

03062-

2ej 0 9



Universidad Nacional Autónoma de México

Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de
Posgrado del Colegio de Ciencias y Humanidades

BIOLOGIA MOLECULAR DE LA SIMBIOSIS *Rhizobium*-FRIJOL:
INDUCCION DE GLUTAMINA SINTETASA DE NODULOS DE
FRIJOL DURANTE EL DESARROLLO

T E S I S

Para obtener el grado de Maestro
en Investigación Biomédica Básica
p r e s e n t a

Jaime Enrique Padilla Acero



Centro de Investigación Sobre Fijación de Nitrógeno

Cuernavaca, Mor.



1987



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

Pág.

I.	INTRODUCCION GENERAL.....	1
II.	ANTECEDENTES DE ESTE TRABAJO.....	4
	-La fijación y la asimilación biológica en el ciclo del nitrógeno.	
	-La incorporación y asimilación de nitró- geno en vegetales.	
	-La fijación simbiótica en el frijol y otras leguminosas.	
	-El proceso de nodulación, la histología y la fisiología del nódulo.	
	-Genética de la nodulación y fijación simbiótica en <u>Rhizobium</u> .	
	-Biología molecular de la simbiosis <u>Rhizobium</u> -leguminosa.	
	-Estructura y función de las GS en vegetales.	
III.	OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO.....	11
IV.	MATERIAL Y METODOS.....	13
V.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	17
	-Parte I	(17)
	-A N E X O. PRUEBAS IMPRESAS de: "Nodule-specific glutamine synthetase is expressed before the onset of nitrogen fixation in <i>Phaseolus vulgaris</i> L." (En vías de publicación en <u>Plant Molecular Biology</u> Vol.9 No.1, pp.65-74, 1987.)	(19)
	-Parte II	(34)
VI.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	40
VII.	BIBLIOGRAFIA.....	43

INTRODUCCION GENERAL

Los vegetales y muchos microorganismos satisfacen sus requerimientos de nutrientes y de agua obteniéndolos del suelo y del aire. Resulta notable sin embargo, que el nitrógeno gaseoso que abunda en la atmósfera sea prácticamente inutilizable por estos organismos, a menos que éste se encuentre combinado químicamente en forma de iones nitrato o amonio, o bien, en ciertos compuestos orgánicos. La capacidad de algunos microorganismos para convertir el nitrógeno atmosférico en amonio se conoce como la fijación biológica de nitrógeno.

Desde hace tiempo, la fijación de nitrógeno ha centrado la atención de muchos grupos de investigación involucrados con la microbiología agrícola y la nutrición mineral de las plantas. La importancia de este proceso, tanto en ecosistemas naturales como en agrosistemas, es cada vez más relevante; la investigación sobre este fenómeno ha sido estimulada particularmente por las necesidades alimentarias de países en desarrollo, por el incremento en el costo de producción de los fertilizantes nitrogenados, y también por las demandas hacia un uso ecológicamente más adecuado de estos recursos en la agricultura, así como de los hidrocarburos utilizados en su elaboración (Hardy y Havelka 1975 Evans y Barber 1977, NAS 1981).

La habilidad para fijar el nitrógeno atmosférico es patrimonio de un amplio espectro de microorganismos, tales como las cianobacterias, algunas arqueobacterias y actinomicetos, y diversas eubacterias (Posgate 1981). Cada uno de ellos ocupa un lugar importante en el ciclo del nitrógeno de ciertos ecosistemas. Sin embargo, bajo condiciones naturales se calcula que los más altos índices de fijación de nitrógeno se encuentran en las asociaciones simbióticas de estos procariotes con plantas superiores (Vincent 1974, Posgate 1981). Estas asociaciones se llevan a cabo dentro de estructuras especializadas, que funcionan gracias al establecimiento de un intercambio metabólico que ofrece ventajas mutuas para el hospedero y los microsím-

biontes.

Los nódulos radiculares formados por la infección de eubacterias del género Rhizobium en leguminosas son, al momento, los sistemas simbióticos mejor conocidos y los de mayor importancia agrícola, ya que con su actividad participan en el incremento de la productividad vegetal y en el recambio de nitrógeno, restaurando parcialmente la fertilidad de suelos agrícolas de temporal bajo condiciones de asociación o rotación de cultivos (NAS 1981, Graham 1984).

Por otro lado, los avances recientes en las áreas de la bioquímica, la genética y la biología molecular de microorganismos y plantas, han permitido ampliar con más detalle el conocimiento de los eventos y mecanismos moleculares involucrados en la asociación y fijación simbióticas (Robertson y Farnden 1980, Verma y Long 1983), suministrando un cierto número de posibilidades de manipular los factores biológicos y las condiciones ambientales que afectan estos procesos (Andersen et al. 1980, Phillips y Teuber 1985, Devine 1984). Estos conocimientos pueden contribuir a entender y preservar mejor las biocenosis naturales (NAS 1981), y también a mejorar la productividad vegetal de las áreas destinadas a los cultivos básicos (Phillips 1983).

En el caso de México, los esfuerzos de algunos grupos de investigación se han concentrado en el estudio de la asociación Rhizobium phaseoli-Phaseolus vulgaris (frijol común), debido a que este sistema simbiótico representa un modelo de investigación muy relevante. Algunos argumentos que lo justifican son, por un lado, que el cultivo de frijol ocupa una porción considerable de las áreas agrícolas del país, y que como es sabido, provee junto con el maíz el mayor aporte proteico en la dieta de muchos mexicanos; por otro lado, el conocimiento y la manipulación de los factores y mecanismos biológicos relevantes de la simbiosis diazotrófica en este sistema, podría incidir en la resolución de problemas técnicos fundamentales para la agricultura, como son la disponibilidad de fertilizantes y la productividad de otros cultivos.

✓ Dentro de los distintos niveles de estudio en este respecto, se ha intensificado la proposición y realización de proyectos de

investigación enfocados sobre el metabolismo nitrogenado en plantas y sobre la biología molecular de la simbiosis Rhizobium-frijol (Lara et al.1984, Campos et al.1987). El presente trabajo en particular, está integrado en ambas perspectivas, ya que abarca la descripción del fenómeno de inducción de una enzima del vegetal (glutamina sintetasa), la cual participa en la asimilación de amonio en los nódulos radiculares y asimismo ha resultado ser un "marcador" molecular específico del desarrollo de esta simbiosis.

II. ANTECEDENTES DE ESTE TRABAJO

La fijación y la asimilación biológicas en el ciclo del nitrógeno.

Dentro del ciclo biogeoquímico de este elemento, la fijación y la asimilación tienen un lugar destacado, ya que representan la "entrada" de nitrógeno a la poza orgánica que circula por la biósfera (Postgate 1981). Con base en estudios y cálculos teóricos, se ha discutido si el equilibrio del balance global del nitrógeno en la naturaleza está regulado básicamente por estos procesos, no obstante, se ha postulado que las alteraciones en la recirculación de esta poza en los agrosistemas (cosecha, desnitrificación, incendios, etc.) han generado condiciones limitantes para aumentar la productividad vegetal (Payne y Grant 1981). El conocimiento de la magnitud y regulación de estos procesos es importante para determinar la capacidad productiva de estos sistemas, y definir criterios útiles para la conservación y utilización de los recursos naturales.

La incorporación y asimilación de nitrógeno en vegetales.

La productividad de los ecosistemas depende en última instancia de la capacidad de los organismos fotosintéticos para incorporar los compuestos inorgánicos de carbono, nitrógeno y otros elementos en biomasa. Las plantas terrestres disponen de los iones solubles de amonio y nitrato del suelo, los cuales son producto de la fijación por microorganismos de vida libre, de la fijación abiótica y de la mineralización de la materia orgánica en descomposición. Estos iones son incorporados por las raíces a través de un proceso activo (Huffaker y Rains 1978). El nitrato (NO_3^-) se reduce a amonio (NH_4^+) dentro de algún compartimento (hojas o raíces), por medio del sistema enzimático

nitrito reductasas (Jackson y Volk 1981). El amonio resultante, o el que es incorporado directamente, es asimilado en esqueletos carbonados tanto en las raíces (Oaks y Hirel 1985) como en las hojas. Se ha demostrado en los vegetales que la vía enzimática principal para la asimilación del amonio, es la que ocurre a través de la glutamina sintetasa (GS) y la glutamato sintasa (GOGAT). La reacción que es catalizada por la glutamato deshidrogenasa (GDH) no parece ocurrir en niveles significativos en relación a la magnitud de la asimilación primaria (Mifflin 1980, Robertson y Farnden 1980). La glutamina y el glutamato sintetizados participan como donadores de nitrógeno hacia una gran cantidad de compuestos orgánicos por medio de reacciones de amidación reductiva y transaminación (Mifflin 1980). Algunos de estos compuestos (amidas, aminoácidos, ureidos) participan también como transportadores de nitrógeno orgánico hacia el resto de la planta (Pate 1980). En los nódulos de leguminosas, la GS de la fracción vegetal del nódulo es responsable directa de la asimilación del amonio producido y secretado por el microsimbionte (Meeks et al. 1978, Mifflin et al. 1985).

La fijación simbiótica en el frijol y las leguminosas.

El frijol común pertenece a la familia Leguminosae, que cuenta con una cantidad de especies descritas (ca. 15 000) solamente superada por las plantas compuestas y las orquídeas (NAS 1981). El origen de esta familia aún se discute, pero se han establecido relaciones con el tronco de las rosáceas (Heywood 1971). Se ha postulado asimismo que parte de su amplia diversificación y distribución, pudieron ser favorecidas por las asociaciones simbióticas diazotróficas que establecen estas plantas con Rhizobium, lo cual confirió ventajas ecológicas considerables a este grupo vegetal. Es sugerente el hecho de que dentro de las tres subfamilias de leguminosas, se ha encontrado una proporción creciente de especies con capacidad de ser noduladas, partiendo del grupo más antiguo: en la subfamilia de las caesalpinoides y subsecuentemente en las mimosoideas se han

podido describir sólo algunas especies con capacidad simbiótica; en las papilionoideas (al que pertenece el frijol y gran parte de las leguminosas de interés agrícola), prácticamente la mayoría de los ejemplares examinados presentan nódulos (Allen y Allen 1981, Posgate 1981). Este análisis parece indicar una coevolución de la asociación simbiótica que permitió, probablemente, la colonización de los ambientes templados, en donde varios tipos recientes de leguminosas se hallan más representados.

Dentro del género Phaseolus existen varias especies con usos agrícolas, pero las variedades más conocidas de frijoles domesticados, criollos y mejorados, pertenecen a la especie P. vulgaris L., de origen y amplia distribución mesoamericana (Allen y Allen 1981). En este trabajo hemos utilizado principalmente el cultivar Negro Jamapa, liberado por INIA; este frijol tiene ciclo corto (60 días), hábito de crecimiento tipo I (mateado) y presenta crecimiento óptimo en regiones templadas y subtropicales. La planta se estudió durante el crecimiento vegetativo (0-35 días), en condiciones de invernadero y cámaras de cultivo, utilizando un régimen hidropónico.

El proceso de nodulación, la histología y la fisiología del nódulo.

Los nódulos radiculares en leguminosas se forman una vez que las bacterias han penetrado a través de las capas exteriores de la raíz, y se han alojado intracelularmente en la zona cortical. Este proceso está asociado al inicio de una serie de cambios morfogenéticos en el tejido vegetal, que ocasionan un crecimiento relativamente organizado de tumorciones vascularizadas distribuidas en la zona superior de la raíz (Vincent 1974, Newcomb 1981). El aspecto que más interesa de la morfología general del nódulo, es la formación de una zona central en donde se observan células infectadas y otras que no han sido invadidas por las bacterias. En las primeras, varias vesículas con membranas de origen vegetal circunscriben a

las bacterias; estas últimas exhiben un estado de diferenciación característico de la condición simbiótica (bacteroide) (Werner et al.1980, Morrison-Baird y Webster 1982). Las membranas peribacteroidales limitan asimismo a una película de citosol, en la cual se observan escasos organelos y están contenidas también una serie de enzimas que participan en el metabolismo básico del nódulo (fracción soluble) (Robertson y Farnden 1980, Reynolds et al.1982). Las células no infectadas poseen una vacuola central y cantidades variables de amiloplastos y peroxisomas; se ha demostrado una participación especial de estos últimos en el metabolismo de compuestos nitrogenados de exportación, en nódulos de algunas leguminosas (Nguyen et al.1985). Existen en el nódulo, además, otros tipos celulares como son el tejido meristemático, el vascular y el parénquima cortical, que van ocupando un espacio determinado durante el desarrollo de este órgano simbiótico.

Dentro del tejido nodular se realizan una serie de reacciones metabólicas encaminadas básicamente, al suministro de derivados del fotosintato para la actividad del bacteroide (Dilworth y Andrew 1984); al control del flujo de gases, especialmente de oxígeno, el cual debe permanecer en niveles tales que permitan la respiración del microsimbionte sin dañar al complejo multienzimático de la nitrogenasa bacteriana (Gallon 1981), y a la asimilación del amonio y el metabolismo de los compuestos nitrogenados para su posterior exportación a la parte aérea de la planta (Mifflin 1980).

Es interesante conocer la distribución intercelular y la localización intracelular de ciertos procesos bioquímicos para poder esclarecer las vías metabólicas que ocurren durante la simbiosis, así como la función y los mecanismos de regulación que controlan la expresión y actividad de las proteínas que participan en tales procesos. Aunque se ha descrito en algunas leguminosas que la GS de nódulos es una enzima citosólica (Awonaike et al.1984), resultados preliminares indican que una porción de la GS de frijol puede estar asociada a fracciones particuladas (Ortega JL y M Lara, datos no publicados), abriendo la posibilidad de que ésta actúe en un compartimento subcelular especial, o bien, en la interfase bacteroide-planta.

Genética de la nodulación y fijación simbiótica en Rhizobium.

Las eubacterias del género Rhizobium poseen la capacidad de infectar a las leguminosas (y a algunos ejemplos en otras familias), por medio de mecanismos relativamente comunes. Es relevante el hecho de que en el estado final de la infección, se observa una organización estructural y funcional similar, es decir, la fijación de nitrógeno ocurre dentro de estructuras localizadas (Vincent 1974). Han sido descritas, sin embargo, características distintivas en algunos grupos (e.g. nódulos con meristemas apical o radial, infección intrsticial), y modalidades particulares en algunas parejas simbióticas (nódulos caulinares) (Allen y Allen 1981). Estos hechos ponen de manifiesto cierta diversidad de los mecanismos para efectuar la infección y alcanzar el estado simbiótico (Newcomb 1981).

La organización y estructura de las regiones del genoma bacteriano que confieren la capacidad para nodular y fijar nitrógeno, ha sido extensamente estudiada en este género, especialmente en el grupo denominado de "crecimiento rápido", al que R. phaseoli pertenece (Hombrecher et al. 1981). Aunque Rhizobium se ha clasificado de acuerdo al concepto de especificidad por planta hospedera (Grupos de Inoculación Cruzada), los avances recientes en la caracterización microbiológica con base en enfoques bioquímicos y genéticos, ha dado origen a nuevos criterios para la taxonomía de Rhizobium, utilizando un sistema de tipo fenético; bajo estas condiciones la especie R. phaseoli se denomina ahora R. leguminosarum bv. phaseoli (Elkan 1984).

En R. phaseoli la información genética involucrada con la capacidad para nodular (genes nod) y para fijar nitrógeno (genes nif y fix) se halla localizada en megaplásmidos que pueden ser transferidos a, y mutagenizados en otras especies bacterianas (cf. Quinto et al. 1985, Martínez et al. 1987). El estudio de estas funciones por métodos genéticos y por técnicas de biología molecular ha propiciado la generación de cepas bacterianas con alteraciones en el genotipo relacionado a la simbiosis (Noel et al. 1984, E. Morett, datos no publicados). Existen también cepas

de rhizobia que han sido aisladas de nódulos de leguminosas, algunas de las cuales están alejadas filogenéticamente del frijol. Estas cepas tienen capacidad de infectar y nodular a la planta de frijol, pero produciendo nódulos inefectivos, es decir, incapaces de reducir nitrógeno atmosférico (Martínez et al. 1985). Todos estos avances han permitido utilizar algunas de estas cepas para evaluar el efecto de distintos genotipos bacterianos en el desarrollo de la simbiosis, haciendo énfasis en el análisis de la expresión de GS y de proteínas específicas en los nódulos (Conde 1986, Campos et al. 1987).

Biología molecular de la simbiosis Rhizobium-leguminosa.

Desde un punto de vista ontogenético, se ha tratado de caracterizar la simbiosis entre Rhizobium y las leguminosas con base en la expresión diferencial y secuencial de una serie de transcritos y productos polipeptídicos que aparecen específicamente en el tejido nodular (Bisseling et al. 1984, Verma et al. 1986). Se ha propuesto que muchos de estos componentes (nodulinas), participan de manera relevante en la estructura y funcionamiento de este órgano. En este momento, las leghemoglobinas, la uricasa II y al parecer, isozimas de xantina deshidrogenasa (XDH) y colina cinasa (CoK), son las únicas nodulinas cuya función ha sido identificada, además de la GS específica de nódulos de frijol. No obstante, existe aún una serie de proteínas y productos de traducción *in vitro*, a los cuales no ha sido posible establecer su función y localización particulares. Los genes que los codifican parecen inducirse por señales morfogénicas derivadas de la infección bacteriana, y los productos sintetizados deben participar en la formación y las funciones del nódulo en distintos compartimentos (Verma y Long 1983). Es posible que algunas de estas nodulinas posean capacidades catalíticas y mecanismos de regulación distintos a los de sus isozimas correspondientes en otros tejidos de la planta (Verma et al. 1986). La necesidad de un modelo general del desarrollo y de las funciones del nódulo, ha propiciado el

estudio de algunos "marcadores" morfológicos (estructuras subcelulares), bioquímicos (actividades enzimáticas) y genéticos (transcritos), que estén involucrados con los procesos más importantes de este órgano. Tal es el caso de algunas enzimas del metabolismo nitrogenado, y en especial, de la glutamina sintetasa (Lara et al.1983, Gebhardt et al.1986, Sengupta-Gopalan y Pitas 1986, Tingey et al.1987).

Estructura y función de las GS en vegetales.

La glutamina sintetasa es la única enzima que incorpora el amonio en un grupo amido. En los organismos fotosintéticos participa en la asimilación primaria de amonio y además en la reasimilación que ocurre asociada a la fotorrespiración (Mifflin et al.1985).

Se han descrito varios tipos nativos (isoformas, isozimas) de GS en los distintos órganos que componen a los vegetales superiores; existe un grupo de polipéptidos que constituyen la GS cloroplástica (GS-2), exclusiva de tejido fotosintético, y otro grupo de isoformas (GS-1) compuestas por distintos polipéptidos que tienen una localización citosólica (Hirel et al.1984). En frijol, se ha descrito también una isoforma de GS citosólica que se induce solamente en nódulos (GSn-1) (Cullimore et al.1983). Esta isoforma presenta pocas diferencias con respecto a la isoforma común de los nódulos y las raíces (GSn-2), y está íntimamente relacionada al desarrollo de una fijación efectiva (Lara et al.1983). Al momento de comenzar este trabajo, no se conocía la composición polipeptídica de las enzimas presentes en raíces y nódulos, aunque se había establecido que la inducción de la isoforma de GS específica de nódulos coincidía con la aparición de leghemoglobina y la actividad de nitrogenasa. Durante el transcurso de este proyecto se demostró que la isoforma GSn-1 está compuesta mayoritariamente por un polipéptido nódulo-específico (GS-gamma), que posee un peso molecular y un punto isoeléctrico ligeramente mayores al de los polipéptidos de GS que se encuentran también en otros tejidos

del frijol (Lara et al.1984). Posteriormente se describió la existencia de una familia multigénica de GS en frijol, que presuntamente codifica para cada uno de los monómeros reportados (Gebhardt et al.1986).

III. OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO

Dentro del contexto de la biología molecular de la simbiosis se han abordado distintos enfoques tanto bioquímicos, inmunológicos como genéticos para la identificación de las nodulinas y para el conocimiento de sus funciones. El interés por conocer la expresión genética y la regulación metabólica de los nódulos de la planta, así como los factores del microsimbionte que condicionan estos procesos, tiene por objeto determinar la participación del genoma vegetal en la formación y funcionamiento de los nódulos, y asimismo, conocer algunos de los factores relacionados con la fijación efectiva en nódulos de frijol. Estas ideas previas nos impulsaron a utilizar a la glutamina sintetasa específica del nódulo de frijol, como un modelo global para el estudio de la regulación de la expresión de nodulinas, ya que fué posible determinar algunos parámetros de la enzima (niveles de actividad, concentración de antígeno, proporción de monómeros de GS sintetizados *in vivo* e *in vitro*), a partir de nódulos de distintas edades y formados por diferentes tipos de cepas. Por tanto, los objetivos de este proyecto se resumen en:

- Describir algunas características distintivas del polipéptido de GS específico de nódulos.
- Determinar el patrón de expresión de la GS-gama durante el desarrollo de nódulos efectivos.
- Caracterizar las condiciones indispensables de la inducción de GS-gama durante la simbiosis.

En este tesis se incluyen resultados enviados a publicación, sobre la cinética temporal de la inducción de GS y nitrogenasa durante el desarrollo de nódulos efectivos e inefectivos de

frijol. Se discuten además, algunos resultados complementarios sobre la estructura y función de las GS en nódulos de frijol.

IV. MATERIAL Y METODOS.

En esta sección solo haré mención de las modificaciones sustanciales a los procedimientos citados en la publicación, algunos de los cuales no están descritos con amplitud; asimismo haré comentarios sobre algunos detalles y ventajas particulares de los materiales y métodos utilizados.

a.) Métodos de crecimiento de plantas e inoculación. El material biológico (raíces y nódulos), fué obtenido a partir de plantas crecidas en invernadero bajo régimen de hidroponía. El soporte utilizado en las macetas, consistió de vermiculita de grano fino. En estas condiciones, la humedad se mantiene de manera adecuada y es posible recuperar raíces intactas con facilidad. El inóculo bacteriano fué aplicado sobre semillas pregerminadas y previamente sembradas en la maceta, lo que asegura una uniformidad en el tamaño de las plantas y en la distribución de los nódulos.

b.) Colecta de material biológico. Los nódulos fueron cosechados en general por la tarde, para evitar la desecación rápida del tejido. La fijación de nitrógeno se determinó en raíces noduladas a partir del mediodía, ya que se han observado valores mas altos de reducción de acetileno (ver adelante) en plantas sometidas a intensidades luminosas elevadas (Rainbird et al. 1983). Los nódulos colectados para la extracción de proteína y RNA fueron congelados en hielo seco después de la cosecha, y posteriormente a 70° C hasta el momento de utilizarlos.

c.) Métodos de extracción y fraccionamiento. Los extractos de proteína soluble de nódulo fueron obtenidos en presencia de antioxidante, inhibidor de proteasas, y en algunas ocasiones, de polímeros orgánicos que adsorben compuestos fenólicos y taninos. En estas condiciones, la actividad de GS en los extractos es estable por lo menos 36 hrs. En algunas circunstancias, fué

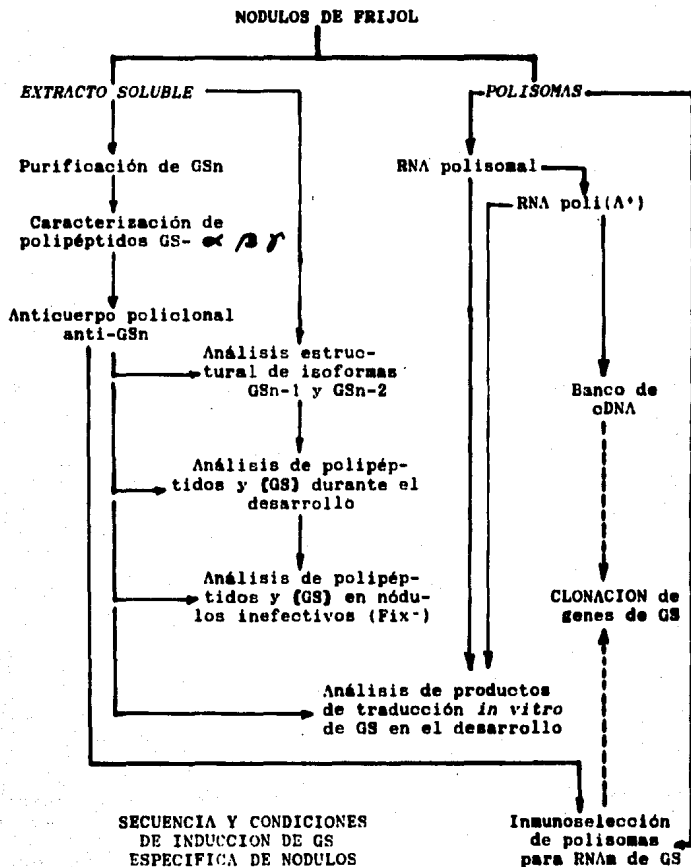
necesario ultracentrifugar los extractos con el fin de mejorar su fluidez en columnas, y la diálisis se utilizó para evitar la interferencia de iones y metabolitos acumulados en el nódulo con los procedimientos subsiguientes.

d.) **Determinaciones de actividad enzimática.** La actividad de nitrogenasa fue determinada por el ensayo de reducción de acetileno. La incubación de los nódulos en presencia de este gas (4% v/v) se efectuó, como máximo, durante 90 min, que corresponde aún al intervalo lineal de la cinética de producción de etileno. Para la curva de calibración se utilizó un estándar de etileno sintetizado en el laboratorio (con la gentil ayuda del Dr. Martín-Polo); los valores típicos de actividad de nitrogenasa, expresados como nmoles de etileno por hora por planta, están en el mismo orden de magnitud que los descritos para frijol y otras leguminosas (Robertson y Farnden 1980), sin embargo, en este caso la sensibilidad fué mas alta, considerando los datos publicados.

e.) **Electroforesis de proteínas e inmunodetección de GS.** Para el análisis de los polipéptidos de GS en nódulos se utilizó la electroforesis bidimensional, que permitió discriminar con precisión la presencia de cada uno de los monómeros de GS de frijol en los distintos estados de desarrollo. Posteriormente, con la ayuda del antisuero anti-GS, fué posible utilizar la técnica de inmunodetección tipo "Western" en geles monodimensionales, y revelar el antígeno por un ensayo inmunoenzimático. Esto permitió la evaluación de la cantidad relativa de GS total en nódulos, a partir del análisis densitométrico de las bandas detectadas. Para cuantificar este parámetro se probaron con anterioridad, tanto la inmunodetección en punto como la inmunoelectroforesis cuantitativa, no obstante, la reproducibilidad y la sensibilidad de estos métodos no fueron satisfactorias. La cantidad máxima relativa del antígeno de GS presente en nódulos, obtenida por el primer procedimiento (ID), concuerda aproximadamente con los datos de purificación de la enzima (PF); (ID=2.94% vs. PF=2.17%).

f.) Inmunoprecipitación de GS. El análisis de la presencia y proporción de monómeros de GS en extractos de proteína y en los productos de traducción *in vitro* se llevó a cabo por inmunoprecipitación indirecta. En los extractos solubles de proteína, el segundo anticuerpo que se utilizó consistió en anti-IgG de conejo obtenido de cabra (Goat-Anti-Rabbit, GAR), mientras que en los productos de traducción *in vitro*, el segundo paso se efectuó con base en una incubación con células fijadas de Staphylococcus aureus, las cuales poseen en su membrana la denominada proteína "A", que une IgG's por el fragmento constante (Fc). En ambos casos, los complejos antígeno-anticuerpos fueron precipitados, lavados y sometidos a electroforesis bidimensional.

La estrategia global para la descripción de la glutamina sintetasa específica de nódulos, en cuanto a su secuencia temporal de inducción, y en cuanto a algunas condiciones involucradas con su expresión, se resume en el siguiente diagrama:



V. RESULTADOS Y DISCUSION

(Parte I)

1. Purificación de GS de nódulos y caracterización preliminar del polipéptido específico de nódulos.

Durante la fase inicial del trabajo de investigación se llevó a cabo la purificación y caracterización de la enzima Glutamina sintetasa de nódulos (GSn) de frijol, la cual fué anteriormente publicada (Lara M, Porta H, Padilla J, Folch J, Sánchez F. 1984. *Plant Physiol.* 76:1019-1023). A partir del protocolo reportado se obtuvieron fracciones de enzima purificada a homogeneidad; los cálculos finales indicaron que la GS representa alrededor del 2% de la proteína soluble de nódulos. Cabe mencionar que en este proceso se purificó la fracción completa con actividad de transferasa, sin hacer el fraccionamiento de las isoformas de GS reportadas en nódulos de frijol (Cullimore, et al.1983). Con base en el análisis del patrón en electroforesis bidimensional de las enzimas purificadas de nódulos y raíces no infectadas, concluimos que la GS citosólica de frijol se compone de tres polipéptidos de peso molecular semejante (aprox. 43 Kd), pero con distintos puntos isoeléctricos: La GS-alfa (pI=5.2) está presente en embriones y raíces (Ortega et al.1986), pero no se detectó en la GS purificada de nódulos maduros; la GS-beta (pI=5.8) es común al tejido de raíces y nódulos, y la GS-gamma (pI=6.6) se encontró únicamente en nódulos. La presencia órgano-específica de este último polipéptido ha sido confirmada por otros métodos (e.g. inmunodetección, traducción *in vitro*), y asimismo, por otros autores (Cullimore, et al.1984. Gebhardt, et al.1986.).

Con el uso de un antisuero anti-GSn se llevó a cabo un análisis por inmunodifusión doble (Ouchterlony), el cual reveló que existe una diferencia antigénica entre las enzimas purificadas de raíces y nódulos. El espolón correspondiente a la banda de inmunoprecipitación de la GSn puede atribuirse seguramente a los determinantes antigénicos específicos del

monómero GS-gama. Por medio de inmunolectroforesis no cuantitativa fué posible observar también, una migración diferencial entre los antígenos de GS de raíces y nódulos, tanto en forma purificada, como en extractos. Estos resultados indican que las variaciones en la composición polipeptídica se ve reflejada en algunos parámetros fisicoquímicos de las holoenzimas.

La relación entre las isoformas nativas de GS de nódulo (GSn-1 y GSn-2) y los polipeptidos encontrados por isoelectroenfoque, parece ser mas compleja que la del modelo concebido inicialmente (ver Parte II). Esta aseveración se ve apoyada por diversos resultados obtenidos en nuestro departamento, y por otros investigadores. Por ejemplo, los cambios en la movilidad electroforética de la banda de actividad de GSn-1 de nódulos de P. vulgaris (Robert y Wong 1986) y la variación en las proporciones relativas de GS-beta y GS-gama durante el desarrollo descrita en este trabajo, sugieren la existencia de una serie continua de isoformas durante el desarrollo.

2. Inducción de glutamina sintetasa específica de nódulos durante el desarrollo de nódulos.

El conjunto de resultados obtenidos subsiguientemente, fueron sometidos a publicación en *Plant Molecular Biology*. Hemos recibido ya la aprobación del editor; el impreso anexo, comprende la versión corregida de las pruebas que enviamos recientemente y que serán publicadas en 1987 dentro del Vol. 9, No. 1, pp.65-74. Un juego extra de las figuras se incluye por razones de claridad.

Author

4: 65-74

15 (19)

Plant Molecular Biology 6: 000-000 (1987)
© Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht - Printed in the Netherlands

PLAN-0022

Nodule-specific glutamine synthetase is expressed before the onset of nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L.

Jaime E. Padilla, Francisco Campos, Victor Conde, Miguel Lara & Federico Sánchez
Departamento de Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, U.N.A.M., Apedado Postal 565-A, Cuernavaca, Mor. México

Received 20 November 1986; in revised form 10 March 1987; accepted 13 April 1987

Key words: glutamine synthetase polypeptides, nitrogen fixation, root-nodule development, nodulins, *Phaseolus vulgaris*

Abstract

Glutamine synthetase expression was studied in developing root-nodules of common bean with regard to the time-course of specific activity, antigen accumulation, polypeptide composition and *in vitro* translation products. This analysis shows that the nodule-specific GS polypeptide (GS-gamma) is detected prior to the nitrogenase acetylene-reducing activity, and that its accumulation together with that of the GS-alpha and GS-beta polypeptides vary with nodule age. GS-gamma is present in ineffective nodules, although in a lower ratio to GS-beta as than in wild-type nodules. Comparisons of *in vitro* translated and *in vivo* synthesized GS polypeptides suggest no post-translational modifications. The possible factors and mechanisms involved in the regulation of expression of GS polypeptides are discussed.

Introduction

The infection of legume roots with soil bacteria of the genus *Rhizobium* results in the formation of highly specialized organs: the nodules. Bacteroids fix the atmospheric nitrogen in mature nodules through the nitrogenase enzyme system. The resulting ammonia is secreted into the host-plant cytosol and is assimilated by the glutamine synthetase/glutamine synthase pathway [23]. The assimilated ammonia is distributed into organic compounds and exported to the rest of the plant [31].

The formation of a nodule involves the expression of a number of genes from both symbionts [4, 31, 39]. Some host-specific proteins (nodulins) and their transcripts have been described [2, 18], but the function of only few nodulins is known [3, 7, 22]. The induction of several nodulins and their ac-

cumulation patterns in developing nodules have been determined [4, 11].

The plant glutamine synthetase (GS) (EC 6.3.1.2) is a key enzyme involved in primary and secondary ammonia assimilation [23]. The cytosolic GS from some plants have been described as 320-380 kDa octameric enzymes; these isoforms are immunologically different from the heavier chloroplastic GS [13]. A novel GS isoform from nodules formed by *Phaseolus vulgaris* (GSn-1) has been purified [7]. Chromatographic and immunological criteria have also been used to distinguish the GSn-1 from the GSn-2 isoform [8]. GSn-2 is present both in root and nodule tissues but GSn-1 is only found in nodules [15]. No major differences in their kinetic parameters have been found yet, except for the ratios of transferase/synthetase activity [7]. The polypeptide composition of purified nodule GS showed

Ditasteriumnummer : D-3
Registernummer werk : 14-08-87
Ordernummer : 728330
Beamsidentif : Nijhoff
Werkstaal : PLAN
Artikelnnummer : 0022

Vanaf beslist : 001
Weggeschreven onder : prof nih plan-rw
Naam aafsteller : Agla Naruru-Brune
Administratienummer : 1509
Toetsenbordnummer : 1422

the presence of a tissue-specific monomer (GS-gamma), which is the main component of the GS α -1 isoform [16]. *P. vulgaris* GS polypeptides are encoded by a multigenic family as inferred from the nucleotide sequences of three cDNA clones recently described [8, 12]. Differential expression of nodulic GS has been found in peas [35], but nodule-specific gene products of the enzyme are not present, as have been reported in soybeans [33].

The study of nodule-specific GS from *P. vulgaris* is a valuable model to gain insight into the elucidation of some developmental and environmental conditions concerned with nodulin induction and nodule differentiation. We are interested to know the elements involved in the regulation of GS polypeptides in nodules and also in the polypeptide composition and *in situ* localization of native oligomers of GS isoforms. We report here that the appearance of GS-gamma is not conditioned by nitrogenase activity and that GS activity and total antigen are coordinately induced. We also report the composition of *in vivo* and *in vitro* synthesized GS polypeptides during the development of effective and ineffective nodules of common bean.

Materials and methods

Plant culture and inoculation

Seeds of *Phaseolus vulgaris* L. cv. Negro Jamaica (PRONASE, México) were surface-sterilized and germinated for 48 h on moist-sterile towels. Seedlings were transferred to 30-cm pots filled with sterile vermiculite and inoculated with 1 ml of a late-log phase FY medium culture [23] of a rifampicin-resistant derivative of *Rhizobium phaseoli* strain CIAT899 [20]. This strain devoids of *nifH* gene insertions [25]. Other strains used were: GM19023 [pLJ::Tn3 mob], a transconjugant of pLJ plasmid-cured strain of *Agrobacterium tumefaciens* with the symbiotic plasmid of CIAT899 (S. Brom, manuscript in preparation); CI180, a nodule-inducing ineffective strain isolated from *Citrois* sp. nodules [20]. Plants were grown under greenhouse conditions as described [27], but were watered every 2nd day with a half-strength nitrogen-free solution [5].

Harvest of plant tissues

Plants of uniform size were selected for nitrogenase activity assays and nodule harvest during development, as indicated in the text. Emerging nodules in *P. vulgaris* roots are macroscopically detected at days 7-8 from inoculation. Nodules can only be dissected from root tissues after days 9-10. Nodulated roots were incubated for acetylene reduction assay [21]. Nodules, hypocotyls and roots were dissected and stored at -70°C. GS activity, polypeptide analysis and RNA isolation were carried out in isolated nodules beginning from days 9-10. Extracts from hypocotyls of seeds germinated for 48 h, and extracts from non-infected roots were used for comparisons.

Enzyme activity measurements

Nitrogenase activity was measured as acetylene-dependent ethylene production by gas chromatography [21]. Results are expressed in μmol ethylene produced per hour per plant. Frozen nodules, roots and hypocotyls were ground in a chilled mortar and pestle with 2, 0.5 and 1 volume of extraction buffer (100 mM Tris-(hydroxymethyl)aminomethane-HCl pH 8.5, containing 10 mM Mg-acetate, 10% v/v glycerol, 10 mM 2-ME (2-mercaptoethanol) and 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)), respectively. The brew was filtered through four layers of cheesecloth and, after centrifugation at 20000 \times g for 20 min, 0.5 ml of the supernatant was desalted on a (20.0 cm \times 0.8 cm) Sephadex G-25 column equilibrated with running buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.3 with 10 mM Mg-acetate, 1 mM 2-ME and 0.1 mM PMSF). All procedures were carried out at 4°C. GS activity was determined by the transferase and synthetase assays as described [10]; units are referred to as μmol gamma-glutamyl-hydroxamate formed $\text{ml}^{-1} \text{min}^{-1}$. Soluble protein was measured by the Lowry [19] and Bradford [34] procedures.

Polypeptide analysis of GS from soluble extracts

An extract volume equivalent to 1.0-2.0 transfer-

delete
[20] change
pLJ::CIAT899b change
[20a] change

ase units was immunoprecipitated according to procedures described elsewhere [32], using an anti-GS antiserum raised against purified nodule GS [16] and goat anti-rabbit (GAR) antibodies. Immunoprecipitates were separated and subjected to two-dimensional gel electrophoresis (2D-PAGE), following the O'Farrell procedure as described [16, 26], and stained with Coomassie-blue R-250.

Immunodetection and GS antigen quantitation

The soluble protein fraction of nodules (35 µg per lane) was subjected to 11% polyacrylamide-SDS gel electrophoresis (SDS-PAGE) [14]. Towbin's electrotransfer procedures [36] were carried out with modified transfer-buffer strength (0.8x) and running conditions (5 h, 150 mA, 4°C). Immunodetection of GS bands was performed by a non-radioactive immunoenzymatic reaction [9], as follows. Incubations were done with 1:1000 diluted anti-GS antiserum and with 1:1000 diluted goat anti-rabbit IgGs coupled to horseradish peroxidase (GAR-Pox, Sigma), both in phosphate-buffered saline solution (PBS) containing 1.5% w/v BSA. GS antigen was visualized on the blots after incubation in PBS containing 0.05% w/v DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, Sigma) in the presence of 0.003% v/v H₂O₂. Immunoblots were photographed on Kodalith acetates and strips of each lane were used for scanning densitometry. Several protein concentrations were assayed by SDS-PAGE to obtain a linear-response range between the purified nodule GS concentration and the band-relative intensity. GS antigen concentration in nodule extracts within this range was expressed as µg GS per mg nodule protein.

Analysis of nodule GS polypeptides from in vitro translation of polysomal or poly(A⁺) RNA

Polyribosomes from nodules were obtained and total RNA was extracted as previously described [27]. Poly(A⁺) RNA was purified by oligo-dT cellulose chromatography. *In vitro* translation of total polysomal (10 µg) or poly(A⁺) (1 µg) RNA was per-

formed in a rabbit reticulocyte lysate system in the presence of [³⁵S]-Met, and counted according to procedures already described [32]. Volumes of translation mixture equivalent to 2.5–5.0 × 10⁵ cpm incorporated in TCA-precipitable material were centrifuged and diluted to 250 µl with PBS 1x solution containing 1 mM PMSF, 0.01% v/v Triton X-100. Samples were incubated with 15 µl of anti-GS antiserum for 1 h at 4°C followed by 10 µl of 10% w/v fixed *Staphylococcus aureus* cells (Sigma), preadsorbed in 'cold' reticulocyte lysate and incubation continued for 30 min with gentle agitation. Insoluble protein-A immunoprecipitates were extensively washed in Kraus' buffer as described [27] and resuspended in O'Farrell lysis buffer [26]. After two freeze-thawing cycles and centrifugation samples were loaded in first-dimension gels. 2-D gels were fluorographed, dried and X-ray films exposed at -70°C.

Results

Time-course of GS activity induction and the onset of nitrogen fixation

Glutamine synthetase specific activity in detached nodules increased 2.8-fold in the transference and 1.7-fold in the synthetase assays from day 10 to day 18 after inoculation (Table 1). The transference/synthetase (T/S) ratio increased 2-fold during nodule development. GS transference and synthetase activities are slightly higher in 10-day-old emerging nodule tissues as compared to un inoculated roots of the same age (Fig. 1). Nitrogen fixation in whole-nodulated roots was first detected on day 13, increasing rapidly from day 15 and reaching maximum levels in the third week. The level of GS specific activity is induced in the plant fraction of nodules before the appearance of the acetylene-reducing activity of nitrogenase.

Nodule GS antigen accumulation

The relative abundance of GS antigen in develop-

Table 1. Correlation of GS activity and antigen levels during the development of *P. vulgaris* nodules.

Extracts from:		GS sp. activity ^a		T/S ratio	Δ[GS] ^b (-fold)	Mol. wt. ^d U(T)/GS
Tissue	day ^c	T	S			
Hypocotiles	0	-	-	3.1	-	0.016
Uninfected roots	10	-	-	N.D.	-	0.003
Nodules	10	1.00	1.00	12.7	1.00	0.196
	11	1.09	1.01	13.9	1.01	0.169
	12	1.07	1.21	11.3	1.21	0.190
	13	1.31	1.33	15.9	2.04	0.119
	14	1.90	1.27	19.1	3.12	0.135
	18	2.77	1.67	21.3	3.09	0.139
	33	2.86	1.30	26.8	2.77	0.161

^a Days from inoculation; hypocotiles were germinated for 3 days.

^b Increments of the GS specific activity from 10-d-old nodules: (day 10 = 1.53 transaminase (T) and 0.118 synthetase (S) units).

^c Increments of the GS antigen concentration from 10-d-old nodules: [GS] was calculated by densitometry of immunoblots; $\Delta[GS] = 9.8$ $\mu\text{g}/\text{mg}$.

^d Molecular activity ratio was calculated from the GS transaminase activity and antigen concentration. SD of nodule ratios = 12%.

ing nodules was analyzed by SDS-PAGE and immunodetection. Increments of the GS antigen concentration in soluble protein extracts from nodules 10 to 18 days old were calculated by densitometric analysis of GS bands on calibrated western immunoblots (Table 1). The gradual accumulation of

total GS antigen correlated with transaminase activity induction. Values of the GS transaminase activity/antigen level ratio from hypocotyl and root extracts were lower than those of nodules. In nodule extracts this ratio remained almost unaltered during development.

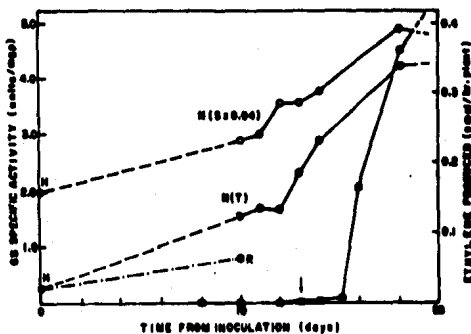


Fig. 7. Enzymatic activities in *P. vulgaris* root systems. GS specific activity was measured by transaminase (\circ), and synthetase (\square) assays in dialyzed protein extracts from hypocotyls (H, day 0); detached nodules (N, 10 to 18 days); uninfected root tissues (R, day 10). The nitrogenase acetylene-reducing activity (\triangle) was first detected in nodulated roots on day 13 (arrow).

GS polypeptides during nodule development

The polypeptide composition of the *in vivo* synthesized GS present in nodules during development is shown in Fig. 2. The GS-gamma polypeptide is already detectable on day 10 from inoculation. Subsequently, the relative amount of GS-gamma increased until it became equivalent to that of GS-beta, from day 14 up to at least day 32. GS-alpha is detectable in nodules throughout development but in a lower proportion in relation to GS-beta, as compared with hypocotyls. The appearance of GS-gamma polypeptide between 10 to 14 days was simultaneous with the initial induction of GS specific activity in nodule extracts. The nodule-specific GS polypeptide was detectable at least three days before the appearance of nitrogen fixation.

GS polypeptides in ineffective nodules

Expression of nodule GS was analyzed with strains

that induce ineffective nodules (<5% nitrogenase activity of controls) on *P. vulgaris*. A lower GS activity and antigen accumulation along with a low GS-gamma to GS-beta ratio were observed (Fig. 3).

Polypeptide analysis of *in vitro* translated GS from total polysomal or poly(A⁺) RNA during nodule development.

The time-course of immunoprecipitated *in vitro* translation products of GS from developing nodules is shown in Fig. 4. The appearance of the GS-gamma *in vitro* translation product was first observed on day 10 (day 11 is shown), while the product of GS-beta was expressed throughout nodule development. The relative amount of GS-gamma product increased from day 11 to 18 becoming the most abundant GS transcript for a transient period. In nodules 20 to 30 days old the GS-beta and gamma products were still present and their relative proportions remained almost identical. The GS-alpha product was still detected on day 13 when the GS-gamma polypeptide was already the main immunoprecipitated product of *in vitro* translation.

The relative position of GS polypeptides on 2D-

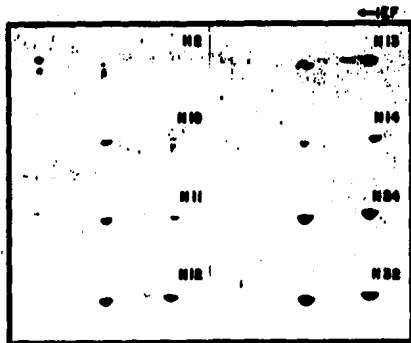


Fig. 2. Relative proportions of *in vivo* synthesized GS polypeptides in the cytosol of *P. vulgaris* nodules during development. 2.0 transverse GS activity units were immunoprecipitated by the anti-GS antiserum/GAR procedure (see text). Immunoprecipitates were separated by sucrose cushions and subjected to 2D-PAGE. Gels were stained with Coomassie blue R-250. Panels: N2, two-day-old hypocotyls and N, nodules 10-14, 24 and 32 days old. α , β and γ are GS polypeptides. GS-alpha polypeptide is still detected in 32-day-old nodules (arrow).

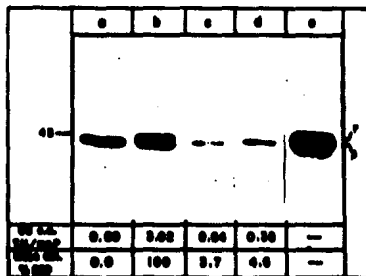
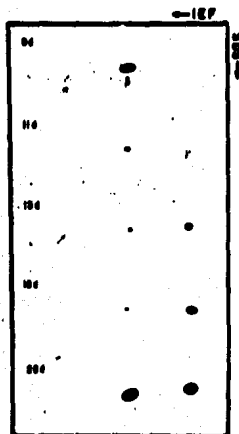


Fig. 3. Effect of the bacterial genotype and effectiveness on GS expression. 30 μg of soluble protein from 20-day-old roots (a) and from nodules formed by strains, CIAT999 (b), CM17083 (pLJN:713 mob) (c) and C389 (d), were electrophoresed, blotted onto nitrocellulose and GS antigen visualized by immunodecoration. 0.13 μg purified nodule GS (e) was used as control. GS specific activity (GS a.a.) in extracts is expressed in transform units per mg of nodule protein. Nitrogenase activity (% Mass act.) is expressed as a percentage of that of CIAT999 wild-type nodules. GS-gamma polypeptide is detected slightly heavier than GS-beta, (arrows at right); MW marker, 43 kDa (at left).



PAGE gels was compared by mixing samples of purified enzyme with *in vitro* translation products from nodule RNA (Fig. 5). This analysis exhibited the identity between the *in vivo* and *in vitro* GS-beta or GS-gamma spots respectively, indicating that no post-translational modification of *in vitro* synthesized GS products were detected by 2D-PAGE. *In vitro* translation GS products from nodule polysomal or poly(A⁺) RNA did not differ in number, relative proportions, nor in electrophoretic behavior (not shown). The relative amount of GS products of total *in vitro* translation patterns was compared (Fig. 6). The translatable GS-gamma

Fig. 4. Relative proportions of *in vitro* translated GS polypeptides derived from total polysomal RNA of developing nodules. $2.5-5.0 \times 10^5$ cpm of 35 S-labeled products were immunoprecipitated by the anti-GS antiserum/insoluble protein-A procedure. Immunoprecipitates were pelleted, washed and subjected to 2D-PAGE followed by fluorography. Panels: numbers indicate nodule polysomal RNAs 9, 11, 13, 15 and 20 days old. α , β and γ are GS polypeptides. GS-alpha product is detectable up to day 13 (arrow).

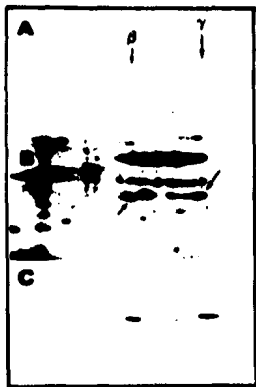


Fig. 5. Comparison between GS *in vivo* and *in vitro* synthesized polypeptides from *P. vulgaris* nodules. 12 μ g of purified GS from mature nodules was mixed with 2.5×10^5 cpm of translation mixture from 18-day-old nodule polysomal RNA and subjected to 2D-PAGE. The gel was stained with Coomassie blue (Panel A), followed by fluorography (Panel B). The immunoprecipitation of the *in vitro* translation products of 18-day-old poly(A⁺) nodule RNA was performed by the anti-GS antiserum/insoluble protein-A procedure (Panel C).

mRNA was increased from nodules 9 to 11 days old in relation to other products induced during nodule emergence.

Discussion

We are using the nodule-specific glutamine synthetase polypeptide from *Phaseolus vulgaris* as a model to examine the host-plant metabolic and genetic functions during nodulation. Our work is also focused on the role of the microsymbiont-conditioned factors involved in nodulin induction.

The induction of GS activity, already described in developing nodules of some legumes [23], was

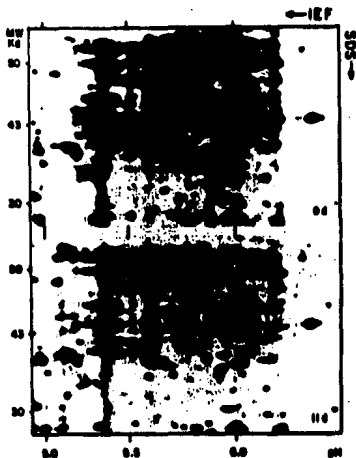


Fig. 6. Developmental appearance of GS-gamma polypeptide as *in vitro* translation product of polysomal RNA from 9- and 11-day-old emerging nodules. 3×10^5 cpm of translation mixture were subjected to 2D-PAGE followed by fluorography. GS products were localized in these patterns by comparing 2D gels of GS immunoprecipitates. Solid arrow = GS-gamma polypeptide; arrowhead = GS-beta polypeptide.

detected in *P. vulgaris* during the first days after nodule emergence, but preceding the acetylene reduction activity (Fig. 1). Different ratios of GS transferase/synthetase activity of purified nodule isoforms were reported [7]. Variations in the relative proportions of nodule GS isoforms [15] may contribute to the alteration of the T/S ratio. The 2-fold increase found during the nodule development did not correspond to the expected slope inferred from the GSn-1 induction, and it may reflect a developmental modulation of nodule GS activity (Table 1).

In our growth conditions nitrogen fixation in *P. vulgaris* was detected at least 5 days after nodule emergence and 3 days after the detection of GS-

gamma (Figs. 1 and 2), and other nodulins (Campos *et al.*, submitted for publication). Similar results were also obtained in peas [4] and soybeans [11]. A sequential induction of specific activity of ammonia-assimilating, purine-synthesizing and ureide-forming enzymes in soybean root-nodules was described [29]. GS was the first induced activity; this mechanism may be shared by common bean as a ureide-producing legume ([6] and Sanchez *et al.*, submitted for publication). The increase of GS specific activity correlates with that of the GS antigen accumulation as judged by western blot immunodetection (Table 1). Both increments occur coordinately with the induction of GS-gamma polypeptide (Fig. 2). The analysis of GS expression in ineffective nodules showed the presence of GS-gamma polypeptide in protein extracts (Fig. 3). These results indicate that nodule-specific GS was induced regardless of nitrogenase activity, but also that the nitrogen fixation rate affected the level of its expression. These data are in accordance to those previously reported [1, 15, 33, 40].

The developmental kinetics of GS polypeptides is relevant in understanding the particular role of GS-gamma in ammonia assimilation during nitrogen fixation. However, the polypeptide composition of native GS isoforms from *R. vulgaris* nodules is still unclear. Cullimore *et al.* (1983) have separated two isoforms by ion-exchange chromatography; Lars *et al.* (1984) reported that purified root and nodule GS are formed by distinct polypeptides and also that the nodule isoforms GSn-1 and GSn-2 have different proportions of GS-gamma and GS-beta polypeptides. Recently Robert and Wong (1986) reported that differences in electrophoretic mobilities of native nodule GS during development could be due to a continuous distribution of the described polypeptides forming hetero-oligomeric enzymes. Their model suggests that GSn-1 isoform may be a composite of at least eight out of nine isozymes with different GS-beta:GS-gamma ratios. The MW and IEF points of the *in vivo* and *in vitro* synthesized GS polypeptides do not vary in 2D-PAGE (Fig. 5). So, we exclude the possibility of post-translational modifications of nodule GS polypeptides which may account for the generation of several isozymes with changes in the

chromatographic [23] and electrophoretic [30] behavior. Therefore, the developmental induction of a nodule-specific GS monomer and the variable proportion of the GS monomers, could explain the formation of different GS isoforms during development. The combination of defined proportions of these polypeptides may produce several isoforms with different mobilities. This may be related to a catalytic versatility or compartmentation of the holoenzymes. The existence of at least three closely related mRNA species [12] is in accordance with the presence of three immunoprecipitated *in vitro* translation GS products (Fig. 4). The transcripts which encode for these polypeptides may be differentially synthesized during nodule development because GS-alpha, GS-beta and GS-gamma products can be detected in days 10 to 13 and only GS-beta and GS-gamma products from 18 to 28 days. These data also indicate that before nitrogen fixation there is a simultaneous synthesis of these three transcripts in emerging nodule tissues, but that after the onset of nitrogenase activity, only GS-beta and GS-gamma transcripts are present. The analysis of GS polypeptides found in protein fractions and in the *in vitro* translated products revealed that the GS-beta:GS-gamma proportion was similar between nodules of the same age (Figs. 2 and 4). All data support the model of an organ-specific expression of a multigenic family encoding for different GS monomers [8], and strongly suggest that GS-gamma induction occurs at a transcriptional level, as proposed earlier [12, 23]. The induction of GS-gamma occurred during day 10 from inoculation since we do not detect GS-gamma on day 9, neither the *in vitro* (Fig. 6), nor the *in vivo* synthesized polypeptides. GS-alpha was observed in protein extracts until day 32 and, in contrast to previous reports [12], its *in vitro* translation product is detected up to day 13 from inoculation when GS-gamma is noticeably expressed. The developmental expression pattern of GS-alpha seems to be similar to that described for root tissues [27]. We suggest that GS-alpha represents a long life-span nodule protein. A mechanism for the regulation of expression of GS may include the possibility of a differential contribution from distinct cell types found in nodule tissues (e.g., infected and

infect

non-infected cells), to the accumulation of GS polypeptides, or to the corresponding synthesis of mRNAs. The conclusive evidence of a particular intercellular distribution and intracellular localization of GS polypeptides in *P. vulgaris* nodules has not been achieved [17]. The appearance of GS-gamma is unlikely to be conditioned by the ammonia derived from nitrogenase activity. The inductive signals for the initial expression of GS-gamma could be elicited by previous developmental factors derived from the intracellular infection of *Rhizobium*. This model is based on an earlier proposal [37] and on reports about the failure for nodulin induction by tumorigenic bacteria and microaerobiosis in peas [4]. This is also true for nodule-inducing non-infective *Rhizobium* mutants in common bean [25, 36]. Work is in progress to correlate some developmental changes during nodulation [24], to the induction of GS-gamma and other nodule-specific proteins in *P. vulgaris*.

Acknowledgements

We are grateful to J. L. Zitalpocpa for technical assistance, to L. Segovia, and Drs G. Dávila, W. Hansberg, G. Soberón, J. Mora and R. Palacios for the encouragement in reviewing the work. We also thank R. Basurto and D. Cuñillar for secretarial help.

J. E. P. was supported by a National Science and Technology Council (CONACYT) fellowship. Supported in part by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) grant PCCBBNA-022632, and from Fondo de Estudios e Investigaciones Ricardo J. Zavada.

References

1. Atkins CA, Shelp BJ, Storer PJ, Pate JS: Nitrogen nutrition and the development of biochemical functions associated with nitrogen fixation and ammonia assimilation of nodules on cowpea seedlings. *Planta* 162: 327-333, 1984.
2. Auger E, Verma DPS: Induction and expression of nodule-specific host genes in effective and ineffective root nodules of soybean. *Biochemistry* 20: 1300-1306, 1980.
3. Bergman H, Freddie E, Verma DPS: Nodulin-35: a subunit of specific uronase (uronase II) induced and localized in the uninfected cells of soybean nodules. *EMBO J* 12(2): 2323-2329, 1993.
4. Bleeding T, Govers F, Birkema W: The identification of proteins and their mRNAs involved in the establishment of an effective symbiosis. In: Milfin BJ (ed.) *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*, Vol 1. Clarendon Press, Oxford, 1984, pp 53-83.
5. Broughton WJ, Dörworth MJ: Control of isoflavonolignan synthesis in earth beans. *Biochem J* 125: 1075-1080, 1971.
6. Coakson C, Hugo H, Coombs J: Effects of combined nitrogen on nodule-specific carbon assimilation and nodule size composition in *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 148: 336-343, 1980.
7. Callimore JV, Lam M, Lee PJ, Milfin BJ: Purification and properties of two forms of glutamine synthetase from the plant fraction of *Phaseolus* root nodules. *Planta* 157: 245-253, 1983.
8. Callimore JV, Osharick C, Savolainen R, Milfin BJ, Ider KB, Barber SP: Glutamine synthetase of *Phaseolus vulgaris* L.: organ-specific expression of a multigene family. *J Mol Appl Gen* 2: 309-309, 1984.
9. Döllme AL, Charvinsky HM: Detection of antigens on nitrocellulose paper immunoblots with monoclonal antibodies. *Anal Biochem* 133: 244-249, 1983.
10. Ferguson AR, Sims AP: The regulation of glutamine metabolism in *Caedibacter* cells: the role of glutamine in the control of glutamine synthetase. *J Gen Microbiol* 80: 199-171, 1974.
11. Fuller F, Verma DPS: Appearance and accumulation of nodulin mRNAs and their relationship to the effectiveness of root nodules. *Plant Mol Biol* 2: 21-26, 1984.
12. Osharick C, Oliver JE, Parde SQ, Savolainen R, Milfin BJ: Primary structure and differential expression of glutamine synthetase genes in nodules, roots and leaves of *Phaseolus vulgaris*. *EMBO J* 5(7): 1429-1435, 1986.
13. Hird B, McElroy SF, Oudal P, Sumner N, Stewart GR: Cytosolic glutamine synthetase in higher plants: a comparative immunological study. *Eur J Biochem* 136: 63-66, 1984.
14. Lammell UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
15. Lam M, Callimore JV, Lee PJ, Milfin BJ, Johnston AWB, Lamb JW: Appearance of a novel form of plant glutamine synthetase during nodule development in *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 157: 254-258, 1983.
16. Lam M, Paria H, Padilla J, Putsch J, Sánchez F: Heterogeneity of glutamine synthetase polypeptides in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol* 76: 1019-1023, 1984.
17. Lam M, Ortega JL, Valderrama B: Localization of the glutamine synthetase polypeptides in *Phaseolus* root nodules. In: Verma DPS & N Brison (eds) *Molecular Genetics of Plant-Bacteria Interactions*. Martinus Nijhoff, Dordrecht, 1987, pp 142-144.

18. Lagerstedt BR, Wernke DPS: Identification of nodulin-specific *Melilotus*-(legume) symbiosis involved in the development of root nodules. *Plant Physiol* 66: 153-161, 1980.

19. Lacey CH, Bannister M, Fox AJ, Randall RJ: Protein composition of the root nodule. *Plant Physiol* 66: 143-149, 1980.

20. Robertson JI, Parfitt RJP: Ultrastructure and metabolism of the developing root nodule. In: *Nitrogen Fixation: Biochemistry of Plants, Amino acids and Derivatives*. Vol 5. Academic Press, New York, 1980, pp 67-113.

21. Sanchez R, Cava E, Campagnolo M, Basso C, Cava E: Nodulation in *Lotus corniculatus* L. and *Lotus albus* L. and *Lotus corniculatus* L. root nodules. *Plant Physiol* 66: 143-149, 1980.

22. Sabero JL, Pacioni R: Heterogeneity in C25 polyphosphates in *Lotus corniculatus* L. *Plant Physiol* 66: 2211-2214, 1980.

23. Sangster-Copelan C, Price JH: Regulation of nodulin synthesis in *Lotus corniculatus* L. *Plant Physiol* 66: 189-190, 1980.

24. Sangster C: Regulation of the C25 nodulin synthesis in *Lotus corniculatus* L. *Plant Physiol* 66: 189-190, 1980.

25. Sangster C, Price JH: Regulation of nodulin synthesis in *Lotus corniculatus* L. *Plant Physiol* 66: 189-190, 1980.

26. Sangster C, Price JH: Regulation of nodulin synthesis in *Lotus corniculatus* L. *Plant Physiol* 66: 189-190, 1980.

27. Sangster C, Price JH: Regulation of nodulin synthesis in *Lotus corniculatus* L. *Plant Physiol* 66: 189-190, 1980.

28. Sangster C, Price JH: Regulation of nodulin synthesis in *Lotus corniculatus* L. *Plant Physiol* 66: 189-190, 1980.

29. Sangster C, Price JH: Regulation of nodulin synthesis in *Lotus corniculatus* L. *Plant Physiol* 66: 189-190, 1980.

30. Sangster C, Price JH: Regulation of nodulin synthesis in *Lotus corniculatus* L. *Plant Physiol* 66: 189-190, 1980.

31. Sangster C, Price JH: Regulation of nodulin synthesis in *Lotus corniculatus* L. *Plant Physiol* 66: 189-190, 1980.

32. Sangster C, Price JH: Regulation of nodulin synthesis in *Lotus corniculatus* L. *Plant Physiol* 66: 189-190, 1980.

33. Sangster C, Price JH: Regulation of nodulin synthesis in *Lotus corniculatus* L. *Plant Physiol* 66: 189-190, 1980.

34. Sangster C, Price JH: Regulation of nodulin synthesis in *Lotus corniculatus* L. *Plant Physiol* 66: 189-190, 1980.

35. Sangster C, Price JH: Regulation of nodulin synthesis in *Lotus corniculatus* L. *Plant Physiol* 66: 189-190, 1980.

36. Sangster C, Price JH: Regulation of nodulin synthesis in *Lotus corniculatus* L. *Plant Physiol* 66: 189-190, 1980.

37. Sangster C, Price JH: Regulation of nodulin synthesis in *Lotus corniculatus* L. *Plant Physiol* 66: 189-190, 1980.

38. Sangster C, Price JH: Regulation of nodulin synthesis in *Lotus corniculatus* L. *Plant Physiol* 66: 189-190, 1980.

39. Sangster C, Price JH: Regulation of nodulin synthesis in *Lotus corniculatus* L. *Plant Physiol* 66: 189-190, 1980.

40. Sangster C, Price JH: Regulation of nodulin synthesis in *Lotus corniculatus* L. *Plant Physiol* 66: 189-190, 1980.

INDEX:

18. Lagerstedt BR, Wernke DPS: Identification of nodulin-specific *Melilotus*-(legume) symbiosis involved in the development of root nodules. *Plant Physiol* 66: 153-161, 1980.

19. Lacey CH, Bannister M, Fox AJ, Randall RJ: Protein composition of the root nodule. *Plant Physiol* 66: 143-149, 1980.

20. Robertson JI, Parfitt RJP: Ultrastructure and metabolism of the developing root nodule. In: *Nitrogen Fixation: Biochemistry of Plants, Amino acids and Derivatives*. Vol 5. Academic Press, New York, 1980, pp 67-113.

21. Sanchez R, Cava E, Campagnolo M, Basso C, Cava E: Nodulation in *Lotus corniculatus* L. and *Lotus albus* L. and *Lotus corniculatus* L. root nodules. *Plant Physiol* 66: 143-149, 1980.

22. Sabero JL, Pacioni R: Heterogeneity in C25 polyphosphates in *Lotus corniculatus* L. *Plant Physiol* 66: 2211-2214, 1980.

23. Sangster-Copelan C, Price JH: Regulation of nodulin synthesis in *Lotus corniculatus* L. *Plant Physiol* 66: 189-190, 1980.

24. Sangster C: Regulation of the C25 nodulin synthesis in *Lotus corniculatus* L. *Plant Physiol* 66: 189-190, 1980.

25. Sangster C, Price JH: Regulation of nodulin synthesis in *Lotus corniculatus* L. *Plant Physiol* 66: 189-190, 1980.

26. Sangster C, Price JH: Regulation of nodulin synthesis in *Lotus corniculatus* L. *Plant Physiol* 66: 189-190, 1980.

27. Sangster C, Price JH: Regulation of nodulin synthesis in *Lotus corniculatus* L. *Plant Physiol* 66: 189-190, 1980.

28. Sangster C, Price JH: Regulation of nodulin synthesis in *Lotus corniculatus* L. *Plant Physiol* 66: 189-190, 1980.

29. Sangster C, Price JH: Regulation of nodulin synthesis in *Lotus corniculatus* L. *Plant Physiol* 66: 189-190, 1980.

30. Sangster C, Price JH: Regulation of nodulin synthesis in *Lotus corniculatus* L. *Plant Physiol* 66: 189-190, 1980.

31. Sangster C, Price JH: Regulation of nodulin synthesis in *Lotus corniculatus* L. *Plant Physiol* 66: 189-190, 1980.

32. Sangster C, Price JH: Regulation of nodulin synthesis in *Lotus corniculatus* L. *Plant Physiol* 66: 189-190, 1980.

33. Sangster C, Price JH: Regulation of nodulin synthesis in *Lotus corniculatus* L. *Plant Physiol* 66: 189-190, 1980.

34. Sangster C, Price JH: Regulation of nodulin synthesis in *Lotus corniculatus* L. *Plant Physiol* 66: 189-190, 1980.

35. Sangster C, Price JH: Regulation of nodulin synthesis in *Lotus corniculatus* L. *Plant Physiol* 66: 189-190, 1980.

36. Sangster C, Price JH: Regulation of nodulin synthesis in *Lotus corniculatus* L. *Plant Physiol* 66: 189-190, 1980.

37. Sangster C, Price JH: Regulation of nodulin synthesis in *Lotus corniculatus* L. *Plant Physiol* 66: 189-190, 1980.

38. Sangster C, Price JH: Regulation of nodulin synthesis in *Lotus corniculatus* L. *Plant Physiol* 66: 189-190, 1980.

39. Sangster C, Price JH: Regulation of nodulin synthesis in *Lotus corniculatus* L. *Plant Physiol* 66: 189-190, 1980.

40. Sangster C, Price JH: Regulation of nodulin synthesis in *Lotus corniculatus* L. *Plant Physiol* 66: 189-190, 1980.

200. Martinez E, Flores M, Brown S, Romero U, Datta G, Palacios R: *Rhizobium fasciati*: a genetic molecular view. *Plant & Soil*. 1987. (in press).

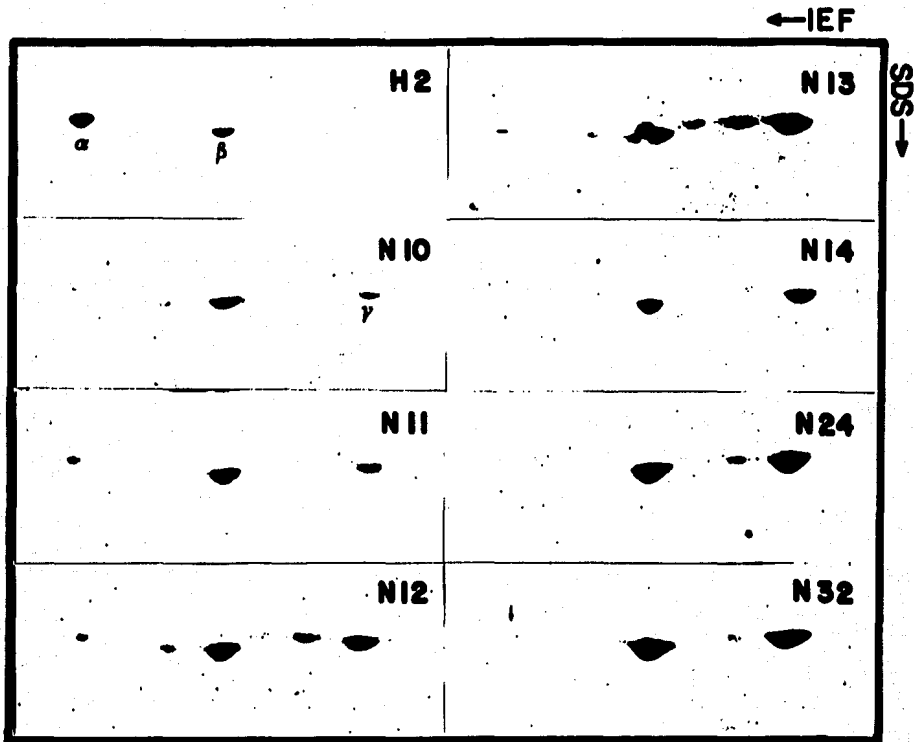


Fig. 2

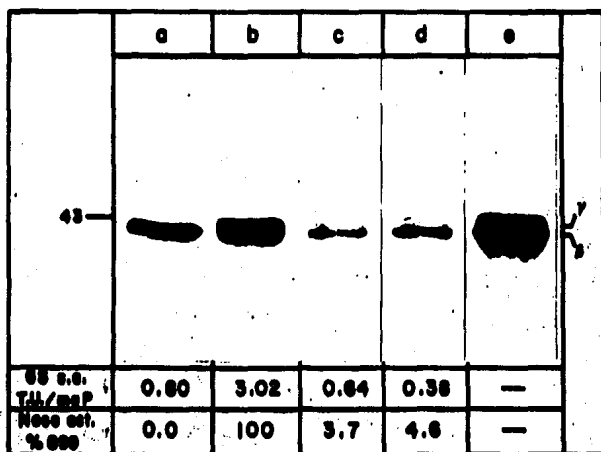


Fig. 3

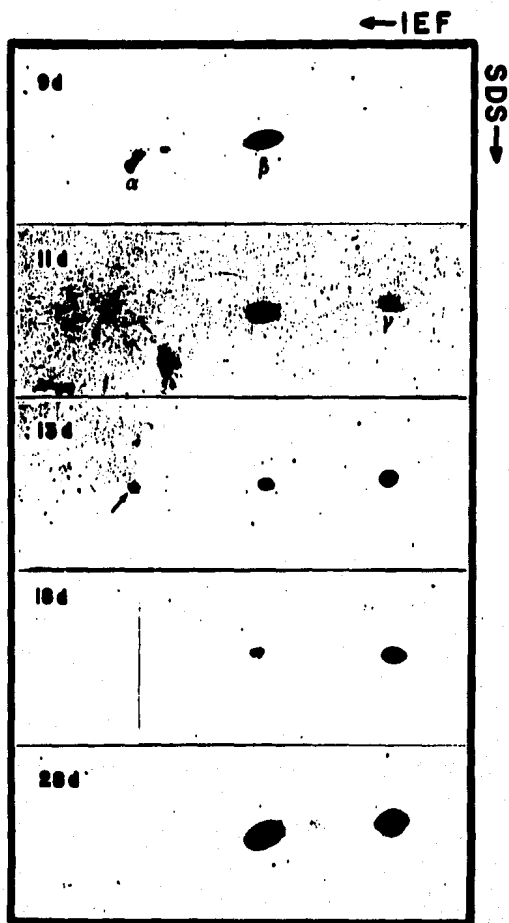


Fig.4

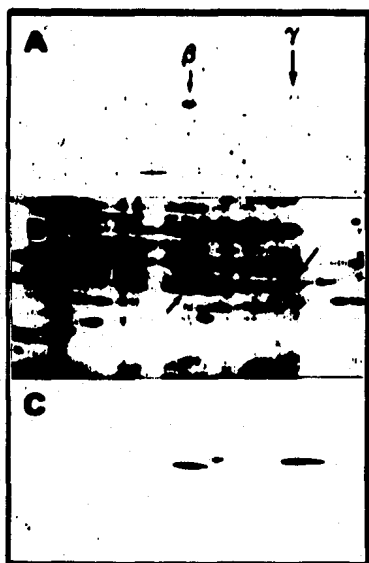


Fig. 5

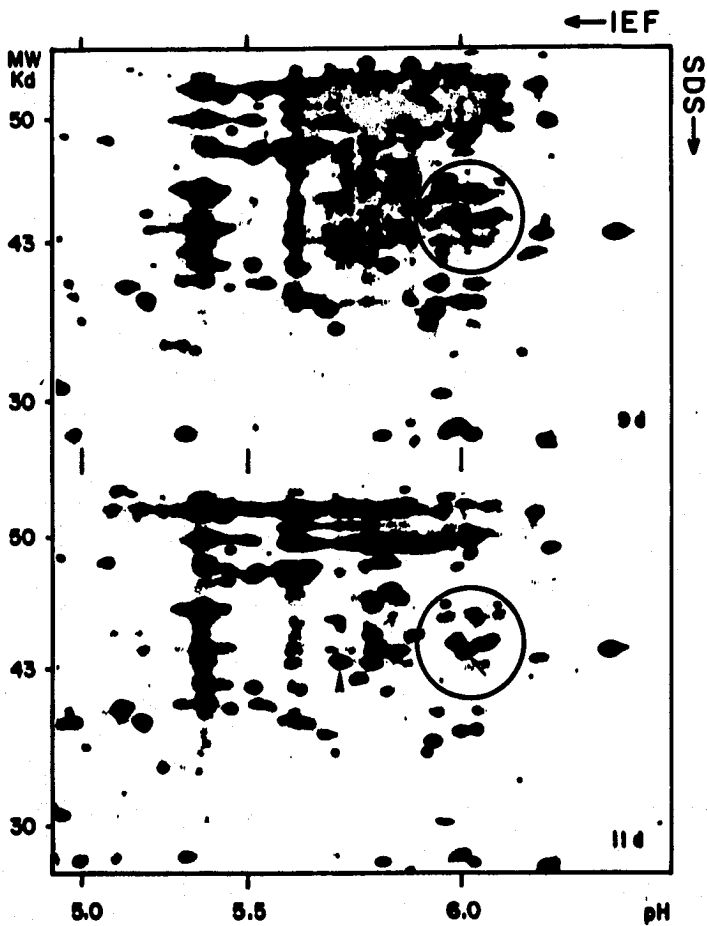


Fig. 6

(Parte II)

En la siguiente sección sólo consideraré algunos puntos globales del trabajo anterior, y otros resultados complementarios a fin de discutir algunos aspectos básicos sobre la glutamina sintetasa específica de nódulos: como enzima del metabolismo nitrogenado, como nodulina de frijol, y como un modelo de estudio del desarrollo en vegetales.

1.) La estructura de las isoformas de GS en nódulos de frijol.

Hasta este momento se ha establecido que los tres distintos polipéptidos descritos de la GS citosólica (Lara et al.1984), están codificados por otros tantos genes pertenecientes a una familia presente en el genoma del frijol (Gebhardt et al.1986). Aunque sabemos que la expresión de estos genes varía durante el desarrollo, o bien en los distintos órganos, no está claro como participan los monómeros en la composición de las diferentes holoenzimas octaméricas (isoformas). Por la evidencia experimental disponible, se han propuesto dos modelos: en el primero, las isoformas de GS se componen por proporciones constantes de los monómeros formando hetero-oligómeros discretos; este modelo se concibe a partir de la conservación en los perfiles de elución de GS de nódulos en cromatografía de intercambio iónico, durante la cinética temporal de inducción (Lara et al.1983), y además, considerando la composición polipeptídica diferencial que presentan las isoformas de GS (GSn-1: $\gamma > \beta$; GSn-2: $\gamma < \beta$) (Lara et al.1984). Estos datos indicarían que la proporción de monómeros en la holoenzima no se alteraría, pero excluye la participación de GS-alfa que, según se demostró, también está presente en nódulos maduros. Aduciendo la participación de diferentes afinidades de asociación de cada monómero, es posible pensar en una cantidad reducida de isoformas.

En el segundo modelo, se propone que considerando la variación temporal, tanto en la proporción de los distintos

polipéptidos (impreso anexo), como en la movilidad de GS en electroforesis nativa (Robert y Wong 1986), los monómeros se asocian de acuerdo a un gradiente de concentración relativa, lo que dará origen a la aparición gradual y continua de isoformas; las isoformas de GS durante el desarrollo, estarían compuestas por un número considerable de hetero-oligómeros de concentración polipeptídica variable. Un análisis más riguroso requiere cotejar estos datos en términos de tiempos equivalentes de desarrollo, con el fin de saber si las variaciones en los tipos de isoformas, corresponden a los cambios en el perfil de elución en cromatografía, y a la proporción de polipéptidos. Todavía no puede excluirse la posibilidad de interacciones inespecíficas de los monómeros en los extractos (*in vitro*), y tampoco la de una contribución diferencial de los distintos tipos celulares del nódulo en la síntesis y acumulación de los polipéptidos de GS.

Aunque las características particulares de cada uno de los monómeros no han sido descritas con amplitud (v.gr. cuál es su actividad catalítica respectiva, como alteran las constantes cinéticas de los oligómeros); no se ha encontrado aún evidencia de que existan cambios muy significativos con respecto a las afinidades (Cullimore *et al.* 1983), o a la actividad molecular de las isoformas (impreso anexo). Sin embargo, la idea de encontrar diferentes propiedades catalíticas en éstas, parte de la intención de adjudicar una función a la(s) isozima(s) específica(s) de nódulo, considerándola(s) ya sea, como una forma alternativa de "ajustar" la asimilación de amonio a determinadas condiciones metabólicas (niveles y proporciones de amonio, poder reductor y carga energética) que se presentan durante el desarrollo o los ciclos diurnos; o también, como resultado de un proceso de compartimentalización en membranas peribacteroidales (Sengupta-Gopalan y Pitas 1986). Es posible que la presencia de isozimas en nódulos le de mayor versatilidad y capacidad para contender con un proceso metabólico vital que está centralizado en este órgano.

2.) La regulación de la expresión de las GS y la inducción de GS-gamma durante el desarrollo.

Ha sido demostrado que la fijación de nitrógeno no es una preconditionación esencial para la expresión de GS-gamma, y de otras nodulinas (impreso anexo, Fuller et al. 1984). Este hecho implica que algunos de los eventos anteriores de la morfogénesis del nódulo están asociados a la inducción de proteínas específicas de este órgano. Está claro además, que las clonas de cDNA correspondientes a los 3 mensajeros de GS —aunque semejantes en estructura primaria—, poseen secuencias regulatorias no homólogas que flanquean a los genes (las de los extremos 3' en los tres casos, y sólo en dos 5' que son conocidas) (Gebhardt et al. 1986). Esto sugiere precisamente, que los mecanismos que controlan la expresión de cada uno de ellos pueden ser distintos. Como la GS-alfa y la GS-beta se encuentran en otros órganos de la planta (Lara et al. 1984, Ortega et al. 1986), puede afirmarse que su expresión responde a efectores asociados con cambios no mediados por la simbiosis; sin embargo, la GS-gamma solo se encuentra en nódulos que poseen células infectadas. De esto se sigue que puede existir un inductor de GS-gamma asociado a la presencia de bacterias dentro de la célula vegetal que activa (o desreprime?) la expresión de este gene.

Además, como se han descrito otras secuencias homólogas en los extremos 5' de algunos genes de nodulinas (Mauro et al. 1985), sería interesante conocer si la GS-gamma posee una región semejante, lo que podría generalizar la idea de que existen mecanismos de control general para la inducción de algunas nodulinas.

3.) Expresión de GS en nódulos efectivos e inefectivos de frijol.

A partir de análisis de la expresión de proteínas vegetales en nódulos producidos por cepas inefectivas, ya sean rhizobia de espectro amplio de infección ('promiscuas'), o bien transconjugantes simbióticos de Agrobacterium (Conde 1986), ha sido posible observar la presencia del polipéptido GS-gamma en la fracción soluble; si bien la actividad específica y la

concentración de antígeno total de GS permanecen en niveles bajos (comparables a los correspondientes de los días iniciales del desarrollo de nódulos efectivos), estos resultados indican nuevamente que el funcionamiento de la nitrogenasa no es indispensable para inducir la GS-gamma y otras nodulinas. Esta conclusión se ha visto reforzada por la evidencia reciente de la expresión de GS-gamma y otras proteínas específicas en nódulos Fix- producidos por una cepa de R. phaseoli que contiene inserciones en los genes estructurales de la nitrogenasa (CFN2210 =CFN42 *str-1 nifHa::Sp nifKb::Km*. L. Segovia, en preparación). Esto indica claramente que el amonio producido por el bacteroide no es el efector directo en la activación del gene de GS-gamma. No obstante, es evidente que en la inducción subsiguiente del polipéptido y de otras nodulinas, están involucrados factores asociados al metabolismo nitrogenado, ya que tanto en nódulos inefectivos (Werner et al. 1980), como en nódulos normales crecidos en atmósferas carentes de nitrógeno gaseoso (Atkins et al. 1984), los niveles de actividad de GS permanecen muy por debajo de los valores típicos asociados a la fijación efectiva. Este grupo de resultados podría significar, por consiguiente, que existen dos mecanismos de regulación para la expresión de este gene: uno mediado por factores bacterianos previos a la fijación, y otro por los niveles de ciertos metabolitos producidos como consecuencia de la fijación (y asimilación) normales.

Por otro lado, resulta interesante notar que la información genética que poseen algunas bacterias "promiscuas" contiene, al menos, las regiones (¿o los alelos?) involucradas o relacionadas con la inducción de nodulinas, aunque no aquellas que le permiten fijar efectivamente en este hospedero (Martínez et al. 1985); asimismo se puede afirmar que esta información se halla contenida en el plásmido simbiótico de algunos rhizobia (concretamente de CIAT899), ya que una cepa avirulenta de Agrobacterium receptora de este plásmido, adquiere la capacidad de reconocer, infectar y proliferar en las células de plantas, desencadenando la diferenciación y la inducción de proteínas específicas de nódulos. Ejemplos más recientes de transconjugantes simbióticos dan apoyo a esta idea (Martínez et al. 1987).

4.) La GS-gamma como "marcador" del desarrollo de la simbiosis.

Considerando la cinética de aparición e inducción de GS-gamma durante el desarrollo de nódulos, hemos propuesto que la expresión de este polipéptido puede ser utilizado en, a.) la definición de fenotipos asociados con alteraciones en el desarrollo de la simbiosis, causadas por el genotipo bacteriano (Noel et al.1984, Cevallos, datos no publicados); y posiblemente como, b.) un indicador relacionado a la efectividad de los nódulos (Conde 1986). Con respecto al primer punto, se ha observado que muchas nodulinas no aparecen en nódulos formados por cepas formadoras de 'nódulos no infectados' (Inf-) (Vandenbosh et al.1985). Esto puede sugerir que la infección intracelular de Rhizobium condiciona definitivamente la expresión de los genes de nodulinas; esto puede significar que los posibles efectores de esta inducción son activos y/o liberados solo a través de membranas y no de paredes celulares (Truchet et al.1980). En referencia al segundo inciso, ha sido descrita una correlación entre los valores de la actividad de GS, de uricasa II y de nitrogenasa en nódulos efectivos e inefectivos de edades determinadas (Conde 1986). Estos resultados muestran una relación directamente proporcional entre GS y uricasa, y una correspondencia entre GS y nitrogenasa que depende del tipo de cepas en cuestión. Para adjudicar una relación causal entre estos dos últimos parámetros, es necesario conocer la naturaleza genética de la alteración simbiótica del microsimbionte, y discriminar si existe una dependencia directa de los niveles de GS en relación a los de nitrogenasa a lo largo del desarrollo. En referencia a este punto, y aunque aún no existen otros datos más generales, ha sido posible encontrar una correlación parcialmente clara entre los niveles de actividad de algunas enzimas relacionadas al del metabolismo nitrogenado (GOGAT, PEP-Cx) y los valores instantáneos de fijación y acumulación de nitrógeno en distintos genotipos de alfalfa producidos por selección y mejoramiento (Groat et al.1984). Para el caso de GS no existe una correlación significativa con una simbiosis efectiva, sin embargo, las vías de asimilación son distintas a las de frijol. Finalmente, y como una alternativa a la situación anterior, sería interesante

evaluar si el avance relativo de la infección, y la capacidad de fijación intrínseca de algunas cepas en frijol, podría ser establecido a través de la comparación de los niveles relativos de GS-gamma y otras nodulinas, además de los parámetros usados comunmente (Devine 1984, Graham 1984, Phillips y Teuber 1985).

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Con base en los resultados obtenidos sobre la estructura de la GS, de su actividad y composición así como de la regulación de la expresión durante el desarrollo de los nódulos de frijol podemos resumir lo siguiente:

- 1.) El polipéptido GS-gama es un producto que constituye parte de la isoforma específica de nódulos; ésta última se induce secuencialmente en este órgano desde el desarrollo temprano de los nódulos y el polipéptido se expresa con una cinética similar.
- 2.) La inducción de la actividad de transferasa y del antígeno total de GS en los nódulos guardan una estrecha relación, la cual parece descartar la posibilidad de cambios muy significativos en la actividad molecular de la enzima durante el desarrollo. Es necesario, sin embargo, profundizar en la implicaciones que tienen los distintos valores de la relación de actividad de transferasa y sintetasa, tanto en las isoformas purificadas, como en la cinética temporal de los extractos de nódulo. Este análisis permitiría proponer algunas explicaciones sobre la función de isozimas de GS en frijol.
- 3.) La identidad entre los polipéptidos de GS detectados en extractos y los productos de traducción *in vitro*, refuta la posibilidad de relaciones precursor-producto entre los mismos. Esto apoya fuertemente la idea de que existe en frijol, una familia multigénica que codifica para los distintos monómeros de la enzima.
- 4.) La variación en la composición polipeptídica de la GS de nódulos durante el desarrollo —vista sustancialmente como la aparición de GS-gama y la desaparición de GS-alfa—, ponen de manifiesto un proceso de expresión génica diferencial que debe estar asociado a la diferenciación tisular que ocurre en los nódulos. Esto puede sugerir que existe una relación biunívoca y

secuencial entre el desarrollo de la simbiosis y la expresión/represión de distintos genes de la planta. Esta variación está involucrada también, en la aparición de distintas isoformas de GS, considerando que la composición polipeptídica afecta el comportamiento de las holoenzimas. Aún no existen datos suficientes para establecer un modelo definitivo sobre la relación entre los polipéptidos y las isoformas de GS durante el desarrollo, pero se han discutido dos posibilidades.

5.) La semejanza que existe entre la abundancia relativa de los polipéptidos de GS, sintetizados *in vivo* e *in vitro* durante el desarrollo de los nódulos, indica que la regulación de la expresión de estos monómeros ocurre principalmente a nivel transcripcional. Esta idea debe ser confirmada por el análisis de los transcritos por medio de técnicas de hidridización de ac. nucleicos tipo "Northern". Experimentos similares realizados por otros investigadores apoyan la anterior conclusión (cf. Culimore et al.1984, Gebhardt et al.1986).

6.) La inducción del polipéptido GS-gama es anterior a la aparición de la fijación de nitrógeno, y coincide asimismo con el incremento de la actividad y el antígeno de GS en los nódulos. Es importante definir el momento de aparición de otras nodulinas para saber si GS-gama representa un modelo global de la regulación de la expresión de proteínas nódulo-específicas. En el caso de frijol se ha observado que algunos otros "marcadores" (uricase II, nodulina-30), siguen un comportamiento similar, aunque la inducción de GS-gama es mas acelerada (cf. Sánchez et al.1987, Campos et al. sometido a publicación).

7.) El polipéptido GS-gama es sintetizado activamente en los nódulos a partir del día 10 después de la inoculación, pero la síntesis mas elevada ocurre después de la fijación de nitrógeno (día 18); el polipéptido GS-alfa está presente en nódulos también, pero su síntesis desaparece prácticamente después del inicio de este proceso. Este patrón de expresión puede ser utilizado como un indicador fenotípico del desarrollo y de la efectividad de la simbiosis.

8.) La presencia del polipéptido GS-gama en nódulos inefectivos formados por algunas cepas promiscuas y transconjugantes de plásmidos simbióticos, indica nuevamente que su síntesis no está condicionada por el por el amonio producido por el bacteroide. La disminución de la actividad y de la proporción GS-gama:GS-beta en estos nódulos sugiere, sin embargo, que existe un efecto aparte de la actividad de nitrogenasa sobre los mecanismos de regulación de la síntesis de este monómero. Este hecho sugiere que pueden existir al menos, dos niveles de control para la expresión del gene de GS-gama.

9.) La aparición de GS-gama podría ser inducida durante el desarrollo por factores bacterianos asociados a la infección intracelular de Rhizobium, dado que en nódulos que carecen de células infectadas, no se detectan muchos productos específicos de este tejido. Las diferencias reportadas en las secuencias nucleotídicas de las regiones que flanquean al gene de GS de frijol, obtenidas a partir de distintas clonas de cDNA, apoyan la idea de que existen distintos efectores en la regulación de cada uno de ellos.

10.) La localización y abundancia relativa de GS-gama en los nódulos parece ser un dato importante para conocer si hay alguna correlación con el establecimiento de una simbiosis efectiva, y también para saber si la existencia de isozimas nódulo-específicas de GS confiere alguna ventaja metabólica (¿adaptativa?) a este sistema simbiótico, en relación a otros.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Allen ON, EK Allen: The Leguminosae. The University of Wisconsin Press, Madison, 1981.
- Andersen K, MT Shanmugam, ST Lim, LN Csonka, R Tait, M Hennecke, DB Scott, SSM Hom, JF Hauray, A Valentine, RC Valentine: Genetic engineering in agriculture with emphasis on nitrogen fixation. TIBS 5(2):35-39, 1980.
- Atkins CA, BJ Shelp, PJ Storer, JS Pate: Nitrogen nutrition and the development of biochemical functions associated with nitrogen fixation and ammonia assimilation of nodules of cowpea seedlings. Planta 162:327-333, 1984.
- Avonaike KO, PJ Lea, BJ Mifflin: The location of enzymes of ammonia assimilation in root nodules of Phaseolus vulgaris L. Plant Sci Lett 23:189-195, 1981.
- Bisseling T, Govers F, W Stiekma: The identification of proteins and their mRNAs involved in the establishment of an effective symbiosis. In: BJ Mifflin (ed.), Oxford Surveys of Plant Molecular & Cellular Biology Vol.1, Clarendon Press, Oxford, 1981. pp.53-83
- Campos F, M Vázquez, J Padilla, C Enríquez and F Sánchez: Nodule-specific genes in Phaseolus vulgaris. In: DPS Verma & N Brisson (eds.), Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht, 1987. pp.115-117
- Conde V: Análisis del patrón de proteínas específicas de la nodulación durante la simbiosis Phaseolus vulgaris-Rhizobium phaseoli. Tesis licenciatura (Biología). F Ciencias-UNAM, 1986.
- Cullimore JV, M Lara, PJ Lea, BJ Mifflin: Purification and properties of two forms of glutamine synthetase from the plant fraction of Phaseolus root nodules. Planta 148:338-345, 1983.
- Cullimore JV, C Gebhardt, R Saarelainen, BJ Mifflin, KB Ider, RP Barker: Glutamine synthetase of Phaseolus vulgaris L.: organ-specific expression of a multigenic family. J Mol Appl Gen 2:589-599, 1984.
- Devine TE: Genetics and breeding of nitrogen fixation. In: M Alexander (ed.), Biological Nitrogen Fixation. Ecology, Technology and Physiology. Plenum Press. New York, 1984. pp.127-154.
- Dilworth M, G Andrew: How does a legume nodule work? TIBS 9(12):519-523, 1984.
- Elkan GH: Taxonomy and metabolism of Rhizobium and its genetic relationship. In: M Alexander (ed.), Biological Nitrogen Fixation. Ecology, Technology and Physiology. Plenum Press. New York, 1984. pp.1-38.
- Evans HJ, LE Barber: Biological nitrogen fixation for food and fiber production. Science 197:332-339, 1977.

Fuller F, P Forrest, DPS Verma: Appearance and accumulation of nodulin mRNAs and their relationship to the effectiveness of nodules. *Plant Mol Biol* 3:21-28, 1984.

Gallon JR: The oxygen sensitivity of nitrogenase: a problem for biochemists and micro-organisms. *TIBS* 6(1):19-23, 1981.

Gebhardt C, JE Oliver, BG Forde, R Saarelainen, HJ Mifflin: Primary structure and differential expression of glutamine synthetase genes in nodules, roots and leaves of Phaseolus vulgaris. *EMBO J* 5(7):1429-1435, 1986.

Graham PH. Plant factors affecting nodulation and symbiotic nitrogen fixation in legumes. In: M Alexander (ed.), *Biological Nitrogen Fixation. Ecology, Technology and Physiology*. Plenum Press. New York, 1984. pp.75-98.

Groat RG, CP Vance, DK Barnes: Host plant nodule enzymes associated with selection for increased N₂ fixation in alfalfa. *Crop Sci* 24:895-898, 1984.

Hardy RWF, UD Havelka: Nitrogen fixation research: a key to world food? *Science* 188:633-643, 1975.

Heywood VH: The Leguminosae—a systematic purview. In: JB Harborne et al. (eds.), *The Chemotaxonomy of the Leguminosae*, Cap 1. Academic Press. New York, 1971.

Hirel B, SF McNally P Gadal, N Sumar, GR Stewart: Cytosolic glutamine synthetase in higher plants: a comparative immunological study. *Eur J Biochem* 138:63-66 1984.

Hombrecher G, NJ Brewing, AWB Johnston: Linkage of genes for nitrogenase and nodulation ability on plasmids in Rhizobium leguminosarum and Rhizobium phaseoli. *Mol Gen Genet* 182:133-136, 1981.

Huffaker RC, DW Rains. Factors influencing nitrate acquisition by plants. Assimilation and fate of reduced nitrogen. In: DR Nielsen & JG McDonald (eds.), *Nitrogen in the Environment. Soil-Plant-Nitrogen Relationships*, Vol 2. Academic Press. New York, 1978. pp.1-44.

Jackson WA, J Volk: Nitrate transport and compartmentalization in root systems. In: JM Lyons, et al. (eds.), *Genetic Engineering of Nitrogen Fixation and Conservation of Fixed Nitrogen*. Basic Life Sciences Vol.17, Plenum Press. New York, 1981. pp. 517-532.

Lara M, JV Cullimore, PJ Lea, BJ Mifflin, AWB Johnston, JW Lamb: Appearance of a novel form of plant glutamine synthetase during nodule development in Phaseolus vulgaris L. *Planta* 157:254-258, 1983.

Lara M, N Porta, J Padilla, J Folch, F Sánchez: Heterogeneity in glutamine synthetase polypeptides in Phaseolus vulgaris L. *Plant Physiol* 76: 1019-1023, 1984.

Martínez E, MA Pardo, R Palacios, MA Cevallos: Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of Rhizobium in nodulation and nitrogen fixation in Phaseolus vulgaris. J Gen Microbiol 131:1779-1786, 1985.

Martínez E, R Palacios, F Sánchez: Nitrogen fixing nodules induced by Agrobacterium tumefaciens harboring Rhizobium phaseoli plasmids. J Bacteriol 169, 1987, (en prensa).

Mauro VP, T Nguyen, P Katinakis, DPS Verma: Primary structure of the soybean nodulin-23 and potential regulatory elements in the 5' flanking regions of nodulin and leghaemoglobin genes. Nuc Acid Res 13:239-249, 1985.

Meeks JC, CP Wolk, N Schilling, PN Shaffer, Y Avissar, WS Chien: Initial organic products of fixation of [¹⁵N] dinitrogen by root nodules of soybean (Glycine max). Plant Physiol 61:980-983, 1978.

Miflin BJ: Nitrogen metabolism and aminoacid biosynthesis. In: PS Carlson (ed.), The Biology of Crop Productivity. Academic Press. New York, 1980. pp.263-279

Miflin BJ, M Lara, R Saarelainen, C Gebhardt, JV Cullimore: Physiology and molecular biology of plant glutamine synthetase. Proceedings of the 16th FEBS Congress, Part A. VNU Science Press. Moscow, 1985. pp.431-439.

Morrison-Baird L, BD Webster: Morphogenesis of effective and ineffective root nodules in Phaseolus vulgaris L. Bot Gaz 143(1):41-51, 1982.

NAS: Tropical Legumes: Resources for the future. National Academy of Sciences. Washington D.C., 1981.

Newcomb W: Nodule morphogenesis and differentiation. Int Rev Cytol, Suppl 13. Academic Press. New York, 1981. pp.247-297.

Nguyen T, M Zelechowska, V Foster, H Bergmann, DPS Verma: Primary structure of the soybean nodulin-35 encoding uricase II localized in the peroxisomes of uninfected cells of nodules. Proc Natl Acad Sci USA 82:5040-5044, 1985.

Noel KD, A Sánchez L Fernández, J Leemans, MA Cevallos: Rhizobium phaseoli symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. J Bacteriol 158(1):148-155, 1984.

Oaks A, B Hirel: Nitrogen metabolism in roots. Ann Rev Plant Physiol 36:345-366, 1985.

Ortega JL, F Campos, F Sánchez, M Lara: Expression of two different glutamine synthetase polypeptides during root development in Phaseolus vulgaris L. Plant Physiol 80: 1051-1054, 1986.

Pate JS: Transport and partitioning of nitrogenous solutes. Ann Rev Plant Physiol 31:313-340, 1980.

Payne WJ, MA Grant. Overview on denitrification. In: JM Lyons, et al. (eds.), Genetic Engineering of Symbiotic Nitrogen Fixation and Conservation of Fixed Nitrogen. Basic Life Sciences Vol.17, Plenum Press. New York, 1981. pp.411-427.

Phillips D, L Teuber: Genetic improvement of symbiotic nitrogen fixation in legumes. In: HJ Evans et al. (eds.), Nitrogen Fixation Research Progress. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht. 1985.

Phillips RL. In: T Kosuge et al. (eds.), Genetic Engineering of Plants. An Agricultural Perspective. Plenum Press. New York, 1983. pp.371-390.

Posgate J. Fijación de nitrógeno. Omega. Barcelona, 1981. 83 pp.

Quinto C, H de la Vega, M Flores, J Leemans, MA Cevallos, MA Pardo, R Aspiroz, ML Girard, E calva, R Palacios: Nitrogenase reductase: a functional multigene family in Rhizobium phaseoli. Proc Natl Acad Sci USA 82:1170-1174, 1985.

Rainbird RM, AC Atkins, JS Pate: Diurnal variation in the functioning of cowpea nodules. Plant Physiol 72:308-312, 1983.

Reynolds PHS, MJ Boland, DG Belvins, KR Shubert, DD Randall: Enzymes of amide and ureide biogenesis in developing soybean nodules. Plant Physiol 69:1334-1338, 1982.

Robert FM, PP Wong; Isozymes of glutamine synthetase in Phaseolus vulgaris L. and Phaseolus lunatus L. root nodules. Plant Physiol 81:142-148, 1986.

Robertson JG, KJF Farnden: Ultrastructure and metabolism of the developing root nodule. In: BJ Mifflin (ed.), The Biochemistry of Plants, Aminoacids and Derivatives, Vol 5. Academic Press. New York, 1980. pp. 65-113.

Sánchez F, F Campos, J Padilla, JM Bonneville, C Enriquez, D Caput: Purification, cDNA cloning and developmental expression of the nodule-specific uricase from Phaseolus vulgaris L. Plant Physiol. 1987. (en prensa)

Sengupta-Gopalan C, JW Pitae: Expression of nodule-specific glutamine synthetase genes during nodule development in soybeans. Plant Mol Biol 7:189-199, 1986.

Truchet G, M Michel, J Denarié: Sequential analysis of the organogenesis of lucerne (Medicago sativa) root nodules using symbiotical defective mutants of Rhizobium meliloti. Differentiation 16:163-172, 1980.

Tingey SV, Walker EL, Coruzzi GM: Glutamine synthetase genes of pea encode distinct polypeptides which are differentially expressed in leaves, roots and nodules. EMBO J 6(1):1-9, 1987.

Vandenbosch KA, KD Noel, Y Kaneko, EH Newcomb: Nodule initiation elicited by noninfective mutants of Rhizobium phaseoli. J Bacteriol 162(3):950-959, 1985.

Verma DPS, S Long: The molecular biology of Rhizobium-legume symbiosis. In: K Jeon (ed.), Int Rev Cytol, Suppl 11. Academic Press. New York, 1983. pp.211-245.

47

Verma DPS, MG Fortin, J Stanley, VP Mauro, S Purohit, N Morrison: Nodulins and nodulin genes of Glycine max: a perspective. Plant Mol Biol 7:51-61, 1986.

Vincent JM. Root-nodule symbiosis with Rhizobium. In: A Quispel (ed.), The Biology of Nitrogen Fixation, Cap 9. Frontiers of Biology Vol 33. North-Holland Publish Co. Amsterdam, 1974.

Werner D, E Mörschel, P Stripf, B Winchenbach: Development of nodules of Glycine max infected with an ineffective strain of Rhizobium japonicum. Planta 147:320-329, 1980.