. J. and Turner, G. L. (1979). Systems Utilizing Oxygenated Leghemoglobin and Myoglobin as Sources of Free Dissolved O_2 at Low Concentrations for Experiments with Bacteria. ANAL. BIOCHEM. 96: 165 - 174.
- Bisseling, T., Moen, A. A., Van Den Bos, R. C. and Van Kammen, A. (1980). The Sequence of Appearance of Leghemoglobin and Nitrogenase Components I and II in Root Nodules of Pisum sativum. J. GEN. MICROBIOL. 118: 377 - 381.
- Brisson, N., Pombo - Gentile, A. and Verma, D. P. S. (1982). Organization and Expression of Leghemoglobin Genes. CAN. J. BIOCHEM. 60: 272 - 278.
- Broughton, W. J. and Dilworth, M. J. (1971). Control of Leghemoglobin Synthesis in Snake Beans. BIOCHEM. J. 125: 1075 - 1080.
- Davis, B. J. (1964). Disc Electrophoresis: Method and Application to Human Serum Proteins. ANN. NY. ACAD. SCI. USA. 121: 404 - 427.
- de Duve, Ch. (1948). A Spectrophotometric Method for the Simultaneous Determination of Myoglobin and Hemoglobin in Extracts of Human Muscle. ACTA CHEM. SCAND. 2: 264 - 289.
- Dilworth, M. J. (1969). The Plant as the Genetic Determinant of Leghemoglobin Production in the Legume Root Nodules. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA. 184: 432 - 441.
- Dilworth, M. J. (1980). Leghemoglobins. METH. ENZYMOL. 69: 812 - 823.
- Fischer, L. (1975). Introducción a la Cromatografía en Gel. El Manual Moderno. México. 210 pp.

- Fox, D. L. (1976). Animal Biochromes and Structural Colours. Univ. California Press. USA. 433 pp.
- Goodchild, D. J. and Bergersen, F. J. (1966). Electron - Microscopy of the Infection and Subsequent Development of Soybean Nodule Cells. J. BACTERIOL. 92: 204 - 213.
- Hayat, M. A. (1972). Basic Electron Microscopy Techniques. Van Nostrand Reinhold. NY. USA. 119 pp.
- Holl, F. B., Milliron, M. L. and Delafield, S. J. (1983). Qualitative variation in Root Nodule Leghemoglobins: Intra - Specific Variation in Components Profiles. PLANT SCI. LETT. 32: 321 - 326.
- Hurrell, J. G. R. and Leach, S. J. (1977). The Aminoacid Sequence of Soybean Leghemoglobin c₂. FEBS LETT. 80 (1): 23 - 26.
- Hurrell, J. G. R., Thulborn, K. R., Broughton, W. J., Dilworth, M. J. and Leach, S. J. (1977). Leghemoglobins: Immunochemistry and Phylogenetic Relationships. FEBS LETT. 84 (2): 244 - 246.
- Job, D., Zeba, B., Puppo, A. and Rigaud, J. (1980). Kinetic Studies of the Reaction of Ferric Soybean Leghemoglobins with Hydrogen, Peroxide, Cyanide and Nicotinic Acid. EUR. J. BIOCHEM. 107: 491 - 500.
- Jordan, D. C., Grinyer, I. and Coulter, W. H. (1963). Electron Microscope of Infection Threads and Bacteria in Young Root Nodules of Medicago sativa. J. BACTERIOL. 86: 125 - 137.
- Karnovsky, M. J. (1965). A Formaldehyde - Glutaraldehyde Fixative of High Osmolarity for Use in Electron Microscope. J. CELL BIOL. 27: 137 A.
- Lee, J. S., Brown, G. G. and Verma, D. P. S. (1983). Chromosomal Arrangement of Leghemoglobin Genes in Soybean. NUCL. ACIDS RES. 11 (16): 5541 - 5553.
- Lehtovaara, P., Lappalainen, A. and Ellfolk, N. (1980). The Amino Acid Sequence of Pea (Pisum sativum) Leghemoglobin. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA. 623: 98 - 106.
- Lesk, A. M. and Chothia, C. (1980). How Different Amino Acid Sequences Determine Similar Protein Structures: The Structure and Evolutionary Dynamics of the Globins. J. MOL. BIOL. 136: 225 - 270.
- Lewin, R. (1981). Evolutionary History Written in Globin Genes. SCIENCE. 214: 426 - 429.
- Lewin, R. (1982). Can Genes Jump Between Eucaryotic Species? SCIENCE. 217: 42 - 43.

- Lewin, R. (1984). Surprise Finding with Insect Globin Genes. SCIENCE. 226: 328.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Lewis Farr, A. and Randall, R. J. (1951). Protein Measurement with the Folin Penol Reagent. J. BIOL. CHEM. 193: 265 - 275.
- Luft, J. H. (1961). Improvements in Epon Resins Embedding Methods. J. BIOPHYS. BIOCHEM. CYTOL. 9: 409 - 410.
- Ollis, D. L., Appleby, C. A., Colman, P. M., Cutten, A. E., Mitchell Guss, J., Venkatappa, M. P. and Freeman, H. C. (1983). Crystal Structure of Soybean Ferric Leghemoglobin a Nicotinate at a Resolution of 3.3 Å. AUST. J. CHEM. 36: 451 - 468.
- Paul, K. G., Theorell, H. and Akesson, A. (1953). The Molar Light Absorption of Pyridine Ferroprotoporphyrin (Pyridine Hemocromogen). ACTA CHEM. SCAND. 7 (9): 1284 - 1287.
- Peterson, A. (1975). Intercambiadores Celulósicos de Iones. El Manual Moderno. México. 149 pp.
- Posgate, J. R. (1974). Evolution within Nitrogen - Fixing Systems. SYM. SOC. GEN. MICROBIOL. 24: 263 - 292.
- Puppo, A., Dimitrijevik, L. and Rigaud, L. (1982). Possible Involvement of Nodule Superoxide Dismutase and Catalase in Leghemoglobin Protection. PLANTA. 156: 374 - 379.
- Racker, E. (1976). A New Look at Mechanisms in Bioenergetics. Academic Press. USA.
- Reibach, P. H., Mask, P. L. and Streeter, J. G. (1981). A Rapid One Step Method for the Isolation of Bacteroids from Root Nodules of Soybean Plants, Utilizing Self - Generating Percoll Gradients. CAN. J. MICROBIOL. 27: 491 - 495.
- Richardson, M., Dilworth, M. J. and Scawen, M. D. (1975). The Amino Acid Sequence of Leghemoglobin I from Root Nodules of Broad Bean (Vicia faba). FEBS LETT. 51 (1): 33 - 37.
- Santander, G. R. (1968). Técnicas de Microscopía Electrónica en Biología. Ed. Aguilar. Madrid, España. 666 pp.
- Segel, I. H. (1976). Biochemical Calculations. John Wiley & Sons. NY. USA. 441 pp.
- Sievers, G., Huntala, M. L. and Ellfolk, N. (1978). The Primary Structure of Soybean (Glycine max) Leghemoglobin c. ACTA CHEM. SCAND. SER: B. 32 (5): 380 - 386.
- Thulborn, K. R., Nanasian, E. and Leach, S. J. (1979). Leghemoglobin from Trifolium subterraneum: Purification and Characteriza

- tion. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA. 578: 476 - 483.
- Uheda, E. and Syóno, K. (1982a). Physiological Role of Leghemoglobin Heterogeneity in Pea Root Nodule Development. PLANT & CELL PHYSIOL. 23 (1): 75 - 84.
- Uheda, E. and Syóno, K. (1982b). Effects of Leghemoglobin Components on Nitrogen Fixation and Oxygen Consumption. PLANT & CELL PHYSIOL. 23 (1): 85 - 90.
- Vainshtein, B. K., Harutyunyan, E. H., Kuranova, I. P., Borisov, V. V., Sosfenov, N. I., Pavlovsky, A. G., Grebenko, A. I. and Konareva, N. V. (1975). Structure of Leghemoglobin from Lupin Root Nodules at 5 Å Resolution. NATURE. 254: 163 - 164.
- Verma, D. P. S. and Ball, S. (1976). Intracellular Site of Synthesis and Localization of Leghemoglobin in Root Nodules. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 73 (11): 3843 - 3847.
- Verma, D. P. S., Ball, S., Guérin, C. and Wanamaker, L. (1979). Leghemoglobin Biosynthesis in Soybean Root Nodules. Characterization of the Nascent and Released Peptides and the Relative Rates of Synthesis of the Major Leghemoglobins. BIOCHEMISTRY. 18 (3): 476 - 483.
- Williams, B. L. and Wilson, K. (1979). Principles and Techniques of Practical Biochemistry. Edward Arnold Ed. Great Britain. 256 pp.
- Wittemberg, J. B., Bergersen, F. J., Appleby, C. A. and Turner, G. L. (1974). Facilitated Oxygen Diffusion: The Role of Leghemoglobin in Nitrogen Fixation by Bacteroids Isolated from Soybean Root Nodules. J. BIOL. CHEM. 249 (13): 4057 - 4066.