

63062
2ej.1

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

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

CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION DE NITROGENO.

EXPRESION DIFERENCIAL DE GENES DURANTE EL DESARROLLO DE
NODULOS, EN Phaseolus vulgaris.

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA PRESENTA

FRANCISCO CAMPOS ALVAREZ

Cuernavaca, Morelos.

Septiembre, 1987.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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

I. INTRODUCCION	1
1. El Proceso de Nodulación	1
2. Genes Involucrados en la Simbiosis <u>Rhizobium-Planta</u>	11
3. Objetivos	17
II. MATERIAL Y METODOS	18
III. RESULTADOS	23
- Análisis de las Diferentes Fracciones del Nódulo..	23
- Análisis de los Productos de Traducción <u>in vitro</u> de RNA polisomal de Nódulo y Raíz	24
- Expresión de la Nodulina -30 Durante el Desarrollo del Nódulo	26
- Clonación de los cDNAs de las Nodulinas más abundantes de Frijol	27
- Expresión de Leghemoglobina, Uricasa y Nodulina -30 Durante el Desarrollo del Nódulo ..	28
- Comparación con los Productos de Traducción <u>in vitro</u> de RNA polisomal de Nódulos de Soya y <u>Leucaena Leucocephala</u>	29
- Análisis del Patrón de Nodulinas de Frijol en Nódulos con pocas Células Inyectadas	29
IV. DISCUSION Y CONCLUSIONES	31
V. REFERENCIAS	37
FIGURAS	42

I. INTRODUCCION

En la naturaleza pueden observarse diversos sistemas de simbiosis mutualista, donde dos o más organismos interactúan para formar un superorganismo o consorcio, ejemplos de estos son los que se llevan a cabo entre hongos y algas para formar líquenes; algas y celenterados en corales; bacterias en nódulos de leguminosas.

La simbiosis mutualista es un ejemplo de relación trófica colateral donde ha habido una evolución paralela de especies, donde al final, determinada especie se relaciona de manera muy estricta con otra especie también definida. El proceso de selección que ha conducido a establecer y a mantener tales relaciones y las mantiene, puede ser explicado en parte por alguna economía energética (Margalef, 1977).

Un ejemplo de simbiosis mutualista es la que se lleva a cabo entre bacterias Gram-negativas del género Rhizobium y raíces de plantas angiospermas de la familia de las leguminosas, para dar como resultado un órgano, denominado nódulo.

1. EL PROCESO DE NODULACION

El nódulo es la culminación de una serie de eventos secuenciales que van desde la colonización de la rizósfera por Rhizobium y el reconocimiento entre la planta y la bacteria, hasta la formación de un nódulo efectivo en fijación de

nitrógeno. Dentro del nódulo algunas de las células de la planta están habitadas por formas endosimbióticas de la bacteria, las cuales reducen nitrógeno molecular (N_2) a amonio (NH_4^+) a expensas del fotosintato de la planta (Bauer, 1981; Dart 1975; Newcomb, 1981; Verma y Long, 1983, Vincent, 1980).

Vincent (1980) ha agrupado el proceso de nodulación en: preinfección; infección, desarrollo del nódulo y función del nódulo (Fig 1).

A. Preinfección.

Los eventos que suceden en esta fase son: la colonización de la raíz por la bacteria y el reconocimiento entre la planta y Rhizobium, dando como indicador de que la infección pudiera ser viable, un engrosamiento y enroscamiento del pelo radicular (Fig 1).

Se ha propuesto que la bacteria es atraída por su hospedero por quimiotaxis. De esta manera la concentración de Rhizobium en la rizósfera aumente lo suficiente para que la infección sea posible (Currier y Storb, 1979) (Ver Fig 1a). Sin embargo mutantes de la bacteria afectadas en movilidad como son algunas bacterias sin flagelo; bacterias no móviles, pero con flagelo; y bacterias no quimiotácticas con movilidad anormal y con flagelo, son capaces de nodular, aunque son menos competitivas cuando se coinoculan con cepas móviles (Ames y Bergman, 1981). Además la planta excreta factores hacia la rizósfera que

estimulan el crecimiento de Rhizobium sobre otros microorganismos del suelo. Se ha propuesto que estos factores podrian ser sustancias tales como biotina, tiamina (Graham, 1963) u homoserina (Van Egeraat, 1972).

Después de la colonización de la raíz por la bacteria hay una unión fuerte de Rhizobium a la superficie de la raíz (Fig. 1b). Se ha propuesto la existencia de un receptor vegetal que funcionaria como un puente de unión y determinaria lo que pudiera ser la especificidad del reconocimiento. Es posible que estas moléculas receptoras sean lectinas (Albersheim y Anderson-Prouty, 1975; Bauer, 1981).

El mecanismo de enroscamiento de la raíz (Fig. 1c) no es bien conocido, pero parece ser consecuencia de una tasa desequilibrada de síntesis de la pared celular del pelo radicular (Verma y Long, 1983). El enroscamiento y engrosamiento de los pelos radiculares es debido a un factor de la bacteria que también es liberado en los medios de cultivo donde se crece Rhizobium (Solheim y Raa, 1973).

B. Infección y Desarrollo del Nódulo

Posteriormente las células de los pelos radiculares enroscados o engrosados son infectadas. Las bacterias pasan de la superficie de la raíz a la corteza a través de una estructura tubular llamada hilo de infección (Fig 1d) (Robertson y Farnden; 1980).

Como preludeo a la formación de un hilo de infección se observa la aproximación del núcleo de la célula del pelo radicular hacia el sitio de la infección (Napoli y Hubbell, 1975). Se ha propuesto la acción de enzimas pectolíticas o celulolíticas para la iniciación del hilo de infección (Fahraeus y Ljunggren, 1959). Detectándose bajos niveles de enzimas pectolíticas en Rhizobia de vida libre (Hubbell y cols., 1978; Verma y cols, 1978) y de un aumento en la actividad de enzimas celulolíticas y pectolíticas en raíces infectadas (Ljunggren y Fahraeus, 1961; Verma y cols, 1978). Verma y cols. (1978) han detectado histoquímicamente actividad celulolítica en las paredes de los hilos de infección de soya.

Cuando el hilo de infección atraviesa de 3 a 6 capas de células corticales externas, (en la punta del mismo) se inicia una zona de actividad meristemática la cual también es atravesada por este hilo de infección (Fig. 1e). Las células de esta zona, principalmente poliploides, son las que serán infectadas por Rhizobium. El resto de las células de la zona meristemática consiste de células diploides, las cuales darán lugar a las células no infectadas en el nódulo maduro (Newcomb, 1981; Robertson y Farden, 1980).

El Rhizobium es liberado del final del hilo de infección hacia el citoplasma de las células meristemáticas poliploides por endocitosis (Robertson y Farden, 1980). Las bacterias al ser liberadas son envueltas en membrana de origen vegetal denominada

membrana peribacteroidal (Robertson y cols, 1978a, 1978b; Verma y cols, 1978). El número de bacterias envueltas por la membrana varia dependiendo de la leguminosa, aparentemente este número está bajo el control del hospedero (Dart, 1977).

Los nódulos de las leguminosas son agrupados por su forma en: esféricos como los de frijol y soya (Fig. 1f); cilindricos o apicales como los de trebol y alfalfa y de collar como son los de Lupinus. La forma del nódulo es el resultado del desarrollo de la actividad mitótica en los nódulos (Newcomb, 1981). en el caso de los nódulos esféricos la actividad mitótica se lleva a cabo alrededor de la zona meristemática original a diferencia de los nódulos cilindricos donde la actividad se localiza en el ápice. En los nódulos esféricos, después del vaciamiento de las bacterias, las células del hospedero cesan su mitosis y sufren un aumento en volumen. Las células infectadas de la zona central causan que el nódulo crezca radialmente, provocando que el nódulo adquiera una forma esférica (Newcomb, 1981; Robertson y Farden, 1980).

Además de células infectadas, el nódulo está compuesto por células no infectadas (Fig 2), las cuales son más pequeñas que las infectadas. Estas células también se encuentran altamente diferenciadas y cumplen un papel importante en la función del nódulo. Otro tipo de células asociadas al nódulo son las que forman los haces vasculares y las células de transferencia, las

cuales están relacionadas al transporte de metabolitos (Newcomb, 1981).

C. Función del Nódulo

Poco después de que Rhizobium se encuentra en el citoplasma del hospedero y rodeado por la membrana peribacteroidal, éste se diferencia a bacteroide, es decir la forma especializada que reduce nitrógeno atmosférico a amonio. El amonio es excretado al citoplasma de la célula infectada, el cual es asimilado por el huésped en el nódulo y finalmente metabolizado en compuestos nitrogenados que van a ser exportados para nutrir a las partes aéreas de la planta. Por otro lado la planta a su vez participa proporcionando un medio adecuado (niveles de O₂ libre muy bajos) y de una fuente de energía que le permite a la bacteria fijar el nitrógeno ya que este proceso es metabólicamente muy costoso (ver Fig. 3).

i). La Nitrogenasa

La enzima responsable de la fijación de nitrógeno es la nitrogenasa, la cual cataliza la siguiente reacción:



este proceso se encuentran confinado solo a organismos procariotes (diazotróficos). Esta enzima es un complejo proteico formado por dos partes separables en DEAE-celulosa: el componente I, un tetrámero (α_2 y β_2) formado por dos

subunidades distintas de 51.3 y 59 Kd. que contiene fierro y molibdeno y el componente II, una ferroproteína compuesta de dos subunidades iguales de 34.6 Kd. Ambos componentes son desnaturalizados rápida e irreversiblemente por exposición a O₂. Además de estos dos componentes se requiere de ATP, un reductor, un sustrato reducible, Mg⁺⁺ como un activador, y un medio anaeróbico para que se lleve a cabo la fijación (Yates, 1980).

En la reducción de N₂ a 2NH₃ se usan 8 electrones:



Este hidrógeno producido puede ser útil al organismo: (1) para la reducción de O₂, para proteger así a la nitrogenasa; (2) para recuperar energía; y (3) como una fuente de electrones de la nitrogenasa. En los nódulos puede o no estar presente un sistema de recuperación de hidrógeno, este es codificado por el gene hup (hidrogenase uptake) del procariote, el cual lleva a cabo la oxidación de H₂ y la síntesis de ATP. Aunque este sistema ahorra energía, no se ha descrito alguna ventaja sobre cepas hup⁻, ya sea en producción o nitrógeno fijado (Dilworth y Glenn, 1984).

ii) Asimilación del Amonio

Aproximadamente el 15% del nitrógeno fijado por el bacterioide es exportado como amonio al citoplasma de la fracción vegetal del nódulo (Lea y cols., 1982) donde es asimilado por la vía del ciclo de la glutamato sintasa (Fig. 4) (Mifflin y Lea,

1980). Por medio de análisis radioisotópicos con $^{15}\text{N}_2$ hechos por Meeks y cols. (1978) se ha encontrado que en nódulos de soya el primer compuesto en marcarse es la glutamina, declinando la marca conforme transcurre el tiempo para posteriormente ser detectado en glutamato. Además usando inhibidores específicos de glutamino sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT) como metionina sulfoximina y azaserina se obtienen resultados consistentes con que el nitrógeno fijado se asimila por la vía GS/GOGAT (Ohyma y Kumazawa, 1980).

Robertson y cols, (1975) han reportado que la actividad de GS en nódulos de Lupinus aumenta conforme transcurre la nodulación llegando a ser hasta 500 veces más alta que la que se encuentra en la raíz. Esta enzima es un octámero de 380 Kd consistente de 8 subunidades de 43 a 47 Kd y constituye el 2 % de la proteína soluble del nódulo en soya y en frijol (McParland y cols., 1976, Lara y cols., 1984). Aparentemente esta enzima es citosólica (Awoniake y cols., 1981; Shelp y cols, 1983). En nódulos de frijol (Phaseolus vulgaris) es posible separar por medio de cromatografía de intercambio iónico dos formas de GS (Cullimore y cols., 1983), GS_{N_1} y GS_{N_2} . GS_{N_1} es una forma específicamente asociada al nódulo (Lara y cols, 1983), mientras la forma GS_{N_2} es semejante a la de raíz. Del análisis de la composición polipeptídica de ambas formas, Lara y cols. (1984) han encontrado que la forma GS_{N_1} consta de dos isoformas denominadas β y γ , siendo el péptido γ una proteína específica

del nódulo.

Se ha descrito que estas isoformas provienen de distintos genes y no de un procesamiento postraducciona (Ortega y cols., 1986; Gebhardt y cols., 1986).

La otra enzima del ciclo, glutamato sintasa (GOGAT) ha sido poco estudiada en nódulos. Esta enzima muestra especificidad por su cofactor (NADH) (Robertson y cols., 1975). Ha sido purificada de nódulos de Lupinus (Boland y Benny, 1977). La enzima consiste de un solo péptido de 235 Kd. En Lupinus su actividad aumenta hasta 10 veces durante la nodulación (Robertson y cols., 1975) aunque en nódulos de soya no se observa un aumento en actividad (Sen y Schulman, 1980), en frijol hay un aumento correlacionado con la fijación de nitrógeno (Lea y cols., 1982). La GOGAT se encuentra localizada en plástidos (Awonaike y cols., 1981; Shelp y cols., 1983). La especificidad por su cofactor (NADH) y una Km para 2-oxoglutarato diferente a la de la raíz (Stewart y cols., 1980) hacen pensar que esta enzima pueda ser una forma específica del nódulo. Suzuki y cols. (1984) han reportado la existencia de una GOGAT dependiente de ferredoxina en nódulos de soya, con determinantes antigénicos semejantes a los de hoja de arroz.

ii) Transporte del Nitrógeno Asimilado.

El nitrógeno asimilado se exporta del nódulo via xilema o floema al resto de la planta en forma de asparagina en el caso de leguminosas "templadas" (Lupinus, chicharo, haba). Esta amida constituye el 90% del N_2 transportado del nódulo hacia hojas y semillas en desarrollo (Pates y cols, 1969; Atkins y cols, 1975; Robertson y cols., 1975). El N_2 es incorporado hacia asparagina en una vía que involucra dos enzimas: aspartato aminotransferasa y asparagina sintetasa (Lea y Mifflin, 1980; Mifflin y Cullimore, 1984). En cambio en leguminosas "tropicales" (soya, frijol, Vigna) el nitrógeno es predominantemente (80%) transportado como ureidos (alantoina y ácido alantóico) (ver Fig. 5) (Reynolds y cols, 1982); los ureidos son formados a partir de glutamina o via glicina y aspartato (Lea y cols, 1982; Mifflin y Cullimore, 1980). Aunque en plantas y animales los ureidos son derivados de la degradación de purinas, en el nódulo la síntesis de ureidos está separada del metabolismo normal de ácidos nucleicos (Lea y cols., 1982).

Algunas enzimas de esta vía son: xantina deshidrogenasa (XDH), uricasa y alantoinasa, las cuales aumentan su utilidad cuando se incrementa el transporte de ureidos en el nódulo (Schubert, 1981). Xantina deshidrogenasa ha sido purificada por Triplet y cols (1981) consta de un dímero de 285 Kd. Se ha propuesto su localización en células no infectadas del nódulo (Nguyen, 1986), sin embargo Triplet (1985) ha localizado XDH en

células infectadas de nódulos de soya. Por lo que toca a la uricasa presente en nódulos de soya y que es diferente a la uricasa que se encuentra en la raíz; esta enzima consta de 4 subunidades de 35 Kd (Bergmann y cols, 1983; Sánchez y cols., 1987)

Se ha propuesto que las células no infectadas del nódulo participan en la síntesis de ureidos (Newcomb y Tandon, 1981) debido a que estas células tienen más peroxisomas y retículo endoplásmico liso, lugares donde se localizan preferencialmente uricasa y alantoinasa (Hanks y cols., 1981; Hanks y cols., 1983). Bergmann y cols. (1983) han demostrado que la uricasa de nódulo de soya se encuentra en peroxisomas de células no infectadas (Fig 5).

2. GENES INVOLUCRADOS EN LA SIMBIOSIS Rhizobium-PLANTA.

Del resumen anterior se puede concluir que la nodulación es un proceso secuencial y complejo, el cual es resultado de la cooperación entre dos genomas: el del Rhizobium y el de la planta. Debido posiblemente al manejo de metodologías de Biología Molecular de mejor o más fácil aplicación en bacterias (ej. obtención de mutantes; transferencia de DNA) el estudio de los genes involucrados en la formación del nódulo se encuentra mucho más adelantado en la bacteria (Kondorosi y Kondorosi, 1986, Downie y Johnston, 1986) que en el hospedero (Verma y cols, 1986).

A. Genes Bacterianos

Las mutaciones en las capacidades simbióticas de la bacteria, pueden dividirse en dos categorías: Nod y o Fix. Las mutantes nod no pueden formar nódulos mientras las mutantes fix pueden formar nódulos pero estos no son efectivos en la fijación del nitrógeno (Vincent, 1980). En los genes fix están agrupados los genes estructurales de la nitrogenasa (nif) (Kondorosi y cols., 1984; Kondorosi y Kondorosi, 1936)

En Rhizobium de crecimiento rápido la mayoría de los genes necesarios para la simbiosis se encuentran localizados en un plásmido de alto peso molecular llamado plásmido Sym (simbiótico) (Banfalvi y cols, 1981; Batut y cols., 1985; Kondorosi y cols., 1984; Nuti y cols., 1979) a diferencia de Rhizobium de crecimiento lento o Bradyrhizobium (Jordan, 1982) en donde estos genes se encuentran dispersos en el cromosoma (Nuti y cols., 1986; Rostas y cols, 1984; Sutton y cols., 1984; Yun y cols., 1986).

En Rhizobium meliloti, la bacteria que nodula alfalfa, los genes nod se encuentran cerca de los genes nif. Algunas mutaciones nod mapean a 25 kb de los genes estructurales de la nitrogenasa (componente I nif D y nif K, componentes II nifII) (Banfalvi y cols, 1984; Long y cols., 1982), por otra parte los genes nod y nif están contenidos en vehiculos del tipo R-Prima en un inserto de 90 Kb (Kondorosi y cols, 1984). Los genes nod

se encuentran organizados en dos agrupamientos o "clusters". Uno de estos "clusters" engloba a los genes nod comunes de nodulación, el otro "cluster" determina la especificidad hacia el huésped (genes hcn) (Kondorosi y Kondorosi, 1986; Horvath y cols., 1986; Downie y Johnston, 1986). El agrupamiento de genes nod comunes consiste de cuatro genes (nod ABC y D) organizados en dos unidades transcripcionales. Estos genes se encuentran muy conservados en Rhizobium, mutantes en estos genes pueden ser complementados con los correspondientes de otras especies de Rhizobium (Kondorosi y cols., 1984; Torok y cols., 1984). La función de estos genes aún no es conocida. El producto de nod A codifica para una proteína de 21.8 Kd y se ha sugerido que su localización en la bacteria sea citosólica, su expresión es inducida por exudados de plantas leguminosas y más específicamente por compuestos producidos por leguminosas como la flavona luteolina y algunas hormonas como trigonelina (Schmidt y cols., 1986). El producto de nod C es una proteína transmembranal de 34 Kd (John y cols., 1985; Schmidt y cols., 1986). El gene nod D codifica para un producto que activa la expresión del operón nod en la presencia de exudados de la planta (Mulligan y Long, 1985).

En R. meliloti los genes hcn se encuentran en dos unidades transcripcionales (hcn ABC y D). Estos genes codifican para proteínas de 9.7, 11.7, 26.7 y 28.6 Kd respectivamente. Las mutaciones de estos genes modifican el rango de especificidad

hacia el hospedero. A diferencia de los genes nod los genes hcn no pueden ser complementados por plásmidos de otras especies de Rhizobium (Horvath y cols., 1986).

Los genes que codifican para la nitrogenasa se encuentran localizados en el plásmido Sym (Nutti y cols., 1979). En la cepa CFN42 de Rhizobium phaseoli, Quinto y cols. (1982) ha reportado la reiteración del gene nif H. Por mutagénesis dirigida se ha demostrado que ninguna de las tres copias de este gene es indispensables para la fijación de nitrógeno (Quinto y cols., 1985).

Además de las funciones esenciales para nodulación y fijación en el plásmido Sym se han descrito otras funciones como la producción de melanina (Kondorosi y cols., 1984) y genes para el catabolismo y síntesis de compuestos del tipo opina (rhizopina), la presencia de estos genes dá apoyo al concepto de que la simbiosis Rhizobium-planta evolucionó a partir de una interacción patológica (Murphy y cols., 1987).

B. Genes y productos de la planta específicos del nódulo.

En la planta se han identificado pocos genes involucrados en la simbiosis con la bacteria, y la función de la mayoría de estos es desconocida (Verma y cols., 1986).

En soya, Legocki y Verma (1980) han descrito la presencia de proteínas de la planta, específicas del nódulo, las cuales denominaron nodulinas. También se han descrito nodulinas en

chicharo (Bisseling y cols., 1983) y alfalfa (Lang-Unnasch y Ausubel, 1985). Se han detectado 20 nodulinas en soya (Legocki y Verma, 1979; Legocki y Verma, 1980) y 21 nodulinas en chicharo (Govers y cols., 1985) por traducción in vitro de RNA polisomal de nódulo y alrededor de 20-40 RNAs mensajeros moderadamente abundantes específicos de nódulo por medio de experimentos de hibridización (Auger y Verma, 1981).

Fuller y cols., (1983) han clasificado las nodulinas en tres clases, a partir de su posible función: (1) Proteínas responsables para el mantenimiento del nódulo; (2) enzimas necesarias para la asimilación específica del nitrógeno reducido; y (3) proteínas que apoyan la función del bacteroide y facilitan la reducción del nitrógeno. Aunque son varias las proteínas específicas del nódulo, sólo una proteína del tercer tipo: Leghemoglobina (Verma y Bal., 1976; Appleby, 1984); dos del segundo: Una forma de uricasa específica del nódulo en soya (Bergmann y cols., 1983), el polipéptido de la enzima glutamino sintetasa en nódulos de frijol (Lara y cols., 1984); y 2 de la primera categoría, una sacarosa sintetasa nódulo-específica (Thummler y Verma, 1986) y una colin-cinasa específica de membrana peribacteroidal en soya (Mellor y cols., 1986). La función del resto de las nodulinas es desconocida.

Se ha determinado la localización de algunas nodulinas, por ejemplo la uricasa la cual ha sido localizada en células no infectadas (Hanks y cols., 1983; Bergmann y cols., 1983) en

cambio la leghemoglobina sólo se encuentra en células infectadas, (Robertson y cols., 1985) apoyando la función del bacteroide (Verma y Bal, 1976). Además se han clonado cDNAs y genes de algunas nodulinas (Fuller y cols., 1983). La transcripción del gene de la leghemoglobina puede ser inducido in vitro con extracto de nódulo sugiriendo la existencia de un factor trans-activador para la desrepresión de los genes del huésped necesarios para la simbiosis Rhizobium - leguminosa (Verma y cols., 1986).

3. OBJETIVOS

Algunas de las finalidades del estudio de la simbiosis Rhizobium planta desde un punto de vista molecular son: las de definir los genes de la planta y la bacteria que se encuentran involucrados en la simbiosis, la localización celular de sus productos, y la determinación de posibles funciones.

Los objetivos de este trabajo son: (1) determinar la existencia de genes o productos génicos específicos del nódulo de frijol (Phaseolus vulgaris L.); (2) la clonación de algunos de estos genes; (3) determinar el modo de expresión de estas nodulinas durante el desarrollo del nódulo, así como su expresión en nódulos no efectivos en fijación de nitrógeno.

II. MATERIAL Y METODOS

Organismos Empleados

En el presente estudio se trabajó con frijol (Phaseolus vulgaris L.) Cv. Negro Jamapa obtenido en Pronase, México.

Para la obtención de nódulos efectivos en fijación de nitrógeno (Fix+) se uso la cepa de Rhizobium phaseoli CIAT899 aislada originalmente por el Centro Internacional de Agricultura Tropical de Colombia y caracterizada por Graham (1980) y Martínez y cols. (1985). En algunos casos se usó la cepa de R. phaseoli CFN42 originaria de México y caracterizada por Quinto y cols. (1982). Para la formación de nódulos inefectivos (Fix-) con pocas células infectadas se utilizó la cepa promiscua Rhizobium sp. Cl180 aislada de nódulos de la leguminosa Clitoria ternatea por Martínez y cols. (1987), o la cepa de R. phaseoli CE106 obtenida por mutagénesis de la cepa CFN42 con el transposón Tn5 por Noel y cols. (1984) y caracterizada por Noel y cols. (1984; 1986).

Material Vegetal

Para la obtención de nódulos se esterilizaron las semillas de frijol con hipoclorito de sodio al 0.5% por 15 min, se enjuagaron con agua estéril y se pregerminaron por 48 hrs., posteriormente fueron transferidas a macetas e inoculadas con 1 ml del Rhizobium adecuado crecido hasta fase exponencial en medio PY (Noel y cols., 1984). Las plantas se crecieron en vermiculita

regada cada tercer día alternativamente con agua y con solución nutritiva sin nitrógeno (Broughton y Dillworth, 1971). Los frijoles se crecieron bajo condiciones de invernadero (Luz 14 hs, temperatura media 25°C a 30°C, humedad relativa 15%). Los nódulos se cosecharon manualmente en diferentes estados del desarrollo (11-28 días) y almacenados a -70 C hasta su uso.

Para la obtención de raíces no infectadas se siguió el mismo procedimiento, omitiendo la inoculación. Las raíces se cosecharon a los 8 días. Las hojas usadas en este trabajo fueron obtenidas del segundo trifolio de frijoles nodulados de 24 días.

Obtención de Polisomas

Para la obtención de polisomas de nódulos y de otros órganos o tejidos de frijol se siguió el método descrito por Jackson y Larkins (1976).

El tejido se molio en hielo seco y homogenizó en una solución reguladora de extracción (2 ml/g) (Tris-HCl 200 mM de pH 9.0; KCl 400 mM; sacarosa 200 mM; MgCl₂ 35mM; EGTA 25mM pH 9.0 y 2-mercaptoetanol 5mM). El homogenizado se paso a través de una gasa estéril y se le agregó Triton X-100 hasta una concentración final de 0.5% (v/v) y se centrifugó a 10,000 rpm (rotor Sorvall, SS34) por 15 min. a 4°C. El sobrenadante se colocó sobre un colchón de sacarosa 1.75M (Tris-HCl 40mM de p.H 9.0; KCl 200 mM; MgCl₂ 30mM; EGTA 5mM; 2-mercaptoetanol 5mM) y se centrifugó a

40,000 rpm (196,000 x g, rotor Beckman, GoTi) por 3 hs. a 4°C. La pastilla resultante está constituida por polisomas (>100s), ribosomas (80s) y subunidades libres (60s y 40s).

Aislamiento de RNA Polisomal Total.

El RNA polisomal total se aisló como lo describe Christoferson y Laties (1982) con algunas modificaciones. La pastilla polisomal se resuspendió en 1 ó 2 ml de Tris-HCl 50mM de pH 7.5; EDTA 10mM; SDS 0.5%; la mezcla se incubó a 60°C, el RNA de la suspensión fue extraído 3 veces con fenol cloroformo-alcohol isoamílico y posteriormente se añadió un décimo del volumen de acetato de sodio y 2 volúmenes de etanol. El RNA precipitado fue colectado por centrifugación y resuspendido en agua estéril para su cuantificación (1 D.O.260nm=50ug de RNA) y de nuevo fué precipitado con etanol y acetato de sodio.

Aislamiento de DNA recombinante

Se purificó el DNA del plásmido pBR322 con el cDNA específico del nódulo clonado en el sitio PstI, por el método de lisis alcalina o del plásmido recombinante (Maniatis y cols., 1982).

Fraccionamiento del Nódulo.

La fracción soluble del nódulo y la raíz fue preparada moliendo el tejido en hielo seco y homogenizando (1 m/g) en solución reguladora de Tris-HCl 50mM de pH 7.5; 2-mercaptoetanol 5mM; PMSF 1mM y polivinilpirrolidona insoluble 5%. El homogenizado fue filtrado con gasa y centrifugado a 10,000 rpm por 15 min. el sobrenadante corresponde a la fracción soluble. El aislamiento de la fracción peribacteroidal y los bacteroides se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Brewin y cols. (1985). La proteína se cuantificó por el método de Lowry y cols. (1951).

Obtención de RNAm seleccionado por hibridización.

El RNA seleccionado por hibridización se obtuvo siguiendo el protocolo de Fuller y cols. (1983), con una modificación; los filtros fueron hibridizados con 150 ug de RNA polisomal total en lugar de 10 ug de RNA poli (A)*.

Traducción in vitro.

Aproximadamente 10 ug de RNA polisomal total o el RNAm seleccionado por hibridización fueron traducidos in vitro en un volumen final de 25 ul de lisado de reticulocito de conejo preparado de acuerdo al procedimiento de Pelham y Jackson (1976) conteniendo 50 uci de ³⁵S-metionina (1255 Ci/mmol, Amersham) e incubadas por 90 min a 30°C.

Electroforesis en geles de Poliacrilamida

Las proteínas de los productos de traducción in vitro del RNA polisomal y las diferentes fracciones del nódulo fueron analizadas por su peso molecular por el sistema diseñado por Laemmli (1970) y por su punto isoeléctrico y su peso por el sistema bidimensional de O'Farrell (1975). Terminada la electroforesis, los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-100 y posteriormente se destiñeron con metanol y ácido acético (30:7 v/v). En algunos casos los geles se tiñeron con nitrato de plata (Wray y cols., 1981). Se uso fluorografía para detectar los productos de traducción in vitro marcados con ^{35}S -metionina como lo describen Bonner y Laskey (1974).

Análisis de RNA en Northern

10 ug de RNA polisomal total fueron analizados por Northern. Los RNAs fueron ajustados a una concentración final de formamida 50%; MOPS 20mM; acetato de sodio 5mM de pH 7.0; EDTA 1mM; formaldehido 2.2M; calentados a 65 C por 5 min y sujetos a electroforesis en geles de agarosa con formaldehido 2.2. M (Maniatis y cols., 1982). El RNA fue transferido a membranas de nitrocelulosa (Thomas, 1980) e hibridizado con muestras de cDNA o de plásmido marcado con ^{32}P por "nick translation" (Maniatis y cols, 1982).

III. RESULTADOS

Análisis de las Diferentes Fracciones del Nódulo.

Para determinar la existencia de proteínas de frijol específicas del nódulo, se analizaron los perfiles de proteína soluble de nódulo de 20 días y raíz de 8 días en geles de poliacrilamida con SDS, los geles fueron teñidos con azul de Coomassie (Fig. 6). En estas fracciones se observan proteínas específicas del nódulo con un peso molecular de 14, 35, 40 y 100 Kd que no se encuentran en raíz. La proteína de 14 Kd es la proteína más abundante del nódulo y corresponde a la leghemoglobina. Esta proteína consta de 4 isoformas al ser analizada en un gel bidimensional (Fig. 7). La siguiente proteína más abundante en el nódulo es una de 35 Kd similar a la enzima uricasa de soya (Bergmann y cols., (1983). Esta proteína ha sido purificada hasta homogeneidad en frijol y representa aproximadamente al 20% de la proteína soluble del nódulo (Sánchez y cols., 1987). Otra proteína muy abundante en nódulo de frijol pesa aproximadamente 100 Kd; esta proteína es semejante a la forma específica del nódulo de sacarosa sintetasa de soya (Thumler y cols., 1986; Morell y Copeland; 1985), ha sido denominada nodulina-100 y corresponde a cerca del 4% de la proteína citoplasmática del nódulo de soya (Thumler y cols., 1986). En la zona de 40 Kd en el nódulo se observan proteínas que no se encuentran en la misma cantidad que en raíz, estas

proteínas corresponden a las formas de la enzima glutamino sintetasa (Padilla y cols., 1987). Además de estas fracciones se analizó un fracción enriquecida de membranas peribacteroidales (Fig. 6), esta fracción consta de membrana peribacteroidal, espacio peribacteroidal y una pequeña contribución de bacteroides que se rompen al aislar esta fracción. Al analizarla en PAGE-SDS se observa que esta fracción se encuentra contaminada con leghemoglobina, una proteína citoplasmática de células infectadas (Robertson y cols., 1984). En esta fracción se observa una proteína prominente de 38 Kd que no es visualizada en la fracción soluble del nódulo. Para poder diferenciar las proteínas de la planta con las de la bacteria se analizó paralelamente el patrón de proteínas de un lisado de bacteroide de la cepa de Rhizobium phaseoli CIAT 899, y no se observa contaminación o contribución de proteínas bacterianas en la fracción soluble del nódulo o a la fracción peribacteroidal, a diferencia de la cepa de R. phaseoli CE3 la cual parece excretar una proteína con un peso molecular ligeramente más alto al de leghemoglobina en la fracción vegetal. (Dato no mostrado)

Análisis de los Productos de Traducción in vitro de RNA

Polisomal de Nódulo y Raíz.

Aunque el análisis de las fracciones solubles de raíz y nódulo nos permite la identificación de proteínas específicas del nódulo, no es posible de esta manera diferenciar entre proteínas

específicas del nódulo de origen vegetal (nodulinas) y proteínas bacterianas. Por otro lado el análisis de extractos crudos vegetales en geles bidimensionales tipo O'Farrell es difícil y poco reproducible. Para solucionar estos problemas se analizaron los patrones de los productos de traducción in vitro de RNA poli (A)' en lisado de reticulocito de conejo marcados con ³⁵S-metionina en geles de poliacrilamida con SDS (PAGE-SDS) y geles bidimensionales tipo O'Farrell (1975). Durante el transcurso de este trabajo se observó que resultaba equivalente el usar 1 ug de RNA poli (A)' ó 10 ug de RNA polisomal total en cuanto al patrón de proteínas sintetizadas in vitro.

Al comparar los productos de traducción in vitro de RNA polisomal de nódulo, raíz y hoja separados en PAGE-SDS (Fig 8) se encontró que en el nódulo hay 2 polipéptidos muy abundantes de un peso molecular alrededor de 30 Kd que no se encuentran en raíz. Sin embargo en hoja hay un polipéptido muy abundante con un peso similar a uno de los presentes en el nódulo. En este tipo de análisis la leghemoglobina no es detectada debido a que esta proteína en frijol sólo tiene un residuo de metionina (Lee y Verma, 1981), la metionina inicial y ésta es procesada en el sistema lisado de reticulocito. A este grupo de polipéptidos específicos del nódulo los hemos denominado con el nombre genérico de nodulina- 30. El comportamiento extraño (Fig. 9) que la nodulina 30 presenta en IEF, podría ser explicado por modificaciones post-traduccionales o una posible asociación con

ácidos nucleicos como RNA, lo cual mediría que la proteína pueda enfocarse bien (Stori y cols., 1982).

De las 15 nodulinas observadas una de ellas con un pI de 7.0 y un peso de 42 Kd ha sido identificada como la forma específica del nódulo de glutamino sintetasa (GS γ) (Fig 9) y con un pI más ácido y un peso molecular semejante a la forma de GS β , común en raíz y nódulo (Fig 9). La enzima uricasa II no es detectada en estos geles debido a que su pI es de 9.0.

En la raíz hay por lo menos 10 mRNAs específicos de la raíz (Fig 9a) que son reprimidos en el nódulo. Un ejemplo de este tipo de proteínas es la forma de la glutamino sintetasa (GS) (Fig 9a), la forma que sólo se encuentra en hipocotilos y raíces y que no es detectada en nódulos (Lara y cols., 1983; Lara y cols., 1984; Ortega y cols., 1986; Madilla y cols., 1987; Gajhardt y cols., 1986).

Expresión de la Nodulina 30 Durante el Desarrollo del Nódulo

Del análisis de los productos de traducción in vitro de RNA polisomal de nódulos se encontró que uno de los polipéptidos más abundante eran las nodulinas -30. Para la determinación del patrón de expresión a lo largo del desarrollo de estas, se llevó a cabo mediante el análisis de los productos de traducción in vitro de RNA polisomal en geles bidimensionales de nódulos a diferentes edades (Fig 10). La nodulina -30 se detecta desde el día 13 después de la infección con Rhizobium. Aunque a los 11 días la

esta presente (Fig 11), lo cual indica una expresión diferencial de las nodulinas en frijol. Al comparar las fracciones solubles contra los productos de traducción in vitro de nódulo, se encuentra que la nodulina -30 sólo es evidente por traducción in vitro ya que in vivo no se detecta una proteína de peso y abundancia similar (Fig 6 vs Fig 8; Fig 7 vs Fig 9b).

Clonación de los cDNAs de las Nodulinas más Abundantes de Frijol.

A partir de un banco de cDNA construido en pBR322 a partir de RNA poli (A)+ de nódulos de frijol de 26 días (Campos y cols., 1987) fueron aisladas las clonas de leghemoglobina, y nodulina -30. Como primer paso se aislaron clonas específicas del nódulo por hibridización diferencial con cDNA- P de raíz y nódulo. Aproximadamente el 10% de las clonas específicas de nódulo hibridizaron con el cDNA de leghemoglobina de soya. Una de las clonas específicas del nódulo, de 700 pb (PNF-N300) selecciona un RNA mensajero que al ser traducido in vitro da un producto del grupo de la nodulina -30 (Fig 12b). El producto de traducción del RNA híbrido-seleccionado tiene un comportamiento semejante al de la nodulina 30 (Fig 12B). Por hibridización de PNF-N300 con otras clonas específicas del nódulo se han obtenido 3 clonas más de la nodulina -30, de un tamaño de 900, 800 y 160 pb.

Para la clonación de uricasa (PNF-UR07) se hizo el análisis de un banco de cDNA de nódulo de 20 días en pUC9 con cDNA - P de RNA inmunoseleccionado para uricasa (Sánchez y cols., 1987) y su identidad fué confirmada por hibridización con el cDNA de uricasa de soya.

Expresión de Leghemoglobina, uricasa y nodulina 30 Durante el Desarrollo del Nódulo.

Para determinar la forma de expresión de los RNA mensajeros de leghemoglobina, uricasa y nodulina -30 de frijol en el nódulo, se determinaron los niveles de mRNA por hibridización de la sonda radioactiva correspondiente con RNA polisomal de raíz y de nódulos de diferentes etapas de desarrollo, separado en geles tipo "Northern" (Fig 13). Los RNAs mensajero de leghemoglobina y uricasa, tienden a acumularse durante el desarrollo de nódulo hasta llegar a un nivel máximo (18d), posteriormente disminuyen su cantidad (Fig 13). Sin embargo la nodulina -30 no sigue este patrón, si no que su tendencia es la de seguirse acumulando conforme avanza la edad del nódulo (Fig 13).

Junto con el dato de traducción in vitro y "Northern" somos capaces de postular que la nodulina -30 es junto con la leghemoglobina el transcrito más abundante del nódulo de frijol.

Usando un oligonucleótido de una zona de la región no traducida 3' de GS gamma (Gebhardt y cols., 1986) como sonda radioactiva confirmamos en "Northern" la naturaleza de nodulina de este péptido en frijol. (Fig 14)

Comparación con los Productos de Traducción in vitro de RNA polisomal de Nódulos de Soya y *Leucaena leucocephala*.

Para determinar si la nodulina -30 de frijol es específica de esta leguminosa o es una nodulina común a otras leguminosas tropicales (P. ej. soya, *Leucaena leucocephala*) analizamos los patrones de traducción in vitro del RNA polisomal de nódulo de soya y *L. leucocephala* encontrándose que en soya (Fig 15) y en *L. leucocephala* (Fig 16) no hay contraparte de la nodulina -30 de frijol.

Análisis del patrón de nodulinas de frijol en nódulos con pocas células infectadas.

Para determinar si es necesaria la presencia de la bacteria en forma intracelular en el nódulo para inducir la expresión de nodulinas, se analizarán los patrones de proteína de nódulos efectivos en fijación formados por la cepa de *R. phaseoli* CIAT899 versus nódulos no efectivos, con pocas células infectadas formadas por: (a) La cepa *R. phaseoli* CE106 derivada por mutagénesis con Tn5 de la cepa CE3 (Noel y cols., 1984), y (b) nódulos formados por una cepa de *Rhizobium* sp. (Cl180) (Martínez

y cols., 1987) que nodula efectivamente a la leguminosa Clitoria ternatea, pero que en frijol forma nódulos con pocas células infectadas. Al comparar las fracciones solubles de nódulos vacíos (28d) con nódulos efectivos (24d) (Fig 17) se observa que los niveles de las proteínas específicas del nódulo como la leghemoglobina, uricasa y la nodulina-100 se encuentran abatidos. En cambio hay una proteína de raíz de un peso molecular menor al de la nodulina-100 (R80) que en nódulos vacíos se encuentra en cantidades similares a la raíz y que sin embargo en nódulos efectivos parece que su expresión está reprimida (Fig 17). Una banda intermedia entre la nodulina -100 y R80 (Fig 17) no se detecta ni en raíz ni en nódulos efectivos pero si en nódulos inefectivos (N-85), posiblemente esta proteína sea un ejemplo de una nodulina temprana.

Siguiendo este mismo tipo de análisis, pero sobre los productos de traducción in vitro de RNA polisomal de nódulos efectivos (CIAT899) y nódulos vacíos (Cl180) se encontró que la nodulina -30 no se detecta en nódulos vacíos (Fig 18) aunque el resto del patrón es semejante al del nódulo efectivo (Fig 9b), detectándose la forma gamma de GS. Es interesante notar que aunque muy probablemente las cepas CE106 y Cl180 tengan alteraciones diferentes, los nódulos formados por estas cepas son similares, por lo menos a nivel del patrón de proteínas.

IV DISCUSION Y CONCLUSIONES.

La asociación simbiótica entre Rhizobium y leguminosas da como resultado, a nivel molecular, la inducción de RNAs mensajeros y proteínas organo-específicas denominadas nodulinas. En frijol hemos determinado la existencia de por lo menos 18 nodulinas (Phaseolus vulgaris L.) mediante el análisis electroforético en PAGE-SDS y 2D-PAGE de diferentes fracciones del nódulo y de los productos de traducción in vitro de los mRNAs de nódulo.

Para cuatro de las nodulinas de frijol (Fig 6) ya se ha descrito una función en particular; dos de ellas están relacionadas con el apoyo a la función del bacteroide (leghemoglobina y sacarosa-sintetasa) y dos con la asimilación del nitrógeno fijado (GS) y uricasa II). A excepción de la GS detectada sólo en frijol (Lara y cols., 1984), otras nodulinas han sido encontradas en soya (Glycine max) Verma y cols., 1986). Esta leguminosa tropical está muy relacionada con el frijol, por lo cual la existencia de nodulinas similares a las de frijol era de esperarse.

También hemos determinado la existencia de otras proteínas específicas del nódulo, posiblemente de origen vegetal, muy abundantes con función desconocida. Entre ellas una proteína con un peso molecular de 205 kd, similar al de la enzima glutamato sintasa (GOGAT) (Fig 17) de nódulos de Lupinus angustifolius (Robertson y cols., 1975); hay otra proteína específica del

nódulo que migra de manera aberrante en PAGE-SDS (Fig. 17) posiblemente debido a que, sea altamente hidrofóbica o que este glucosilada. Curiosamente esta proteína se tiñe de un tono diferente a las demás proteínas del nódulo con azul de Coomassie; actualmente estamos llevando a cabo su purificación y una caracterización más completa.

A partir del análisis en 2D-PAGE de los productos de traducción in vitro hemos detectado hasta 11 nodulinas (Fig 9), de éstas, las más prominentes, son un grupo de polipéptidos muy abundantes, a los cuales denominamos genéricamente como grupo nodulina-30, con un peso molecular de 30 kd y con un comportamiento en IEF peculiar, ya que estos polipéptidos atraviezan el gradiente de pH (4.0 - 7.0) del gel de la primera dimensión, y visualizándose como un barrido (Fig. 9). A partir de un banco de cDNA de RNA poli (Λ^+) de nódulo hemos aislado una clona, PNF-N300, que selecciona por hibridización con RNA poli (Λ^+) un RNA mensajero que codifica para alguno(s) de los péptidos que componen el grupo de nodulina-30 (Fig. 12). Estas nodulinas poseen características muy interesantes que las hacen merecedoras de un análisis más exhaustivo. Estas características son: (i) su punto isoelectrónico aberrante; (ii) su gran abundancia como transcrito pero su ausencia in vivo o incapacidad de detectarla en la fracción soluble del nódulo y (iii) su ausencia en nódulos con pocas células infectadas. Una posibilidad para explicar la causa del comportamiento electroforético peculiar de la

nodulina-30, es que esta proteina pudiera interaccionar con ácidos nucleicos, específicamente con RNA ya que el lisado de reticulocito no tiene DNA. Esta interacción formaría un complejo nucleoproteico que quedaría atrapado por la malla del gel, dando como resultado el barrido de la nodulina-30. Después de un tratamiento del reticulocito con RNAsa pancreática no se observó ningún cambio en el comportamiento en IEF de la nodulina-30, lo cual descartó dicha posibilidad. También sería posible que la nodulina-30 fuera codificada por una familia de RNAs que traducen para polipéptidos con un peso molecular semejante, pero con pI's muy heterogéneos (4.0 - 7.0). Esto explicaría porque la clona pNF-N300 selecciona un RNA que al ser traducido dá un producto con un barrido similar al de la nodulina-30 (Fig 12). Datos que apoyan la idea de que el agrupamiento de 30 kd correspondan a una familia de genes son: su comportamiento como una unidad durante el desarrollo del nódulo (Fig 10) así como cuando se bloquea este desarrollo. De aquí que surja la necesidad de conocer el número de copias detectadas con pNF-N300 al usarla como sonda contra DNA genómico de frijol. Por último puede ser que se trate de un artefacto generado solo en el lisado de reticulocito de conejo, pudiendo ser posible que en la planta nada de esto ocurra. Para analizar esto se están haciendo traducciones en lisado de germen de trigo ³H-leucina y ³⁵S-metionina. A partir de los experimentos de traducción in vitro se puede apreciar que el grupo de nodulina-30 son los transcritos más abundantes del

nódulo de frijol, aunque también se podría argumentar que la nodulina-30 fuera un polipéptido rico en residuos de metionina. Sin embargo, los experimentos tipo "Northern" usando PNF-N300 (Fig. 13) confirman la suposición de que los mRNAs de la nodulina-30 son los más abundantes de la población de RNA poli(A⁺) del nódulo. Al tratar de detectar la correspondiente in vivo no encontramos ni en fracción soluble ni en fracción peribacteroidal una proteína abundante en el rango de 30 kd (Fig. 6), ni con un comportamiento aberrante en IEF (Fig. 7). De aquí surge la paradoja de que aunque las nodulinas-30 sean junto con las leghemoglobinas los transcritos más abundantes del nódulo de frijol, estas no se hayan localizado in vivo. Algunas de las posibles razones son: (i) esta proteína puede encontrarse en una fracción que no hemos analizado (pared celular, organelos); (ii) que sufra modificaciones postraduccionales que la hagan migrar con un peso molecular diferentes (glucosilaciones, hidroxilaciones, proteólisis) y (iii) que la nodulina-30 sea una proteína de vida media corta.

Aunque esta nodulina es muy abundante, su presencia en otras leguminosas como soya (Fig 15) y Leucaena leucocephala (Fig 16) no es detectable, sin embargo hemos detectado algo de hibridización con RNA poli(A⁺) de chicharo (dato no mostrado), lo cual indicaría que posiblemente la nodulina-30 tenga una contraparte con funciones similares en otras leguminosas.

Al analizar los nódulos inducidos por cepas de Rhizobium phaseoli y otras de amplio espectro que no pueden invadir a la planta dando nódulos "vacíos" de bacterias encontramos que están abatidos los niveles de todas las nodulinas antes descritas (Fig 17) y la ausencia de la nodulina-30 (Fig 18), indicando que es necesaria la presencia del bacteroide para la inducción de la nodulina-30. El patrón de traducción que se observa con nódulos "vacíos" es similar al de los nódulos efectivos a los 11 días del desarrollo (Fig 11). A los 11 días aún no se está llevando a cabo la infección en nódulos efectivos, en este estudio el nódulo más bien parece un meristemo (Newcomb, 1981) cosa que pasa con los nódulos "vacíos" los cuales se parecen más morfológicamente a un nódulo efectivo (Noel y cols., 1986). Esto es también apoyado por nuestros datos ya que por ejemplo esta abatida la inducción de uricasa, una nodulina de células no infectadas y además en estos nódulos se siguen observando proteínas específicas de raíz (Fig 17; R90). Aparentemente los nódulos formados por R. phaseoli CE106 y R. sp. Cl180 parecen estar bloqueados en un paso del desarrollo del nódulo. Esto explicaría el porque es observada la forma gamma de GS en nódulos vacíos y en nódulos de 11 días (Fig 11 y Fig 17). Concluyendo, los genes de nodulinas parecen responder a un programa de desarrollo, el cual es regulado por señales de la planta y la bacteria (presencia de bacteroide, fijación de nitrógeno, tensión de oxígeno, factores bacterianos).

Debido a su abundancia es posible pensar que la nodulina-30 ha de tener un papel importante en el nódulo. La información obtenida hasta ahora es insuficiente para poder asignarle alguna función. La ausencia de la nodulina-30 en nódulos "vacíos" podría estar relacionada a la carencia de membranas peribacteroidales. Sin embargo, en nódulos vacíos de soya se ha encontrado que para la nodulina-26, una nodulina de la membrana peribacteroidal, el nivel del correspondiente RNA se sigue aún sintetizando a los encontrados en la cepa silvestre (Fortin y cols, 1987).

Un ejemplo de familia de nodulinas ha sido descrito en soya, estas son nodulinas que aunque tienen diferente localización celular y peso molecular (25; 25.5; 27 y 44 kd), poseen 2 dominios con un 80% de homología (Jacobs y cols., 1987; Sandul y cols., 1987; Sengupta-Gopulan y cols, 1986). Un caso semejante podría estar sucediendo con la heterogeneidad de la nodulina-30.

Estudios posteriores como la secuenciación de la(s) nodulina(s)-30, el número de copias en el genoma, su localización in vivo y celular y su semejanza con otras proteínas responderá algunas de las interrogantes aquí surgidas.

REFERENCIAS.

- Albersheim P y Anderson-Prouty AJ. (1975). *Ann Rev Plant Physiol* 26, 31.
- Ames P y Bergman K. (1981). *J Bacteriol* 30, 245.
- Atkins CA, Pate JS y Sharkey PJ. (1975). *Plant Physiol* 56, 807.
- Auger S y Verma DPS. (1981). *Biochemistry* 20, 1300.
- Awonaike KO, Lea PJ y Mifflin BJ. (1981). *Plant Sci Lett* 23, 189.
- Banfalvi Z, Randhawa GS, Koncz C, Kiss A, Dusha I y Kondorosi A. (1981). *Mol Gen Genet* 184, 318.
- Batut J, Terzaghi B, Gherardi M, Huguët M, Terzaghi E, Garnerone AM, Boistard P y Huguët T. (1985). *Mol Gen Genet* 199, 232.
- Bauer WD. (1981). *Ann Rev Plant Physiol* 32, 407.
- Bisseling T, Been I, Klugkist A, van Kammen A y Nadler K. (1983). *EMBO J* 2, 961.
- Bergmann H, Preddie E y Verma DPS. (1983). *EMBO J* 2, 2335.
- Boland MJ y Benny G. (1977). *Eur J Biochem* 79, 355.
- Brewin NJ, Robertson G, Wood EA, Wells B, Larkins AP, Galfre G, Butcher GW. (1985). *EMBO J* 4, 605.
- Broughton WJ y Dilworth MJ. (1971). *Biochem J* 125, 1075.
- Campos F, Vázquez M, Ortega JL, Padilla J, Enriquez C y Sánchez F. (1987). *Plant Mol Biol* Aceptado para su publicación.
- Christofferson RE y Laties GG. (1982). *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 4060.
- Cullimore JV, Lara M, Lea PJ y Mifflin BJ. (1983). *Planta* 157, 245.
- Currier WM y Strobel GA. (1974). *Science* 146, 434.
- Dart PJ. (1975). En "The Development and Function of Roots", ed. JG Torrey, DT Clerkson, pp. 468-506. London: Academic Press.
- Dart PJ. (1977). En "A Treatise on Dinitrogen Fixation" Vol. 3, ed. RWF Hardy WS Silver, pp 367-372. New York: Wiley press.
- Dilworth MJ y Glen AR. (1984). En "Nitrogen Fixation and CO₂ Metabolism". ed PW Ludden, JE Burnis. Elsevier press.
- Downie JA y Johnston AWB. (1986). *Cell* 47, 153.
- van Egeraat AWSM. (1972). *Meded Land Wagenin* 72.
- Fahraeus G y Ljunggren H. (1959). *Physiol Plant* 12, 145.
- Fortin MG, Morrison NA y Verma DPS. (1987). *Nucl Acid Res* 15, 813.
- Fuller F, Kunstner PW, Nguyen T y Verma DPS. (1983). *Proc Natl Acad Sci USA* 80, 2594.

- Gebhardt C, Oliver JE, Forde BJ, Saarelain R, y Miflin BJ. (1986). EMBO J 5, 1429.
- Graham PH. (1963). J Gen Microbiol 30, 245.
- Graham PH. (1980). En" CIAT Rhizobium phaseoli collection".
- Govers S, Gloudemans T, Moerman M, van Kammen A y Bisseling T. (1985). EMBO J 4, 861.
- Hanks JF, Tolbert NE y Schubert KR. (1981). Plant Physiol 68,65.
- Hanks JF, Schubert KR y Tolbert NE. (1983). Plant Physiol 71, 869.
- Horvath B, Kondorosi E, John M, Schmidt J, Torok I, Gyorgypal Z, Barabas I, Wieneke U, Schell J y Kondorosi A. (1986). Cell 46, 335.
- Hubbell DH, Morales VM y Umali-Garcia M. (1978). Appl Environ Microbiol 35, 210.
- Jackson AD y Larkins BA. (1976). Plant Physiol 57,5.
- Jacobs FA, Zhang M, Fortin MG y Verma DPS. (1987). Nucl Acid Res 15, 1271.
- John M, Schmidt J, Wieneke U, Kondorosi E, Kondorosi A y Schell J. (1985). EMBO J 4, 2425.
- Jordan JC. (1982). Int J Syst Bacterio 32, 136.
- Kondorosi E, Banfalvi Z, y Kondorosi A. (1984). Mol Gen Genet 193, 445.
- Kondorosi A, Kiss GB, Dushn I. (1984) En" Current Developments in Biological Nitrogen Fixation" ed Subba-Rai N.S. London: Edward Arnold Publisher.
- Kondorosi E y Kondorosi A. (1986). TIBS 11, 296.
- Laemmli UK. (1970). Nature 227, 689.
- Lang-Unnasch N y Ausubel FM. (1985). Plant Physiol 77, 833.
- Lara M, Cullimore JV, Lea PJ, Miflin BJ, Johnston AWB y Lamb JW. (1983). Planta 157, 254.
- Lara M, Porta H, Padilla J, Folch J y Sánchez F. (1984). Plant Physiol 76, 1019.
- Laskey RA y Mills AD. (1975). Eur J Biochem 56, 335.
- Lea PJ, Awonaike O, Cullimore JV y Miflin BJ. (1982). Israel J Botany 31,140.
- Lee JS y Verma DPS. (1984). EMBO J 3, 2745.
- Legocki RP y Verma DPS. (1979). Science 205, 190.
- Legocki RP y Verma DPS. (1980). Cell 20, 152.
- Ljunggren H y Fahraeus G. (1961). J Gen Microbiol 26, 521.
- Long SR, Buikema WJ y Ausubel FM. (1982). Nature 298, 485.

LIBRARY OF THE
STATE OF CALIFORNIA
DEPT. OF AGRICULTURE

Lowry OH, Rosenbraugh NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951). J Biol Chem 185, 265.

Maniatis T, Fritsch EF y Sambrook J. (1982). Molecular Cloning a Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory.

Margalef R. (1978). Ecología. Madrid:Ed. Omega.

Martinez E, Pardo MA, Palacios R y Ceballos MA. (1985). J Gen Microbiol 131, 1779.

Martinez E, Florez M, Brom S, Romero D, Davila G y Palacios R. (1987). Submitido a Plant and Soil.

McParland RH, Guevara JG, Becker RR y Evans HJ. (1976). Biochem J 153, 597.

Meeks JC, Wolk CP, Schilling N, Shaffer PW, Avissar Y y Chien WS. (1978). Plant Physiol 61, 980.

Mellor RB, Christenesn TMIE, Werner D. (1986). Proc Natl Acad Sci USA 83, 659.

Mifflin BJ y Lea PJ. (1980). En "The Biochemistry of Plants" Vol 5, ed. BJ Mifflin, pp 65-113. London: Academic Press.

Morell M y Copeland L. (1985). Plant Physiol 78, 149.

Mulligan JT y Long SR. (1985). Proc Natl Acad Sci USA 82, 6609.

Napoli CA, y Hubbell DH. (1975). Appl Microbiol 30, 1003.

Newcomb EM y Tandom SR. (1981). Science 212, 1394.

Newcomb W. (1981). Int Rev Cytol Suppl 13, 247.

Noel KD, Sanchez A, Fernandez L, Leemans J y Ceballos M. (1984). J Bacteriol 158, 148.

Noel KD, VandenBosch KA y Kulpaen B. (1986). J Bacteriol 168, 1392.

Noti JD, Dudas B, Szalay AA. (1985). Proc Natl Acad Sci USA 82, 7379.

Nuti MP, Lepidi AA, Prakash RK, Schilperoort RA y Cannon TC. (1979). Nature 282, 533.

O'Farrell PH. (1975). J Biol Chem 250, 4007.

Ohyama T y Kumazawa K. (1980). Soil Sci Plant Nutr 26, 109.

Ortega JL, Campos F, Sánchez F y Lara M. (1986). Plant Physiol 80, 1051.

Padilla JE, Campos F, Conde V, Lara M, y Sánchez F. (1987). Plant Mol Biol 9, 65.

Pate JS, Gunning BES y Brianty LG. (1969). Planta 85, 11.

Pelham HRB y Jackson RJ. (1976). Eur J Biochem 67, 247.

Nguyen J. (1986). Physiol Vég 24, 263.

Quinto C, de la Vega H, Flores M, Fernández L, Ballado T, Soberon G y Palacios R. (1982). Nature 299, 724.

Quinto C, de la Vega H, Flores M, Leemans J, Cevallos M, Pardo MA, Azpiroz R, Girard M, Calva E y Palacios. (1985). Proc Natl Acad Sci USA 82, 1170.

Reynolds PHS, Boland MJ, Belvins DG, Schubert KR y Randall DD. (1982). Plant Physiol 69, 1334.

- Robertson JG, Lyttleton P, Bullivant S y Grayston GF. (1978a). *J Cell Sci* 30, 129.
- Robertson JG, Warburton MP, Lyttleton P, Fordyce AM y Bullivant S. (1978b). *J Cell Sci* 30, 151.
- Robertson JG, Warburton PW y Farnden KJF. (1975). *FEBS Lett* 55, 33.
- Robertson JG y Farnden KJF. (1980). En "The Biochemistry of Plants" Vol 5, ed. BJ. Miflin, pp. 65-113. London: Academic Press.
- Robertson JG, Wells B, Bisseling T, Farnden KJF y Johnston AWB. (1984). *Nature*, 311, 254.
- Rostas K, Sista PR, Stanley J y DPS Verma (1984). *J Bacteriol* 158, 920.
- Sánchez F, Campos F, Padilla J, Bonneville JM, Enriquez C y Caput D. (1987). *Plant Physiol* 84, en prensa.
- Sandal NN, Bojsen K, Marcker KA. (1987). *Nucl Acid Res* 15, 1507.
- Schmidt J, John M, Wieneke U, Krussmann HD y Schell J. (1986). *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 9581.
- Schubert KR. (1981). *Plant Physiol* 67, 79s.
- Sen D. y Schulman HM. (1980). *New Phytol* 85, 243.
- Sengupta-Gopaland C, Pitas JW, Thomson DV, y Hoffman LM. (1986). *Mol Gen Genet* 203, 410.
- Shelp BJ, Atkins CA, Storer PJ y Calvin DT. (1983). *Arch Biochem Biophys* 224, 429.
- Solheim B y Raa J. (1973). *J Gen Microbiol* 77, 241.
- Stewart GR, Mann AF y Fentem PA. (1980). En "The Biochemistry of Plantas" pp 271-327.
- Sutton PCS, Stanley J, Zclechowska MG y Verma DPS. (1984). *J Bacteriol* 158, 920.
- Suzuki A, Vidal J, Nguyen J y Gadal P (1984). *FEBS Lett* 173, 204.
- Thomas PS. (1980). *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 5201.
- Thummaler F y Verma DPS. (1986). En "Third International Symposium on the Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions". Montreal.
- Torok I, Kondorosi E, Stepkowski T, Posfai J y Kondorosi A. (1984). *Nucl Acid Res* 12, 9509.
- Triplett EW. (1985). *Plant Physiol* 77, 1004.
- VandenBosch KA, Noel KD, Kaneko Y y Newcomb EH. (1985). *J Bacteriol* 162, 950.
- Verma DPS y Bal AK. (1976). *Proc Natl Acad Sci USA* 73, 3843.
- Verma DPS, Zogbi V y Bal AK. (1978). *Plant Sci Lett* 13, 137.
- Verma DPS, Kazazian V, Zogbi V y Bal AK. (1978). *J Cell Biol* 78, 919.
- Verma DPS y Long S. (1983). *Int Rev Cytol Suppl* 14, 211.
- Verma DPS, Fortin MG, Stanley J, Mauro VP, Purohit S y Morrison N. (1986). *Plant Mol Biol* 7, 51.
- Vincent JM. (1980). En "Nitrogen Fixation" Vol 2, ed. WE Newton, WH Orme-Johnson, pp 103-129. Baltimore: Univ Park Press.

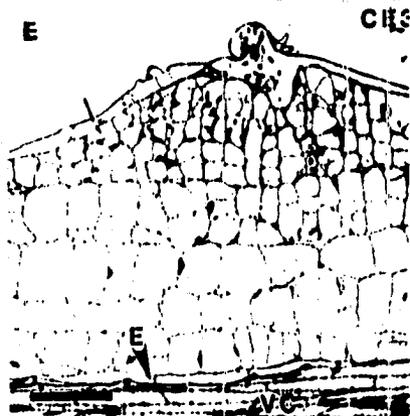
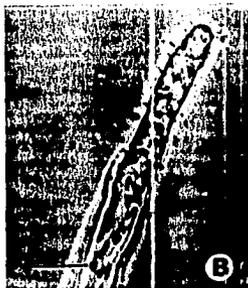


Fig. 1. El Proceso de Nodulación. A, Colonización de la Raíz; B, Unión a la Raíz; C, Enroscamiento de los Pelos Radicales; D, Hilo de Infección; E, Actividad meristemática; F, Nódulos de Frijol; G, Ultraestructura del Nódulo de Frijol.

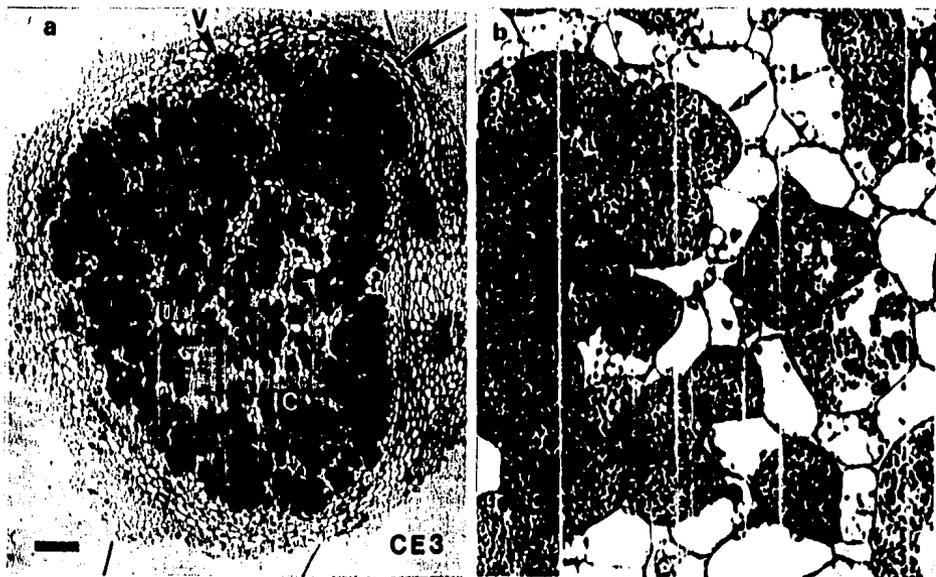


Fig. 2. Estructura del Nódulo de Frijol. Microscopía de luz de nódulos de frijol formados por la cepa de R. phaseoli CE-3. (a) Sección transversal mostrando: UC, células no infectadas; IC, células infectadas; V, haces vasculares. (b) Ultraestructura del nódulo mostrando células infectadas (CI) rodeadas por células no infectadas.

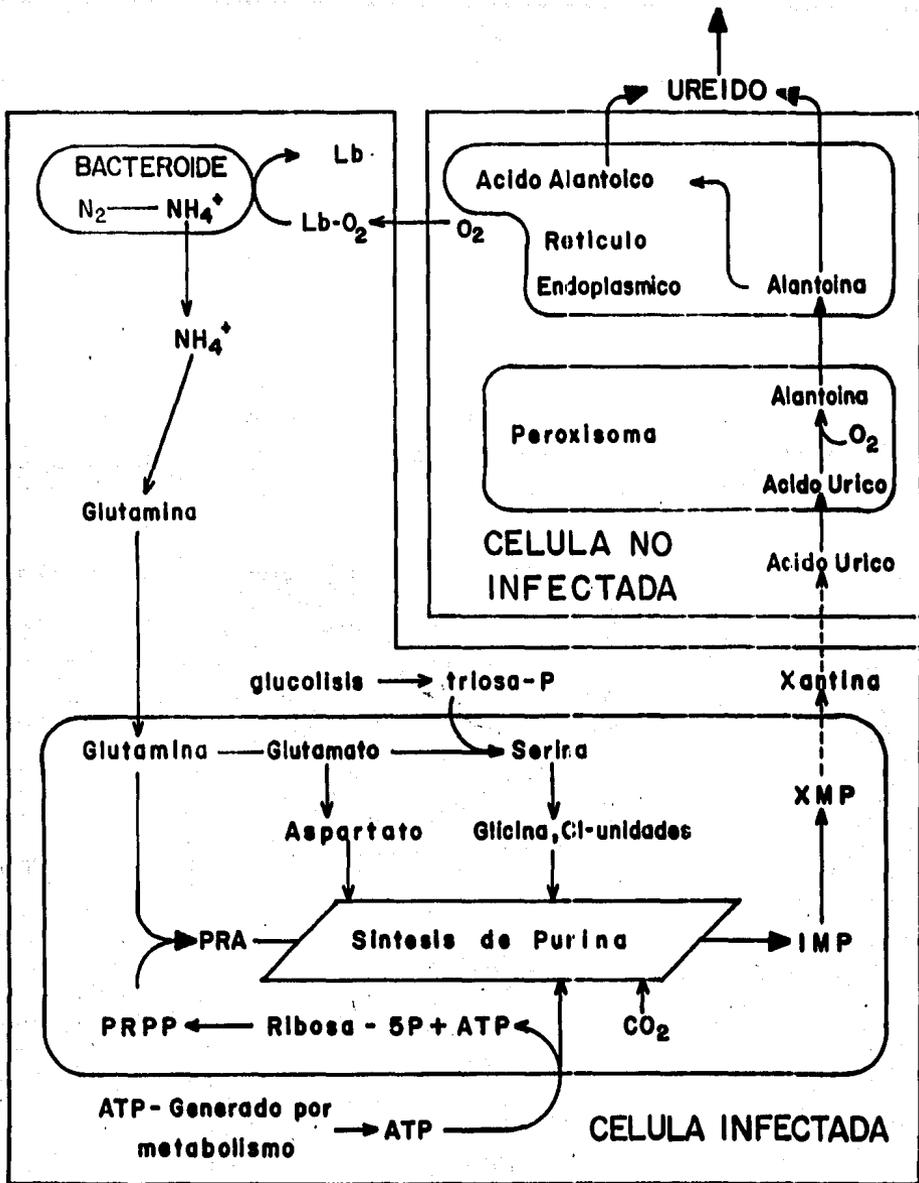


Fig. 3. VIAS DE ASIMILACION DE AMONIO, Y BIOSINTESIS Y METABOLISMO DE PURINAS EN NODULOS EXPORTADORES DE UREIDOS.

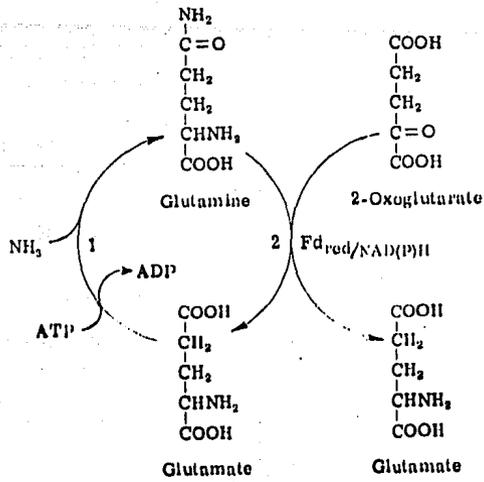


Fig. 4. El Ciclo de la Glutamato Sintasa. Enzimas participantes: (1) Glutamino Sintetasa; (2) Glutamato Sintasa.

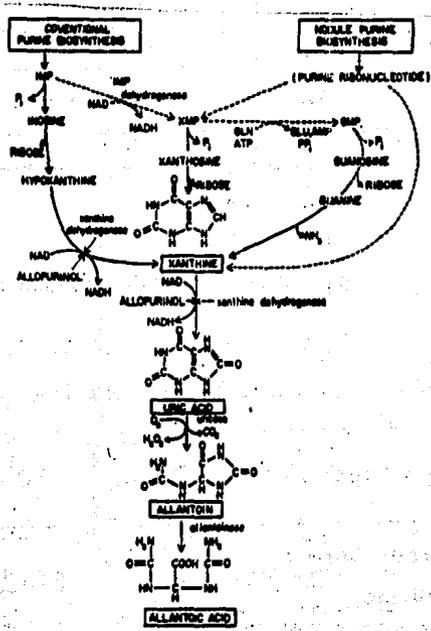


Fig. 5. Metabolismo del Nitrógeno Asimilado por el Nódulo en Leguminosas Tropicales.

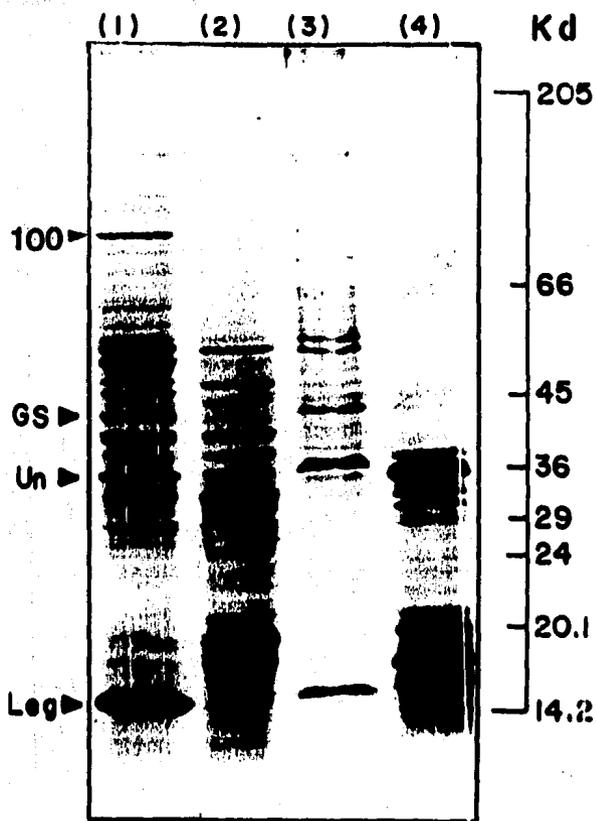


Fig. 6. Analisis de Diferentes Fracciones del Nódulo de Frijol. Se examinaron 150 ug de proteína por carril, el gel se tiñó con azul de Coomassie. (1) Proteína soluble de nódulo de frijol de 24 días formados por la cepa CIAT 899, (2) proteína soluble de raíces de 8 días sin infectar, (3) fracción peribacteroidal, (4) lisado de bacteroide de la cepa CIAT 899. El gel fué en gradiente 7.5%-15%.

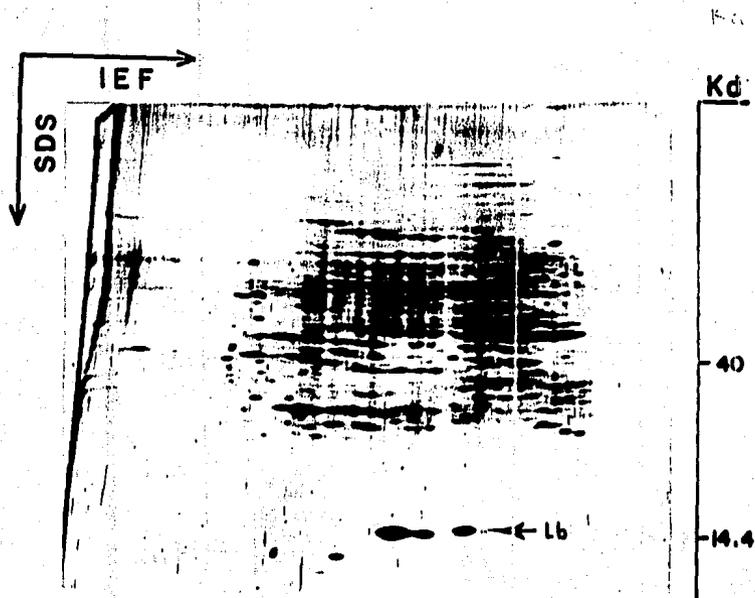


Fig. 7. Gel Bidimensional (IEF) de las Proteínas Solubles de Nódulo de Frijol de 24 días. La proteína de nódulos formados por la cepa CIAT 899 se extrajo con 50mM de Tris pH 7.5. Aproximadamente se analizaron 75 ug de proteína. En el gel de IEF los rangos de pH van de 7.5 (izquierda) a 4.5 (derecha). El gel de la segunda dimensión fue en gradiente 7.5%-20%. Las proteínas se visualizaron con plata.

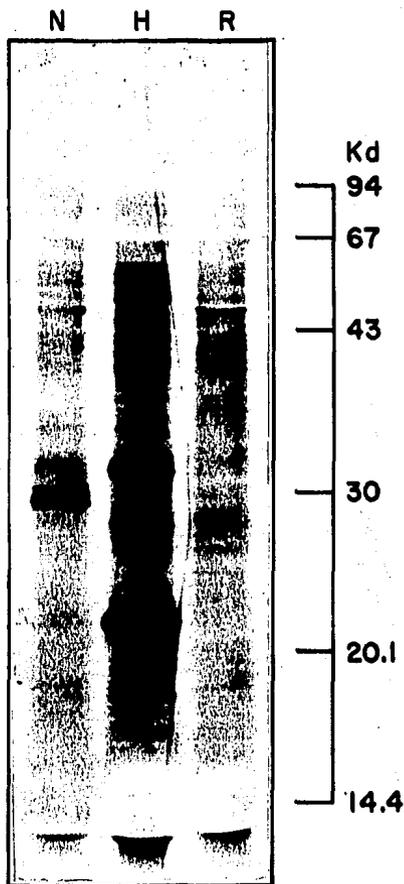


Fig. 8. Analisis de los Productos de Traducción in vitro de RNA polisomal de Nódulo de 20 días (N); Hoja (H); Raíz sin infectar 8 días (R). Los productos se analizaron en PAGE-SDS.

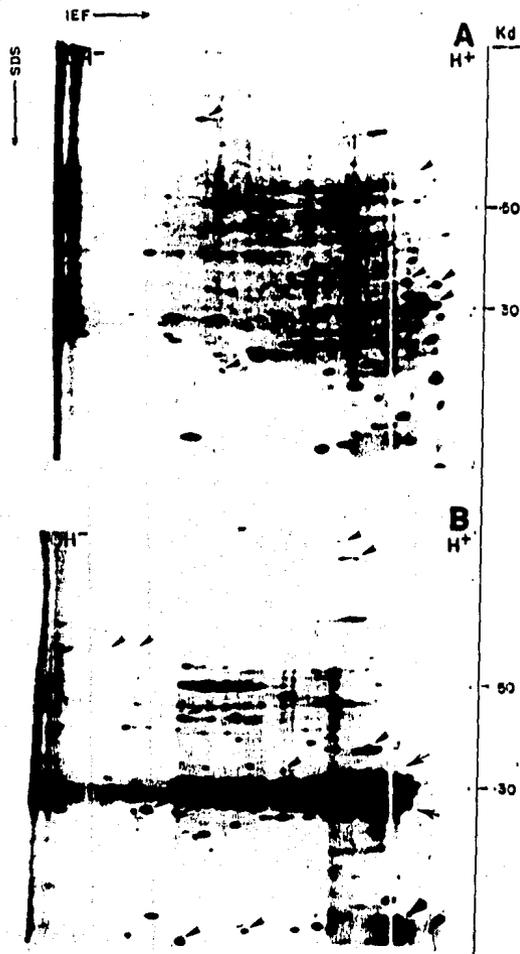


Fig. 9. Gel Bidimensional (IEF) de los Productos de Traducción in vitro de RNA Polisomal de: (A) Raíz no infectada de 8 días; (B) Nódulos de frijol formados por la cepa de R. phaseoli CIAT 899. Las flechas en el panel A indican productos específicos de la raíz; en el panel B se indican los productos específicos del nódulo (Nodulinas). Se analizaron aproximadamente 5×10^5 cpm en un volumen menor de 10 ul de reacción de traducción.

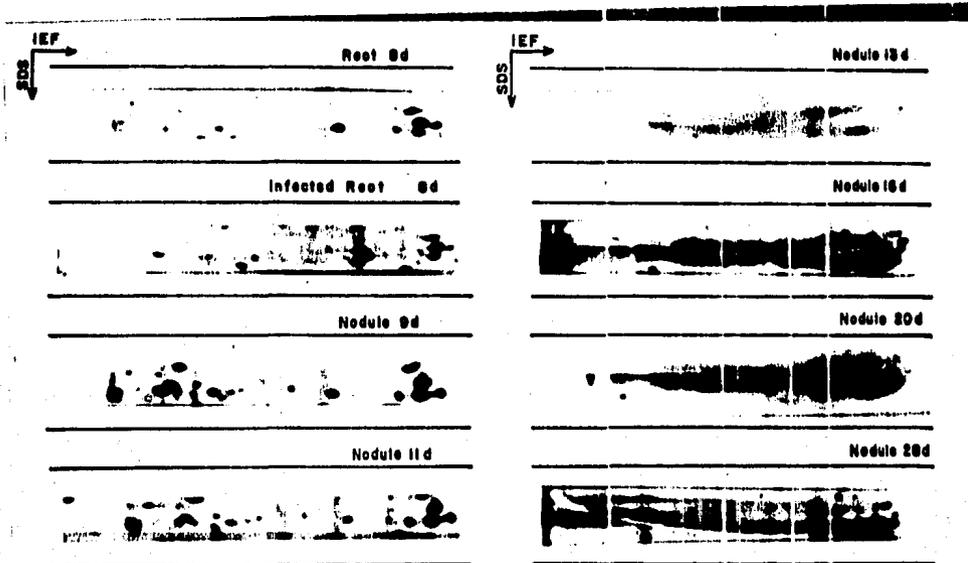


Fig. 10. Inducción de la Nodulina-30 Durante el Desarrollo del Nódulo. Analisis de los productos de traducción in vitro de RNA polisonal en geles bidimensionales. Sólo se muestra la zona de 30 Kd.

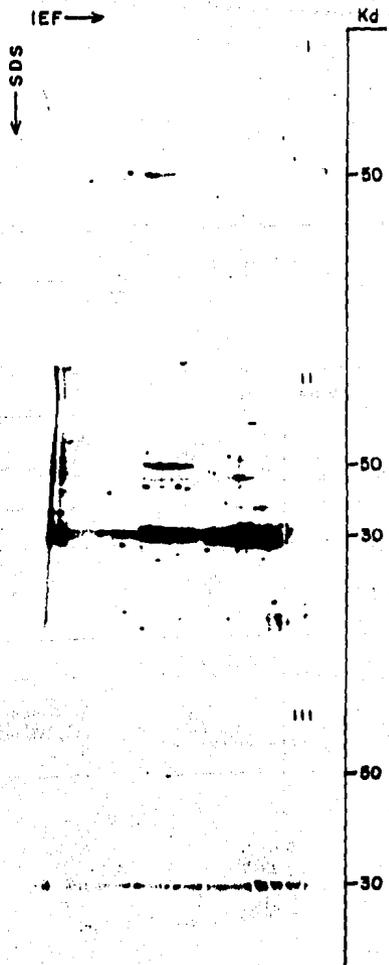


Fig. 12. Traducción de RNAs mensajeros Híbrido-Seleccionados por la clona - pNF-N300. El DNA de la clona pNF-N300 fué linearizado, transferido a nitrocelulosa e hibridizado a RNA polisomal de nódulos de 18 días. El RNA hibridizado fué liberado, traducido y analizado en geles 2-dimensionales. (I) RNA seleccionado por pBR329; (II) RNA polisomal de nódulo; (III) RNA seleccionado por pNF-N300.

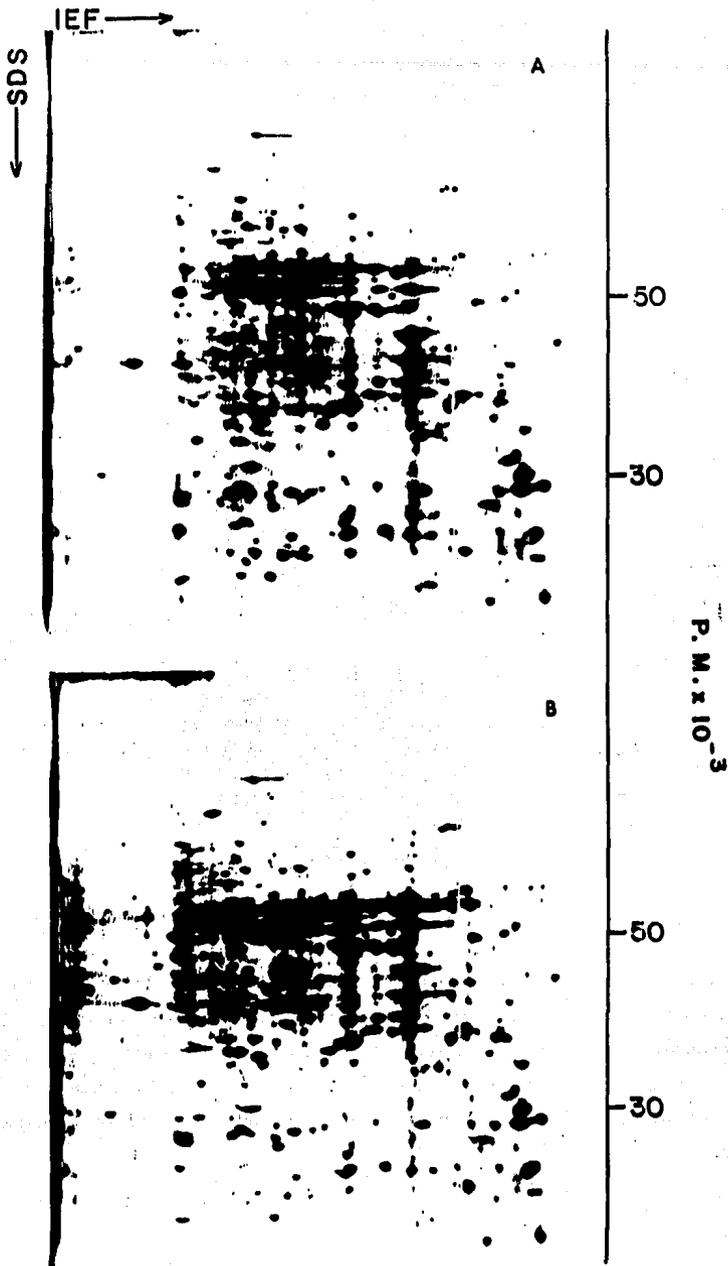


Fig 11 Gel Bidimensional (IEF) de los Productos de Traducción de ARN Polisomal de: (A) Nódulos de 9 días; (B) Nódulos de 11 días. Los nódulos fueron formados por la cepa CE3.

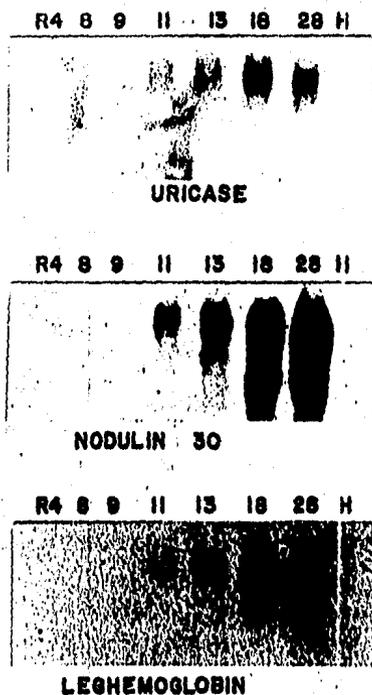


Fig. 13. Comparación de los Niveles de RNA mensajeros de las Nodulinas más abundantes de Frijol durante la Formación del Nódulo. 10 ug de RNA polisomal de diferentes estados de desarrollo del nódulo fueron separados en geles de agarosa-formaldehído, transferidos a nitrocelulosa e hibridizados con el inserto de la clona indicada. En cada panel se indica el tiempo de desarrollo, R4, raíz sin infectar de 4 días; H, hoja.



Fig. 14. Detección del mRNA Especifico de la Glutamina Sintetasa Nódulo-Específica (Gamma). Se analizaron aproximadamente 3 ug de RNA polismal total de: (1) Nódulo; (2) Raíz sin infectar de 8d y (3) Hoja. El RNA se separo en minigeles de agarosa-formaldehído, transferidos a nitrocelulosa e hibridizados contra un oligonucleotido de una zona de la región no traducida 3', especifica para la GS gamma.

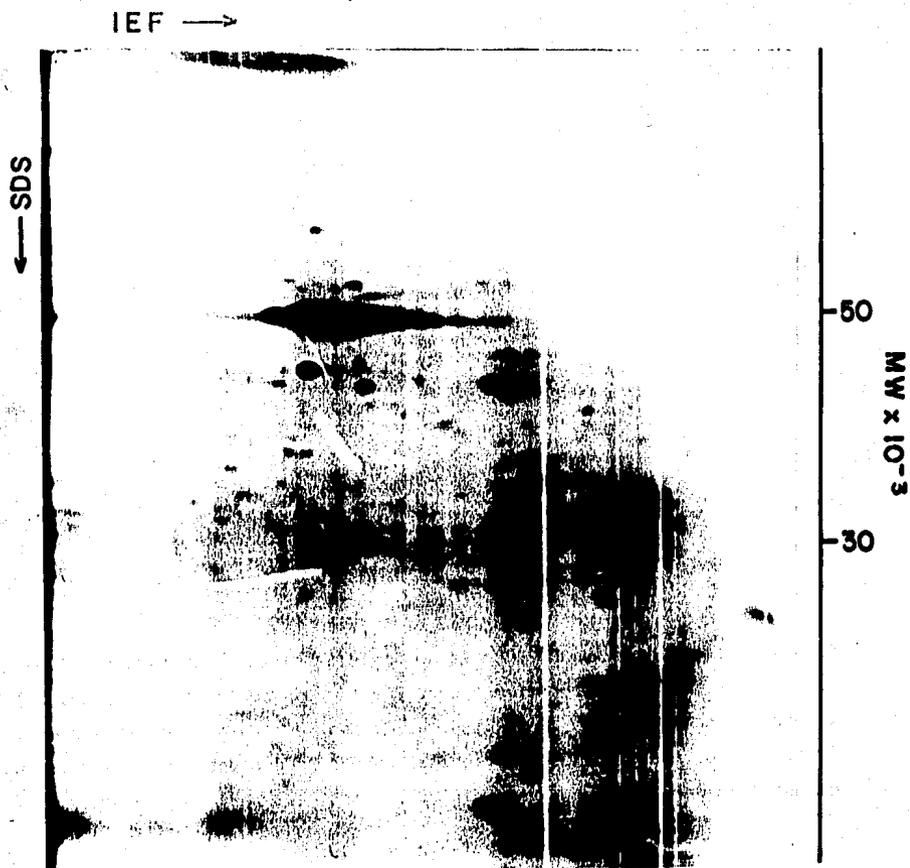


Fig.15. ANALISIS DE LOS PRODUCTOS DE TRADUCCION DE RNA POLISOMAL DE NÓDULOS DE SOYA DE 40 DÍAS.

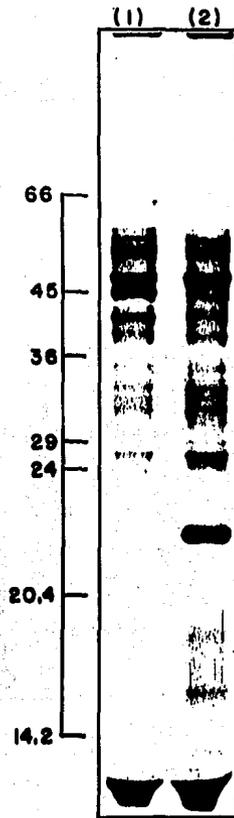


Fig. 16. ANALISIS DE LOS PRODUCTOS DE TRADUCCION in vitro DE RNA POLISOMAL DE RAIZ Y NODULO DE Leucaena leucocephala. LOS NODULOS FUERON FORMADOS CON LA CEPA CIAT-899. (1) RAIZ 10d; (2) NODULO 45d.

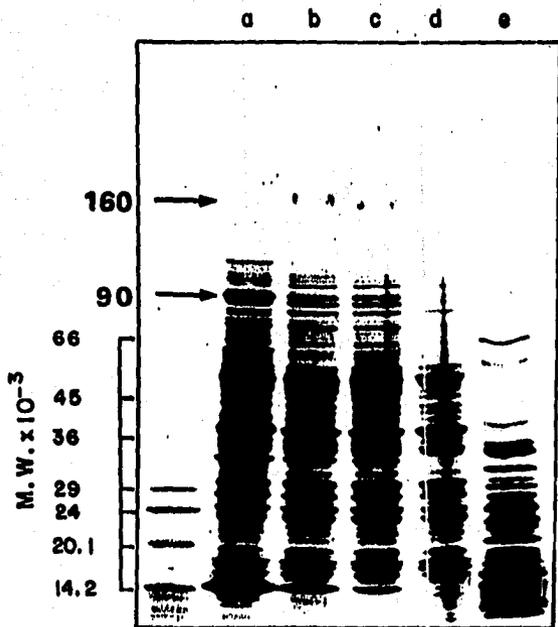


Fig.17 . Analisis de la Proteína Soluble de Nódulo de Frijol en PAGE-SDS en Gradiente 7.5%-20%. La proteína se extrajo con 50 mM de Tris pH 7.5. Aproximadamente 150 ug de proteína fueron examinados, el gel se tiño con azul de Coomassie. (a) Nódulos de frijol de 24 días formados por la cepa CIAT 899; (b) CF 106; (c) CFN Cly 80; Raíz sin infectar de 8 días; (d) Bacterioide de la cepa CIAT 899.

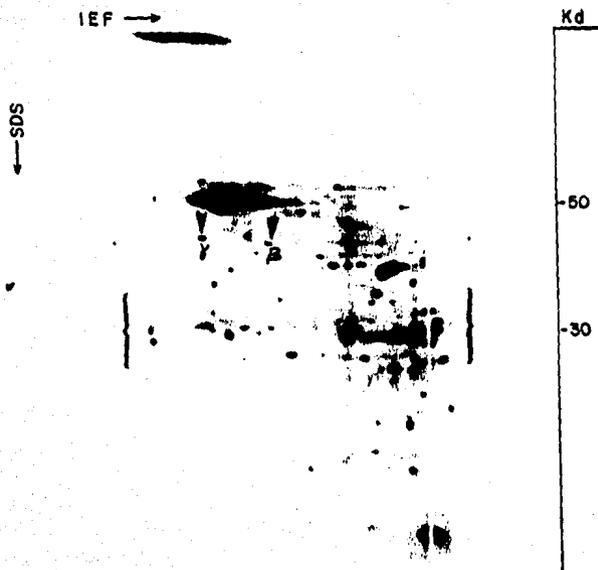


Fig. 18. Electroforetograma 2-D de los Productos de Traducción in vitro de Nódulos "vacíos". Los nódulos se formaron con la cepa de Rhizobium sp. C11 80 y se cosecharon a los 28 días. Las flechas indican las isoformas de la enzima glutamino sintetasa, los parentesis muestran la zona del gel donde se debería de detectar el agrupamiento de la nodulina-30 (ver Fig. 9B).