

03081

5.  
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

*Unidad Académica de los Ciclos  
Profesional y de Posgrado  
Colegio de Ciencia y Humanidades  
Instituto de Biotecnología*

**REGULACION DE FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA Y  
GLUTAMINA SINTETASA EN NODULOS DE FRIJOL  
(PHASEOLUS VULGARIS L.)**

**T E S I S**

*Que para obtener el grado de  
DOCTOR EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA*

*Que presenta*

**JOSE LUIS ORTEGA CARRANZA**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

*Cuernavaca, Morelos*

**1992**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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.

## RESUMEN

Se analizó la actividad y la composición de isoformas en nódulos de la fosfoenolpiruvato carboxilasa y la glutamina sintetasa, durante la simbiosis entre frijol (Phaseolus vulgaris) y Rhizobium, con el fin de determinar los factores simbióticos relacionados con su regulación. Este análisis se realizó a través de dos estrategias: (1) La utilización de cepas de Rhizobium con diferentes características simbióticas y (2) la utilización de altas concentraciones de CO<sub>2</sub>, para aumentar la capacidad fotosintética e incrementar la fijación de nitrógeno.

Se encontraron diferencias en actividad de la fosfoenolpiruvato carboxilasa y la glutamina sintetasa que pueden correlacionarse con la eficiencia en simbiosis de las diferentes cepas de Rhizobium. Los nódulos de las cepas más eficientes presentaron mayor actividad de estas enzimas y la inducción de la actividad ocurrió más pronto durante el desarrollo.

Se encontró que la isoenzima específica de nódulo de la fosfoenolpiruvato carboxilasa, denominada PEPC1, es más abundante en nódulos de algunas de estas cepas. Se encontró también que la isoforma PEPC1 está constituida de polipéptidos de mayor peso molecular que los que constituyen a las isoformas PEPC1 y PEPC2.

El tratamiento con alto CO<sub>2</sub> incrementó la fijación de nitrógeno, sugiriendo que la actividad del nódulo está limitada por la disponibilidad de carbono. El CO<sub>2</sub> no tuvo efecto sobre la actividad específica de estas enzimas. Sin embargo se encontraron diferencias en la proporción de los polipéptidos de la

fosfoenolpiruvato carboxilasa. También se encontró que la síntesis del polipéptido gama de la glutamina sintetasa (específico de nódulo) se redujo significativamente en alto CO<sub>2</sub>, mientras la síntesis del polipéptido beta no se afectó, indicando que la relación carbono/nitrógeno en el nódulo es el principal factor que regula las isoformas de GS.

Los principales capítulos de esta tesis son introducción, material y metodos, resultados, discusión y conclusiones.

#### Referencias

Chen F.L., M.J. Bennett, J.V. Cullimore (1990) J. Exp. Bot.

41: 1215-1221.

Deroche M.E., E. Carrayol (1989) Plant. Physiol. Biochem.

27: 379-386.

Vo. Bo.



Dr. Miguel Lara Flores.

## ABSTRACT

Nodule phosphoenolpyruvate carboxylase and glutamine synthetase activity and isoforms were analyzed during the symbiotic interaction between bean (Phaseolus vulgaris) and Rhizobium, in order to define the symbiotic factors involved in their regulation. Two experimental strategies were used: (1) inoculation with different Rhizobium strains, differing in the symbiotic efficiency; and (2) the use of high CO<sub>2</sub> ambiental concentrations in order to increase photosynthesis and nitrogen fixation.

Differences in both the phosphoenolpyruvate carboxylase and glutamine synthetase activities were found that can be related to the symbiotic efficiency of the Rhizobium strains, the activities of these enzymes were high and fast induced in nodules infected with the better strains.

It was found that the nodule-specific isoenzyme of phosphoenolpyruvate carboxylase is more abundant in nodules infected by some strains. It was also found that this isoenzyme, called PEPC1, is composed by polypeptides with higher molecular weight, whereas the other isoenzymes, PEPC2 and PEPC3, are composed by polypeptides of lower molecular weight.

High CO<sub>2</sub> increased nitrogen fixation, suggesting that nodule activity is limited by the carbon availability. High CO<sub>2</sub> concentration did not appear to have an effect on glutamine synthetase and phosphoenolpyruvate carboxylase specific activities. However, the proportion of the two

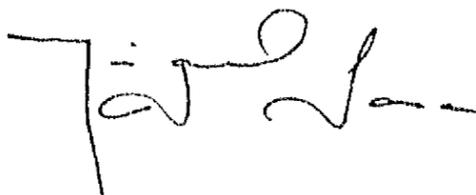
phosphoenolpyruvate carboxylase polypeptides was affected by the high CO<sub>2</sub>. Also the nodule-specific polypeptide (gamma) of glutamine synthetase was significantly reduced in response to the high CO<sub>2</sub>, whereas the constitutive polypeptide (beta) was not affected, indicating that the carbon/nitrogen balance within the nodule may be the primary factor that regulates the glutamine synthetase isoforms.

Main chapters of this thesis are introduction, material and methods, results, discussion and conclusions.

#### References

- Chen F.L., M.J. Bennett, J.V. Cullimore (1990) J. Exp. Bot.  
41: 1215-1221.
- Deroche M.E., E. Carrayol (1989) Plant. Physiol. Biochem.  
27: 379-386.

Vo. Bo.



Dr. Miguel Lara Flores.

## INDICE

INTRODUCCION .....	1
Formación del nódulo .....	4
Nodulinas .....	6
Asimilación de nitrógeno .....	8
Caracterización de la glutamina sintetasa .....	9
Metabolismo del carbono en el nódulo .....	14
Asimilación de CO <sub>2</sub> en el nódulo .....	15
Caracterización de la PEPC .....	16
OBJETIVOS .....	18
MATERIAL Y METODOS .....	19
RESULTADOS .....	23
Efecto de la inoculación con diferentes cepas de <u>Rhizobium</u> .....	23
Actividad de PEPC y GS en nódulos de frijol .....	28
Caracterización de la PEPC en nódulos de frijol .....	35
Efecto del CO <sub>2</sub> sobre el crecimiento y la actividad de nitrogenasa .....	43
Efecto del CO <sub>2</sub> sobre la actividad de la GS y la PEPC .....	47
Regulación de isoformas de PEPC y GS por alto CO <sub>2</sub> .....	53
DISCUSION .....	58
Actividad de GS y PEPC durante la simbiosis frijol- <u>Rhizobium</u> .....	58
Limitación de carbono en el nódulo .....	59
Caracterización y Regulación de la PEPC en nódulos de frijol .....	61
Regulación de la GS en nódulos de frijol .....	65
CONCLUSIONES .....	74
REFERENCIAS .....	76
Regulation of nodule glutamine synthetase by CO <sub>2</sub> levels in bean ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) .....	84

## INTRODUCCION

Aunque el nitrógeno es muy abundante en la naturaleza, es el nutriente más limitante para el crecimiento de las plantas, especialmente en sistemas agrícolas, ya que la forma más abundante de nitrógeno,  $N_2$  atmosférico, se encuentra disponible solo para un número muy restringido de organismos: los microorganismos fijadores de nitrógeno, de vida libre ó los que se asocian con plantas en forma simbiótica. La fijación simbiótica de nitrógeno es un medio importante de proveer nitrógeno reducido a los cultivos y al suelo. Aunque diversas asociaciones contribuyen a la fijación simbiótica de nitrógeno, la simbiosis en los nódulos de la raíz de las leguminosas con Rhizobium y Bradyrhizobium tiene la mayor importancia para la agricultura. A través de esta simbiosis la planta obtiene parte de sus requerimientos de nitrógeno, mientras que suministra los fotosintatos para el desarrollo y funcionamiento del nódulo, el órgano simbiótico que contiene a las bacterias fijadoras de nitrógeno (Pate y Layzell, 1990; Schubert, 1986; Vance, 1990).

A pesar de la ventaja adaptativa de las leguminosas para colonizar y sobrevivir en ambientes deficientes en nitrógeno, la fijación simbiótica de nitrógeno representa un alto costo para la planta huésped, en términos

de utilización de fotosintato para el mantenimiento de la simbiosis (Warembourg y Roumet, 1989).

Se ha considerado que el aporte de fotosintato por parte de la planta es el principal factor limitante de la capacidad de fijación biológica de nitrógeno. Los factores que contribuyen a incrementar el flujo de fotosintato al nódulo, como la fertilización con  $\text{CO}_2$ , promueven una mayor actividad de fijación de nitrógeno (Vance y Heichel, 1991). En general se ha encontrado que un incremento de la concentración de  $\text{CO}_2$  atmosférico resulta en un incremento de  $\text{N}_2$  fijado por hectárea (Hardy y Havelka, 1975), es posible que este incremento en fijación de  $\text{N}_2$  se deba a un incremento en la eficiencia de la fotosíntesis. Al aumentar la concentración de  $\text{CO}_2$  atmosférico, éste puede competir efectivamente con el  $\text{O}_2$  por el sitio activo de la Ribulosa bifosfato carboxilasa, resultando en una disminución en la fotorrespiración (Ogren, 1984), lo que produce en consecuencia una mayor fotosíntesis neta y un mayor aporte de fotosintato a los nódulos.

No todas las leguminosas responden a la fertilización con  $\text{CO}_2$  atmosférico, la especie vegetal, la bacteria, el estado fisiológico de la planta y las condiciones ambientales afectan la respuesta del sistema al

aporte de carbohidratos (Masterson y Sherwood, 1978; Murphy, 1986). Las leguminosas herbáceas, por ejemplo, no aumentan significativamente la actividad de fijación de  $N_2$  en respuesta al enriquecimiento en  $CO_2$  atmosférico, en contraste con el efecto del  $CO_2$  en las leguminosas como chícharo y soya que producen semilla (Hardy y Havelka, 1975; Masterson y Sherwood, 1978). Las diferencias en la respuesta al  $CO_2$  entre las leguminosas herbáceas y las leguminosas de grano no es sorprendente en vista de que estas últimas exhiben un periodo más corto y más intenso de fijación de  $N_2$  y gastan más energía en el crecimiento reproductivo que las primeras (Murphy, 1986).

#### **Formación del nódulo.**

El nódulo de la raíz de las leguminosas es el resultado de la interacción de genes tanto de la bacteria como de la planta. Estos genes participan en la iniciación, el desarrollo y la diferenciación de la estructura del nódulo, así como en el mantenimiento de la actividad metabólica del nódulo (Vance, 1990). En general, la secuencia de eventos que dirige a la formación del nódulo comienza con la interacción de los rizobios con las células de la raíz, en la región de emergencia de los pelos radiculares (Bhuvaneshwari *et al.*, 1980). La primera respuesta morfológica de la

interacción de la leguminosa con Rhizobium es la deformación y el enroscamiento de los pelos de la raíz debido a un crecimiento desigual de los mismos (Nap y Bisseling, 1990a, 1990b). Recientemente se ha purificado un compuesto extracelular producido por Rhizobium meliloti que causa deformación de los pelos de la raíz. Este compuesto, denominado NodRm-1, es un tetrasacárido sulfatado de D-glucosamina, en el que tres grupos amino están acetilados y uno está acilado (Lerouge *et al.*, 1990). NodRm-1 solo se produce cuando los genes *nod* de Rhizobium meliloti son funcionales y cuando la bacteria crece en presencia del flavonoide inductor de los genes *nod*, luteolina. Las bacterias penetran las células de los pelos de la raíz a través de una hidrólisis localizada de la pared<sup>e</sup> celular, posteriormente penetran al cortex de la raíz a través de una estructura tubular, el hilo de infección. Las lectinas de la planta están de alguna manera involucradas en la especificidad del huésped para la formación de esta estructura (Diaz *et al.*, 1989). Simultáneamente, las células del cortex de la raíz comienzan a dividirse e inician un nuevo programa de desarrollo. Los hilos de infección se ramifican y llevan a las bacterias hacia los centros de actividad mitótica en el cortex (Calvert *et al.*, 1984), mientras que las bacterias proliferan y se rodean de mucopolisacáridos. Antes de que las bacterias penetren las células de los

primordios de nódulos, ocurren cambios morfológicos relacionados con la actividad mitótica, como rearreglo de microtúbulos, migración del núcleo y formación de una pared celular adicional (Nap y Bisseling, 1990a). Al contacto de las bacterias con los centros de actividad meristemática, los Rhizobium se liberan del hilo de infección al citoplasma de las células vegetales por un proceso similar a endocitosis (Morrison y Verma, 1987). Las bacterias se diferencian entonces en bacteroides capaces de fijar nitrógeno, quedando incluidos en una membrana de origen vegetal, denominada membrana peribacteroidal, inicialmente derivada del plasmalema de la célula huésped (Mellor y Werner, 1987)., los bacteroides y las membranas se dividen para llenar el citoplasma de las células infectadas. La mitad de las células del nódulo permanecen sin infectar, ocupando espacios entre las células infectadas. Las células no infectadas difieren de las células infectadas en su estructura y en su metabolismo (Newcomb y Tandom, 1981).

Dos tipos de categorías de nódulos pueden reconocerse por su morfología, determinados e indeterminados. Las leguminosas templadas (Pisum, Vicia, Trifolium y Mendicago) desarrollan nódulos indeterminados, mientras que los nódulos determinados ocurren en especies de leguminosas tropicales (Glicine, Phaseolus, Vigna, Arachis). Los nódulos

determinados no tienen un meristemo persistente, en consecuencia, las fases de desarrollo están separadas temporalmente, a diferencia de los nódulos indeterminados, donde las fases de desarrollo se encuentran separadas en espacio.

### **Nodulinas.**

Las proteínas vegetales que se sintetizan durante la infección por Rhizobium y la formación del nódulo, se han denominado nodulinas (Legoki y Verma, 1980; Van Kamen, 1984). Utilizando técnicas inmunológicas, de traducción *in vitro* y a partir de la clonación de los cDNAs, se ha demostrado que se inducen de 25 a 30 genes vegetales durante la formación del nódulo (Govers *et al.*, 1987; Verma *et al.*, 1986). Aproximadamente 13 nodulinas se han identificado hasta la fecha, 7 de ellas están involucradas en la asimilación del amonio y del carbono, mientras que las otras están involucradas en la morfogénesis del nódulo y en el control de la concentración de oxígeno (Vance, 1990). Hasta ahora se han identificado genes que codifican para la leghemoglobina (Lee y Verma, 1988), la uricasa (N-35, Nguyen *et al.*, 1985; Sánchez *et al.*, 1987), la sacarosa sintetasa (N-100, Thummler y Verma, 1987), la glutamina sintetasa (Cullimore y Bennett, 1988; Tingey *et al.*, 1987), para las

proteínas asociadas a la membrana peribacteroidal: Ngm-23, Ngm-24 (Jacobs *et al.*, 1987) y Ngm-26, que probablemente funcione en el transporte de nutrientes entre la bacteria y el huésped (Verma *et al.*, 1991; Sánchez *et al.*, 1991), para Npv-30, que probablemente tenga una función similar (Sánchez *et al.*, 1991), y para las proteínas ricas en hidroxiprolina: N-75 (pENOD<sub>2</sub>, Franssen *et al.*, 1987; Nap y Bisseling, 1990b), PsENOD5 y PsENOD12 (Nap y Bisseling, 1990a). Se han clonado algunos otros genes de nodulinas, pero su función aún no se ha establecido (Verma *et al.*, 1991).

La transcripción de los genes de la mayoría de las nodulinas se induce poco antes ó junto con la aparición de la actividad de nitrogenasa. Algunos genes, sin embargo, se expresan en las etapas iniciales del desarrollo, como los genes de las proteínas ricas en hidroxiprolina pPsENOD5, pPsENOD12, cuya expresión se puede correlacionar con el proceso de infección (Nap y Bisseling, 1990a) y pENOD2 cuyo producto, N-75, parece ser una nodulina estructural involucrada en el control de la difusión de oxígeno en el nódulo (Franssen *et al.*, 1987).

Muchas otras proteínas incrementan su expresión en nódulos y pueden ser también nodulinas, entre estas están la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), la aspartato amino transferasa (AAT), la glutamato sintasa

(GOGAT) y la malato deshidrogenasa (MDH). Estas enzimas son cruciales para que se dé una fijación y asimilación de nitrógeno eficientes (Vance, 1990). Se han documentado isoformas de nódulo de PEPC (Deroche y Carrayol, 1988), AAT (Farnham *et al.*, 1990) y GOGAT (Chen y Cullimore, 1988).

### **Asimilación de Nitrógeno.**

La adquisición y la asimilación del nitrógeno es el segundo proceso de mayor importancia después de la fotosíntesis, para el crecimiento y el desarrollo vegetal (Vance, 1990). Las plantas superiores normalmente obtienen el nitrógeno del medio en forma de amonio, nitrato o nitrógeno atmosférico, esta última fuente se restringe a aquellas plantas capaces de establecer simbiosis con microorganismos fijadores de nitrógeno, bacterias, cianobacterias ó actinomicetos (Pate y Layzell, 1990). En las plantas superiores la asimilación del nitrógeno se lleva a cabo por la acción coordinada de la glutamina sintetasa (GS) y la glutamato sintasa (GOGAT). La GOGAT cataliza la transferencia del grupo amido de la glutamina a la posición  $\alpha$ -amino del ácido  $\alpha$ -cetoglutarico para formar dos moléculas de ácido glutámico. La GS es responsable de la asimilación primaria del amonio, sintetizando glutamina a partir del ácido glutámico. Debido a que ambas

enzimas dependen una de otra para la provisión de sustratos, ambas actividades constituyen un ciclo que se ha denominado ciclo GS/GOGAT (Mifflin y Lea, 1980). Además de las fuentes primarias de nitrógeno, algunos procesos metabólicos de la planta como la fotorrespiración, el catabolismo de aminoácidos y el metabolismo fenilpropanoide producen amonio, que tiene que ser incorporado nuevamente en compuestos orgánicos. El ciclo GS/GOGAT es esencial no solo para la asimilación primaria de nitrógeno, sino también para mantener el metabolismo general del nitrógeno en la planta.

#### **Caracterización de la glutamina sintetasa.**

Las plantas poseen múltiples isoformas de GS, las isoformas difieren en su localización en los diferentes órganos vegetales y en sus características inmunológicas. La actividad de las diferentes isoformas de GS puede resolverse por cromatografía de intercambio iónico (McNally y Hirel, 1983). En hojas, estas isoformas designadas GS<sub>1</sub> y GS<sub>2</sub> están localizadas en el citoplasma y en el cloroplasto, respectivamente (Hirel *et al.*, 1984). La GS<sub>2</sub> es indispensable para asimilar el amonio producido durante la fotorrespiración y la reducción de nitrato (Edwards y Coruzzi, 1989; Wallsgrave *et al.*, 1987). En la raíz, la actividad de GS se encuentra principalmente en el citoplasma, pero parte de la actividad también está presente en los plástidos de algunas especies (Vezina *et al.*, 1987). Los nódulos de algunas leguminosas también presentan dos isoformas de GS. En frijol las dos isoformas de nódulo se han denominado GS<sub>n-1</sub> y GS<sub>n-2</sub>, la isoforma GS<sub>n-1</sub> es específica de este órgano (Cullimore *et al.*, 1983; Lara *et al.*, 1983).

La glutamina sintetasa (GS) en las plantas superiores es una proteína octamérica constituida por subunidades con movilidad relativa ( $M_r$ ) de 38 000 a 45 000 y una  $M_r$  en estado nativo de aproximadamente 350 000 (Lea *et al.*, 1990). La base molecular de las diferentes isoformas de GS es la síntesis de diferentes subunidades polipeptídicas codificadas por genes diferentes (Forde y Cullimore, 1989). Utilizando electroforesis en dos dimensiones (O'Farrell, 1975), se examinó la composición de subunidades de la GS de diferentes órganos del frijol (Lara *et al.*, 1984). La enzima en la hoja esta constituida de seis diferentes polipéptidos, cuatro polipéptidos de 45 kDa son las subunidades de la isoforma cloroplástica (a, b, c y d), mientras los otros dos polipéptidos de 40 kDa, denominados  $\alpha$  y  $\beta$ , constituyen la isoforma citoplásmica. Estos últimos ( $\alpha$  y  $\beta$ ) también están presentes en la GS de la raíz. La GS de nódulos contiene dos tipos de subunidades con  $M_r$  de 40 000, uno de ellos esta presente en las hojas y en la raíz (polipéptido  $\beta$ ), mientras que el otro, denominado  $\gamma$ , es específico del nódulo. La isoforma específica del nódulo ( $GS_{n-1}$ ) esta constituida principalmente de polipéptidos  $\gamma$ , mientras que la isoforma  $GS_{n-2}$ , similar a la GS de raíz ( $GS_r$ ), está constituida principalmente de polipéptidos  $\beta$ . En la raíz, la GS esta constituida de polipéptidos  $\alpha$  y  $\beta$ . El polipéptido  $\beta$  es el principal componente de la GS en raices maduras (Ortega *et al.*, 1986). El polipéptido  $\alpha$  es el polipéptido mas abundante en el embrión y al inicio del desarrollo de la raíz (Ortega *et al.*, 1986), de las hojas primarias (Bennett y Cullimore, 1989), de los cotiledones en germinación (Swarup *et al.*, 1990), y también esta presente en las etapas iniciales del desarrollo del nódulo (Padilla *et*

*al.*, 1987).

La designación de isoformas basada en la separación por cromatografía de intercambio iónico se ve complicada por el hecho de que algunas de las isoformas separadas por intercambio iónico son en realidad mezclas de octámeros heterólogos (Cai y Wong, 1989). La isoforma  $GS_{n-1}$  de nódulo corresponde a diferentes combinaciones octaméricas de los polipéptidos  $\beta$  y  $\gamma$ , mientras que la  $GS_{n-1}$  corresponde octámeros constituidos únicamente de polipéptidos  $\beta$ . En este trabajo, la designación  $GS_{n-1}$  y  $GS_{n-2}$  se ha cambiado por  $GS-\gamma$  y  $GS-\beta$ , respectivamente. En la raíz y en las hojas embrionarias los polipéptidos  $\alpha$  y  $\beta$  también se pueden asociar en octámeros heterólogos, en ciertas etapas del desarrollo (Ortega, 1988; Bennett y Cullimore, 1989).

La heterogeneidad de polipéptidos de la GS también se ha reportado en otras especies. En chícharo se han reportado cinco polipéptidos cuyos niveles de expresión varían en los diferentes órganos (Tingey *et al.*, 1987). Los polipéptidos más abundantes en nódulo son tres polipéptidos denominados  $GS_n$  que también se expresan en raíz y hojas. El polipéptido  $GS_1$  es la forma más abundante en raíz, pero también está presente en hojas y nódulos. La GS cloroplástica se sintetiza como un precursor de 49 kDa que se procesa para dar un polipéptido de 44 kDa que corresponde a la subunidad de la GS plástica (Tingey *et al.*, 1988)

Las evidencias genéticas en diferentes especies vegetales han establecido la existencia de pequeñas familias multigénicas que codifican para las distintas

subunidades de GS (Cullimore *et al.*, 1984; Dunn *et al.*, 1988; Gebhardt *et al.*, 1986; Hirel *et al.*, 1987; Tingey *et al.*, 1987). Un gen codifica para la GS cloroplástica, dos genes codifican para las formas citoplásmicas de GS de hoja y raíz y en algunas leguminosas hay un gen que codifica para un polipéptido específico del nódulo.

En frijol, la GS del cloroplasto esta codificada por el gen *gln δ*, esta isoforma se sintetiza como un polipéptido precursor de 49 kDa que contiene un péptido señal que es removido durante el transporte hacia el cloroplasto (Lightfoot *et al.*, 1988); las diferentes subunidades de la GS cloroplástica (a, b, c y d) probablemente sean resultado de modificaciones postraduccionales y posiblemente representen distintos grados de glicosidación, de manera similar a la GS<sub>2</sub> de tabaco (Nato *et al.*, 1984).

Los otros genes de GS de frijol (*gln α*, *gln β* y *gln γ*) codifican para las subunidades citoplásmicas de la GS (Cullimore y Bennett, 1989). Los cambios en la abundancia relativa de las subunidades GS reflejan cambios en los niveles relativos de los mensajeros de GS (Bennett *et al.*, 1989; Cock *et al.*, 1990; Ortega *et al.*, 1986), indicando que la regulación de la GS es a nivel transcripcional. La expresión del gen *gln β* en raíces maduras es 5 a 10 veces mayor que la expresión de *gln α* (Forde y Cullimore, 1989), coincidiendo con la mayor de expresión del polipéptido β en raíces maduras (Ortega *et al.*, 1986). El gen *gln β* tiene un nivel de expresión en raíz de 20 a 140 veces más que su expresión en hojas (Forde *et al.*, 1989).

En nódulos, los genes *gln β* y *gln γ* son los genes de GS que se expresan en mayor proporción, los genes *gln α* y *gln δ* también se expresan en nódulos pero en una

menor proporción. La expresión del gen *gln*  $\gamma$  se induce considerablemente en nódulos, sin embargo, se ha detectado expresión de este gen en otros órganos de la planta, aunque a un nivel mucho menor; su expresión en raíces es 150 a 750 veces menor que en nódulos (Bennett *et al.*, 1989).

Recientemente la utilización de plantas transgénicas de Lotus corniculatus y de tabaco con fusiones de los genes de GS al gen de  $\beta$  glucuronidasa (*gus*) ha demostrado que la actividad de los promotores de GS es a nivel específico de tejidos. Estos estudios indican que las isoformas de GS desempeñan funciones específicas en el metabolismo del nitrógeno (Edwards *et al.*, 1990; Forde *et al.*, 1989). En tabaco, la actividad del promotor de la GS<sub>2</sub> cloroplástica de chícharo predomina en los tejidos fotosintéticos, en consistencia con su papel en la reasimilación del amonio derivado de la fotorrespiración y la reducción de nitrito en los plástidos (Wallsgrave *et al.*, 1987). Estudios realizados en nódulos de plantas transgénicas de Lotus corniculatus con fusiones de los genes de GS de frijol han demostrado que el gen *gln*  $\gamma$  se expresa únicamente en células infectadas, mientras que *gln*  $\beta$ , que también se expresa en raíz y hojas, se expresa principalmente en nódulos jóvenes. En nódulos maduros la expresión de *gln*  $\beta$  se encuentra restringida al tejido vascular del nódulo (Forde *et al.*, 1989). De manera similar, el gen GS3A, de la isoforma citoplásmica más abundante en chícharo, se expresa exclusivamente en los elementos del floema de plantas transgénicas (Edwards *et al.*, 1990) y su función más probable sería la generación de glutamina para el transporte intercelular, puesto que la expresión de este gen es

particularmente intensa en cotiledones de plantas transgénicas.

### **Metabolismo del carbono en el nódulo.**

Los nódulos de las leguminosas tienen un metabolismo muy activo y pueden utilizar más del 30 % del carbono derivado de la fotosíntesis (Minchin y Pate, 1973). El fotosintato transportado en forma de sacarosa es metabolizado en el nódulo para generar los esqueletos de carbono, las moléculas reductoras y la energía necesaria para la fijación simbiótica de  $N_2$  (Pate y Layzell, 1990). Las condiciones anaeróbicas en el nódulos causadas por la barrera de difusión de oxígeno afectan su metabolismo. Es interesante notar que las plantas en condiciones anaeróbicas acumulan serina, glicina, alanina, ácido  $\gamma$ -amino butírico, los mismos compuestos que se acumulan en el nódulo (Blevin, 1989; Vance y Heichel, 1991). Los ácidos tricarboxílicos malato y succinato son también productos del metabolismo anaeróbico en las plantas, estos ácidos tricarboxílicos desempeñan un papel central en el metabolismo del nódulo, puesto que son las fuentes de carbono que la planta suministra a los bacteroides para mantener la actividad de fijación de nitrógeno. Hay evidencias de que algunos aminoácidos como aspartato y prolina también pueden ser utilizados por el bacteroide (Blevins, 1989; Kohl *et al.*, 1988). En los nódulos de las leguminosas, las enzimas de la vía de las pentosas son más activas que las enzimas de la glicólisis (Blevins, 1989).

La necesidad de acoplar la fotosíntesis con la reducción del nitrógeno atmosférico durante la coevolución del simbionte y el huésped, ha generado procesos de ahorro

de energía como las actividades de reasimilación de  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2$ , que pueden mejorar la eficiencia de la fijación simbiótica de  $\text{N}_2$  (Gadal, 1983; Schubert, 1986). La eficiencia con que se usan los carbohidratos en el proceso de reducción de  $\text{N}_2$  y las consecuencias que esto tiene en la economía global del carbono en la planta es aún objeto de estudio (Vance y Helchel, 1991; Warembourg y Roumet, 1989).

#### **Asimilación de $\text{CO}_2$ en el nódulo.**

En los nódulos de las leguminosas existe una alta actividad de fijación de  $\text{CO}_2$ . Esta actividad desempeña varias funciones para el mantenimiento de la fijación simbiótica de  $\text{N}_2$ . Entre estas funciones está el aporte de esqueletos de carbono para la asimilación de amonio. La asimilación de amonio y la síntesis de los compuestos transportadores de nitrógeno requieren de la provisión de esqueletos de carbono, los intermediarios del ciclo de Krebs oxaloacetato y  $\alpha$ -cetoglutarato son los principales cetoácidos utilizados para la asimilación de amonio y la síntesis de compuestos nitrógenados (Vanlerberghe *et al.*, 1990), el uso de estos compuestos requiere de su reabastecimiento, de tal manera que se mantenga la integridad del ciclo de Krebs. Las reacciones que llevan a cabo esta actividad de reabastecimiento se han denominado reacciones anapleróticas. La fijación anaplerótica de  $\text{CO}_2$  en los nódulos se lleva a cabo por la enzima fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC), una enzima clave en el metabolismo vegetal (Gadal, 1983). Además de reabastecer de intermediarios al ciclo de Krebs, la PEPC es una parte integral del metabolismo anaeróbico del nódulo (Blevins, 1989), puesto que es la responsable de la síntesis

de ácidos dicarboxílicos (malato y succinato) para la respiración del bacteroide (King *et al.*, 1986). Recientemente se ha demostrado claramente que los ácidos orgánicos producidos por la fijación de CO<sub>2</sub> en el nódulo son utilizados directamente por los bacteroides (Rosendahl *et al.*, 1990). La síntesis de ácidos orgánicos por la PEPC sirve también para mantener el balance de cargas en el xilema y el pH intracelular (Deroche y Carrayol, 1989). El desarrollo de métodos para la determinación simultánea de la fijación de N<sub>2</sub> y el consumo de carbono, ha permitido estimar un costo mínimo de 4 mg de C por cada mg de nitrógeno fijado, una parte importante de éste (1.5 mg C/mg N<sub>2</sub>) es aportado por la actividad de carboxilasa del nódulo (Warembourg y Roumet, 1989). Esto representa casi el 40 % del carbono requerido para la fijación de nitrógeno.

#### **Caracterización de la PEPC.**

La fosfoenol piruvato carboxilasa fué originalmente descubierta en una planta C<sub>3</sub>, sin embargo, la PEPC es mejor conocida por ser la responsable de la asimilación fotosintética de CO<sub>2</sub> en plantas con metabolismo C<sub>4</sub> y CAM. La reacción que lleva a cabo la PEPC es la síntesis de oxaloacetato y la producción de fosfato inorgánico a partir de fosfoenolpiruvato y bicarbonato, más que CO<sub>2</sub> como tal (Latzko y Kelly, 1983). La mayoría de los reportes están de acuerdo en que la PEPC en plantas C<sub>4</sub> está localizada en el citoplasma, sin embargo la localización de PEPC en plantas C<sub>3</sub> no se conoce con certeza. Algunos reportes indican que la PEPC está localizada tanto en el citoplasma como en los cloroplastos de plantas C<sub>3</sub> (Perrot-Rechenmann *et*

*al.*, 1982; Vidal y Cavalié, 1974).

A pesar de su importante papel en la fisiología del nódulo, poco se sabe acerca de las características bioquímicas y moleculares de la enzima del nódulo. La PEPC ha sido parcialmente purificada de nódulos de alfalfa, soya, frijol y Lupinus (Deroche *et al.*, 1983; Marczewski, 1989; Miller *et al.*, 1987; Schuller *et al.*, 1990; Vance y Stadel, 1984). El peso molecular de las subunidades de PEPC determinado por electroforesis en SDS es aproximadamente 101 kD. La PEPC en estado nativo es un tetrámero de 440 kD (Schuller *et al.*, 1990). Esta enzima representa el 1 al 2 % de la proteína total en los nódulos activos en fijación de nitrógeno (Miller *et al.*, 1987). Se han reportado isoformas de PEPC en nódulos de alfalfa, Lupinus, frijol y soya (Deroche y Carrayol, 1989; Marczewski, 1989; Miller *et al.*, 1987), pero no se sabe si está codificada por un gen específico de nódulo. Recientemente se ha clonado la PEPC de nódulos de alfalfa, pero este gen aún no ha sido caracterizado (Vance y Heichel, 1991).

## OBJETIVOS

Uno de los aspectos mas importantes en el estudio de la simbiosis de las leguminosas con Rhizobium es el análisis de las señales que determinan la expresión de nodulinas ó proteínas específicas del nódulo.

Los principales objetivos de este trabajo son el determinar los factores simbióticos relacionados con la expresión de las isoformas específicas del nódulo de la glutamina sintetasa (GS) y la fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC), enzimas importantes del metabolismo, involucradas en la asimilación del amonio y del carbono en los nódulos, y por otra parte, estudiar la expresión de la GS y la PEPC en relación a la eficiencia en la fijación de nitrógeno.

Este análisis se ha realizado a través de dos diferentes tipos de estrategias: la utilización de cepas de Rhizobium con diferentes características simbióticas, y la utilización de altas concentraciones CO<sub>2</sub> para aumentar la capacidad fotosintética de la planta e incrementar la eficiencia de la fijación de nitrógeno.

## MATERIAL Y METODOS

### Material biológico.

Se utilizaron semillas de Phaseolus vulgaris variedad negro Jamapa. Las semillas se desinfectaron con Cloralex al 10% durante 5 minutos y se lavaron con agua esteril. Las semillas se pregerminaron durante 3 días antes de inocularlas con diferentes cepas de Rhizobium, la cepa silvestre de Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli CE3 (Noel *et al.*, 1984), la mutante TMPD++ CFN 037, derivada de la CE3 (Soberón *et al.*, 1990), la cepa de Rhizobium tropicii CIAT 899 (Martinez-Romero *et al.*, 1991) y cepas de Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli aisladas en Brasil, que fueron proporcionadas por la Dra. Mariangela Hungría. Algunas de las cepas brasileñas han sido caracterizadas en simbiosis (Hungría *et al.*, 1991; Hungria y Franco, 1988; Hungria y Neves, 1986).

Las plantas inoculadas se crecieron en el invernadero en las condiciones previamente descritas (Lara *et al.*, 1984), ó en una cámara de ambiente controlado (Convicon E15) a temperatura constante de 25 C y con un intervalo luz/oscuridad de 12 h. La concentración de CO<sub>2</sub> dentro de la cámara se mantuvo normal (0.02% ) ó se incrementó a 0.1% a partir del día 8 después de la infección, únicamente durante el fotoperiodo. Las plantas se colectaron a diferentes intervalos. Se determinó el peso fresco de la parte aérea inmediatamente después de colectar las plantas. El peso seco se determinó incubando el material vegetal a 70 C durante 48 h. Los nódulos se colectaron y se congelaron a -70 C hasta su análisis.

### **Determinación de la actividad enzimática.**

Aproximadamente 0.5 g de nódulos se extrajeron en 2.5 ml de buffer Tris-Cl pH 8, conteniendo 1mM PMSF, 1mM EDTA, 10% glicerol, 5% etilen glicol, 1 mM MgCl<sub>2</sub>. La actividad de GS se determinó por el ensayo de transferasa (Ferguson y Sims, 1974). Una unidad de actividad equivale a 1  $\mu$ mol de  $\gamma$ -glutamil hidroxamato formado por minuto a 30 C. La actividad de PEPC se determinó por el ensayo acoplado a malato deshidrogenasa, midiendo la oxidación de NADH a 340 nm (Schuller *et al.*, 1990). La actividad de nitrogenasa se determinó como reducción de acetileno por el sistema radicular, en botellas de 250 ml conteniendo una atmósfera de 10 % de acetileno, durante 1 h. La concentración de etileno producido se determinó en un cromatógrafo de gases con detector de ionización de flama (Varian). La concentración de proteína se midió por el metodo de Bradford (1976).

### **Enriquecimiento de las actividades de PEPC y GS.**

Los extractos para el análisis de las isoformas de PEPC y los polipéptidos de GS se hicieron en buffer fosfatos (20 mM fosfatos pH 7.8, 1mM PMSF, 1mM EDTA, 10% glicerol, 5% etilen glicol, 1 mM MgCl<sub>2</sub>). Se aplicaron de 0.5 a 1 ml de extracto de nódulos sobre 0.5 mL de hidroxilapatita equilibrada en buffer de extracción. La hidroxilapatita se lavó con 80 ó 100 mM de fosfatos y la actividades de PEPC y GS se eluyeron con 400 mM de fosfatos. Se determinaron las actividades de GS ó PEPC, y las fracciones de mayor actividad se dializaron contra buffer de extracción y posteriormente se utilizaron para el análisis de las isoformas de PEPC ó los

polipéptidos de GS.

#### **Análisis de isoformas de PEPC.**

La composición de isoformas de PEPC se determinó a partir de las fracciones de hidroxilapatita, por medio de electroforesis en geles nativos. Volúmenes de 30 a 40  $\mu$ l de extractos enriquecidos en actividad de PEPC se separaron por electroforesis nativa, se incubaron durante 1 h en medio de reacción y se tiñeron con colorante Fast Violet para revelar las bandas de actividad (Deroche *et al.*, 1983). La actividad de PEPC también se purificó parcialmente por intercambio iónico en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC): 10 g de nódulos se extrajeron en buffer fosfatos, se enriquecieron en una columna de 10 ml de hidroxilapatita; la fracción enriquecida se aplicó a una columna de 4.5 x 250 mm de TSK DEAE-2SW, previamente equilibrada en buffer de extracción. Se utilizó un flujo de 0.5 ml min<sup>-1</sup>. La actividad de PEPC se eluyó con un gradiente de 0 a 500 mM de NaCl en buffer de extracción. Se colectaron fracciones de 0.6 mL. Las fracciones de mayor actividad de PEPC se analizaron por electroforesis en SDS (Laemli, 1970) y tinción por azul de Coomassie.

#### **Análisis de los polipéptidos de PEPC y GS.**

Se analizaron las proteínas de PEPC y GS por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida en SDS (Laemli, 1970) e inmunotransferencia (Towbin *et al.*, 1979) a papel de nitrocelulosa ó Inmobilon P. Se utilizaron anticuerpos específicos contra la GS de nódulos de frijol (Lara *et al.*, 1984), contra la PEPC de nódulos de alfalfa (Miller *et al.*, 1987) y además anticuerpos contra Uricasa de nódulos de frijol (Sánchez *et al.*,

1987). Como sistemas de detección se utilizaron anticuerpos acoplados a peroxidasa ó fosfatasa alcalina.

Para el análisis de la composición de polipéptidos de GS se corrieron volúmenes equivalentes a 0.1 unidades de transferasa de las fracciones enriquecidas por hidroxilapatita por electroforésis en dos dimensiones (O'Farrell, 1975). Los geles se transfirieron a nitrocelulosa y la composición de polipéptidos se reveló con anticuerpos anti-GS de nódulo (Lara *et al.*, 1984), utilizando un segundo anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina. La abundancia relativa de los polipéptidos se determinó por densitometría laser, los datos generados por el densitómetro (Biomed Instruments) se analizaron con un programa Autospoover Videophoresis (Biomed Instruments).

## RESULTADOS

**Efecto de la inoculación con diferentes cepas de Rhizobium sobre el crecimiento vegetal.**

Se infectaron plantas con diferentes cepas de Rhizobium con el fin de analizar la actividad de glutamina sintetasa (GS) y fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), enzimas importantes del metabolismo del nódulo que catalizan las reacciones de asimilación de amonio y de CO<sub>2</sub>, respectivamente, durante el desarrollo de los nódulos. Las características simbióticas de algunas de estas cepas, como actividad de nitrogenasa, eficiencia relativa, actividad de hidrogenasa y la proporción de nitrógeno fijado transportado en forma de ureidos, han sido determinadas. La cepa CNPAF 512 es una cepa precoz, que induce más rápidamente la fijación y la asimilación de nitrógeno en nódulos (Hungria *et al.*, 1991). Las cepas SEMIA 487 y FP2 son cepas que inducen un alto porcentaje de nitrógeno transportado en forma de ureidos y producen nódulos con mayor eficiencia relativa (Hungria y Neves 1986 y 1987), los nódulos de la cepa SEMIA 487 tienen una senescencia más tardía (Hungria y Franco, 1988). Las otras cepas brasileñas utilizadas: CNPAF 233, CNPAF 119 y CPAC H41, producen una alta relación Hup/ER/Ureidos (producción de hidrógeno/eficiencia relativa/porcentaje de nitrógeno en forma de ureidos) en simbiosis, en comparación a las cepas SEMIA 487 y FP2 (intermedia), y a la CNPAF 512 (baja).

La inoculación con diferentes cepas de Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli y de Rhizobium tropici, tiene efectos sobre las tasas de crecimiento de plantas de frijol cv.

negro Jamapa cultivadas en condiciones de invernadero. Las plantas noduladas con los distintos Rhizobium mostraron diferencias, tanto en peso fresco de tallos, como en peso seco de tallos y nódulos a los 25 días después del establecimiento de la simbiosis (Tabla 1). Las cepas que produjeron mayor crecimiento vegetal a los 25 días después de la infección fueron la CNPAF512, SEMIA 487 y CIAT 899. Se seleccionaron algunas de las cepas para analizar su crecimiento a lo largo del desarrollo, en dos experimentos independientes. En el primer experimento se comparó el desarrollo de plantas infectadas con la cepa de Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli CE3 y con Rhizobium tropici CIAT 899, las bacterias más utilizadas en nuestro laboratorio. Las plantas inoculadas con estas dos cepas muestran diferencias significativas en las tasas de crecimiento, a partir del día 16 después de la infección (Figura 1). En un segundo experimento se comparó el efecto sobre el desarrollo vegetal de la inoculación con diferentes cepas de Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli aisladas en Brasil. Los resultados muestran que la cepa CNPAF512 induce un mayor crecimiento que las cepas SEMIA487 y que la CNPAF119, esta última es claramente una cepa poco efectiva en simbiosis (Figura 2).

Tabla 1. Peso de tallos y nódulos de frijol cv. negro Jamapa nodulados con diferentes cepas de Rhizobium, a los 25 días después de la infección.

Cepa	Peso fresco parte aérea (g/planta)	Peso seco parte aérea (g/maceta)	Peso seco nódulos (mg/planta)
CNPAF512	3.38	2.11	52.6
SEMIA 487	3.39	2.34	62.4
CIAT 899	3.38	n.d.*	53.6
FP2	2.42	1.63	49.6
CFN037	2.27	1.09	53.5
CE3	1.60	1.08	41.4
CNPAF 233	1.60	1.46	25.4
CNPAF 119	1.90	1.67	30.8
CPAC H41	1.44	0.75	27.0

\*no se determinó

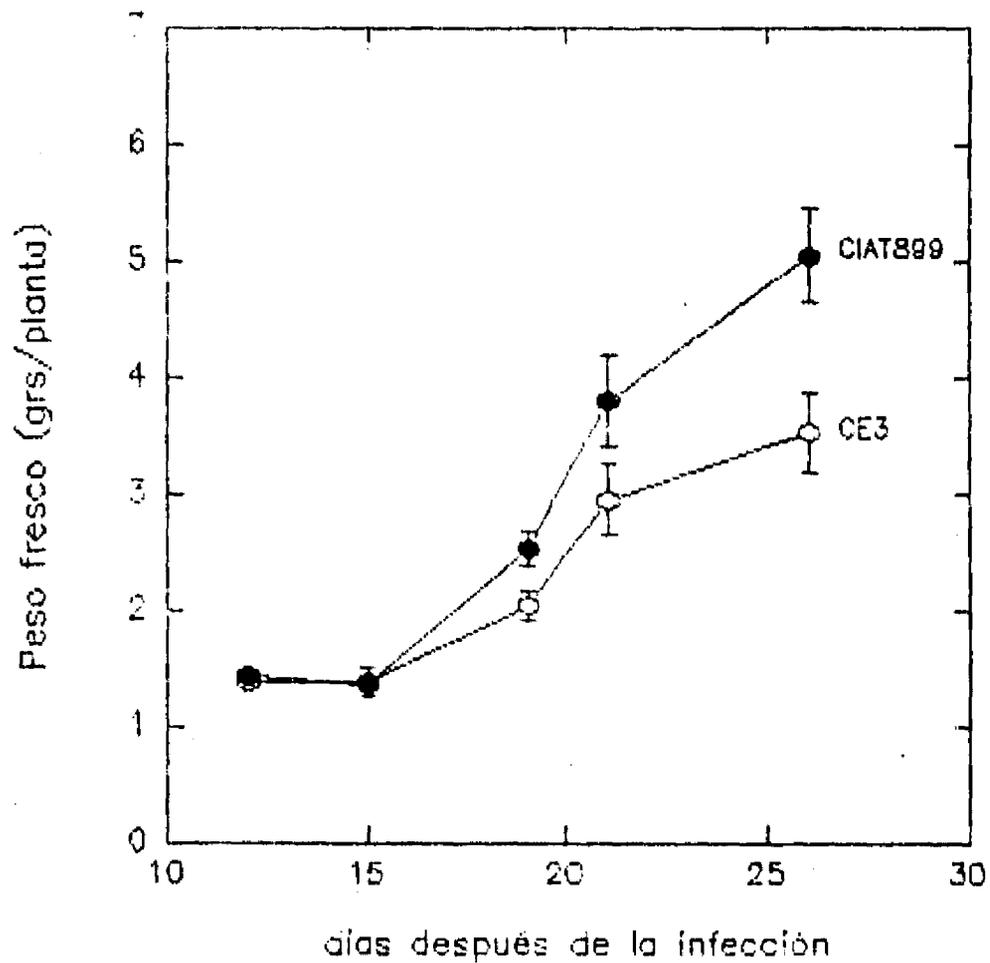


Figura 1. Incremento en peso fresco durante el desarrollo de plantas de frijol inoculadas con Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli CE3 y Rhizobium tropici CIAT 899. Cada valor representa el promedio de al menos 15 plantas  $\pm$  error estandard (barras verticales).

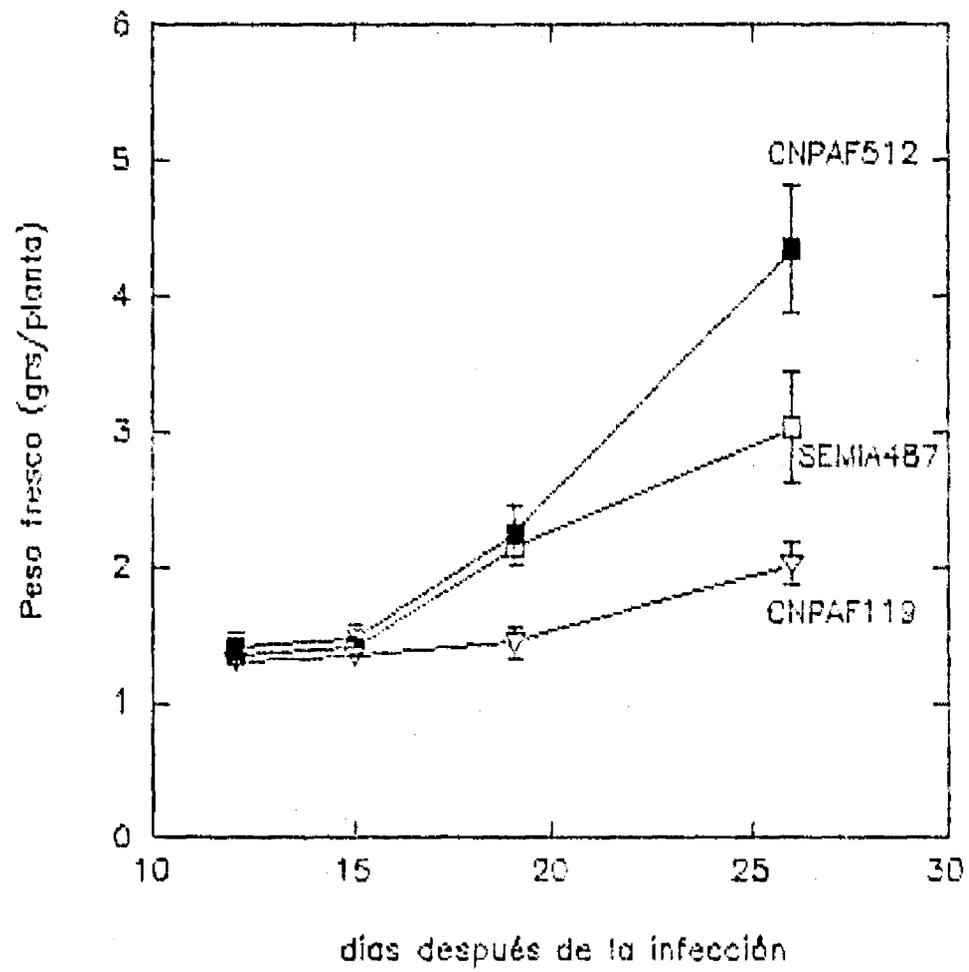


Figura 2. Incremento en peso fresco durante el desarrollo de plantas de frijol inoculadas con Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli cepas CNPAF119, SEMIA487 y CNPAF512. Cada valor representa el promedio de al menos 15 plantas  $\pm$  error estandard (barras verticales).

**Actividad de fosfoenol piruvato carboxilasa y glutamina sintetasa durante el desarrollo de nódulos de frijol.**

Se analizó la actividad de la PEPC durante el desarrollo de nódulos infectados con las cepas de Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli CE3, SEMIA487, CNPAF119, CNPAF512 y con la cepa de Rhizobium tropici CIAT 899. Como puede observarse, la actividad de PEPC es mayor en nódulos de las cepas CIAT899 SEMIA487 y CNPAF512 (Figuras 3 y 4). La actividad de PEPC se induce notablemente desde el inicio del desarrollo de los nódulos de las cepas CIAT899 y CNPAF512, mientras que la inducción en los nódulos de las cepas CE3 y SEMIA487 es más lenta, sin embargo, los nodulos de la SEMIA487 alcanzan los niveles de actividad de las nódulos de la CIAT899 y CNPAF512, mientras que los nódulos de la CE3 presentan una actividad menor durante todo el periodo de desarrollo. Las diferencias en la actividad específica de GS (Figuras 5 y 6) no son tan importantes como las diferencias en la actividad específica de PEPC, pero en general se observa una mayor actividad de GS en los nódulos de las cepas CIAT899 y CNPAF512, en comparación con la actividad de los nódulos de las cepas CE3 y SEMIA487. Los nódulos de la cepa CNPAF119 son evidentemente poco eficientes en la inducción del crecimiento vegetal, y esto se refleja en los niveles de actividad de GS y PEPC. Puede establecerse una correlación entre las tasas de crecimiento vegetal (Figuras 1 y 2) y los niveles de actividad específica y la inducción más temprana de GS y PEPC de los nódulos infectados con los distintos Rhizobium. Las plantas noduladas con las cepas SEMIA 487, CNPAF 512 y CIAT 899, que muestran mayor incremento en peso (Figuras 1 y 2), tienen también una mayor actividad específica y una inducción más

temprana de PEPC (Figuras 3 y 4), las diferencias en actividad de GS son menos marcadas pero también existen (Figuras 5 y 6).

Las actividades específicas de GS y PEPC reflejan cambios en la síntesis de estas enzimas (Figura 7), los niveles de síntesis de PEPC determinados por inmunodetección con anticuerpos específicos, a los 25 días después de la infección, varían de acuerdo a los valores de actividad específica. Los nódulos de las cepas CE3 y CNPAF119 muestran una menor cantidad de antígeno de PEPC que las cepas CNPAF512, SEMIA487 y CIAT899, cuyas actividades específicas son más altas y similares entre ellas (Figuras 3 y 4). La cantidad de antígeno de GS no varía significativamente en los nódulos de las diferentes cepas, excepto en la SEMIA119 donde es menor, en correspondencia con los niveles de actividad específica (Figuras 5 y 6).

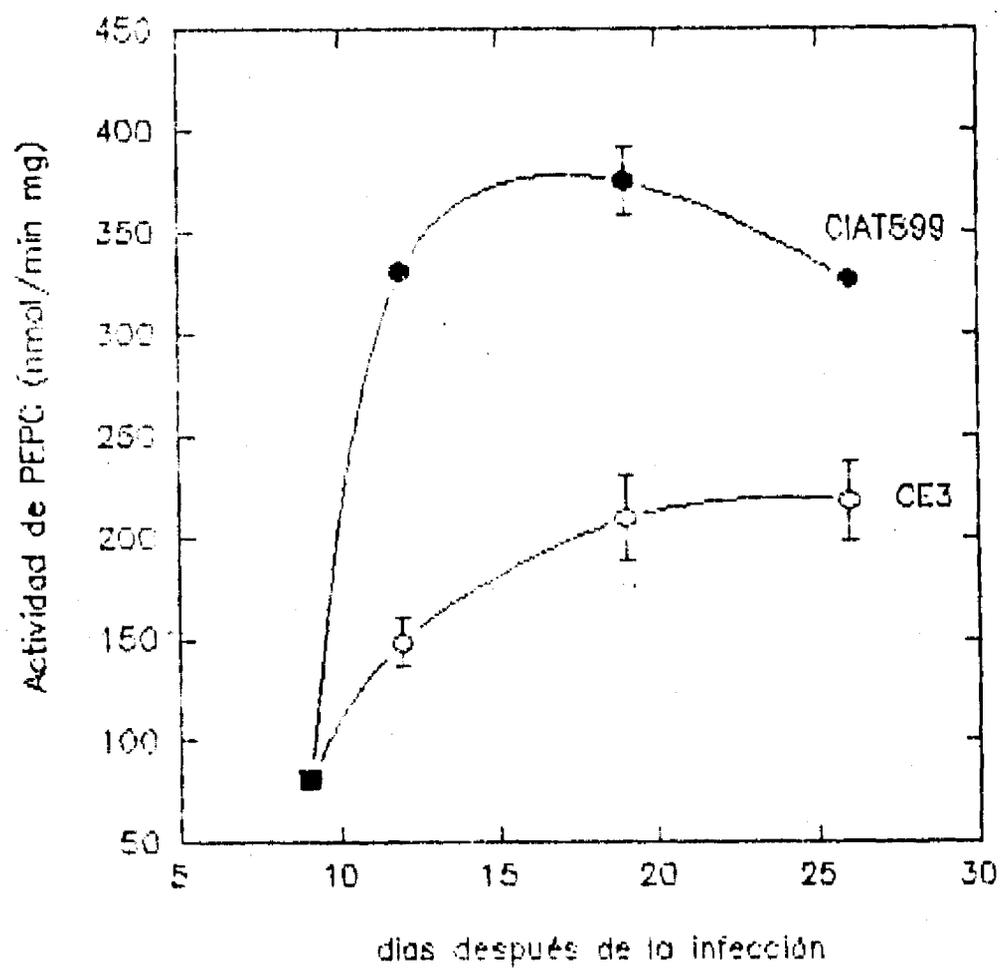


Figura 3. Actividad específica de fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) durante el desarrollo de nódulos de frijol infectados con *Rhizobium tropici* CIAT 899 y con *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli CE3.

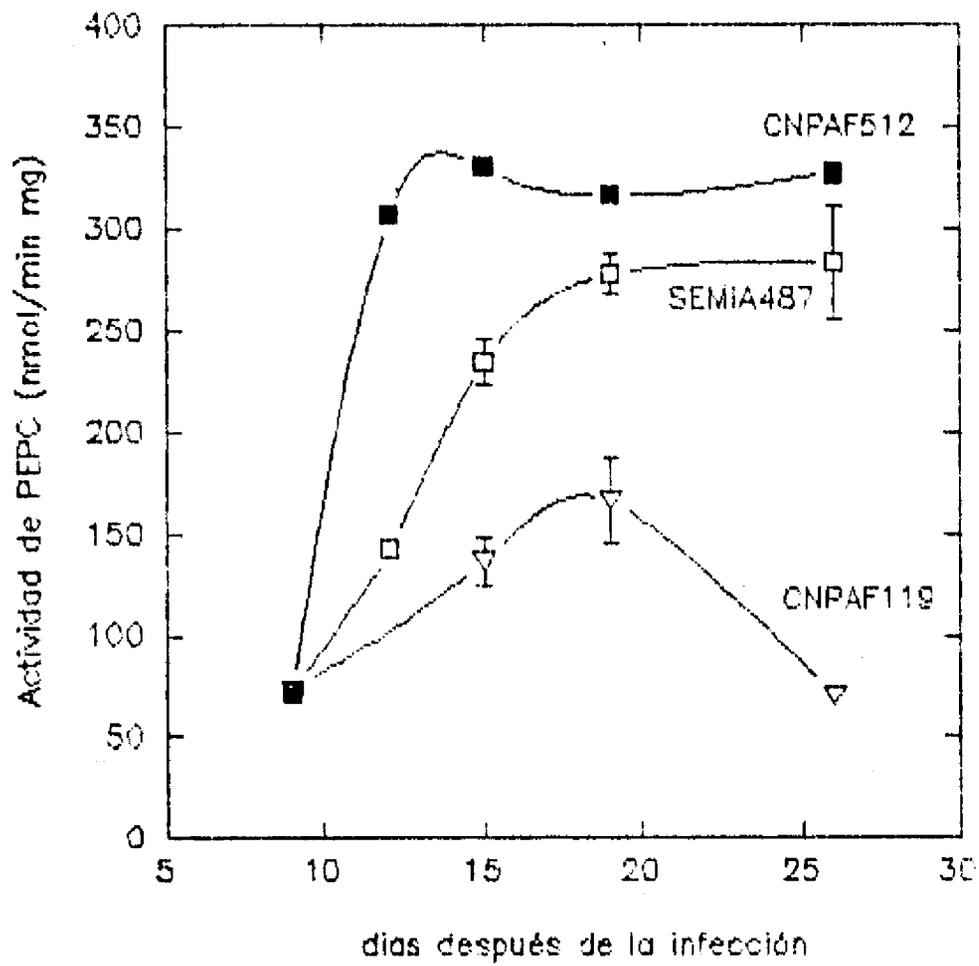


Figura 4. Actividad específica de fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) durante el desarrollo de nódulos de frijol infectados con las cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli CNPAF512, SEMIA487 y CNPAF119.

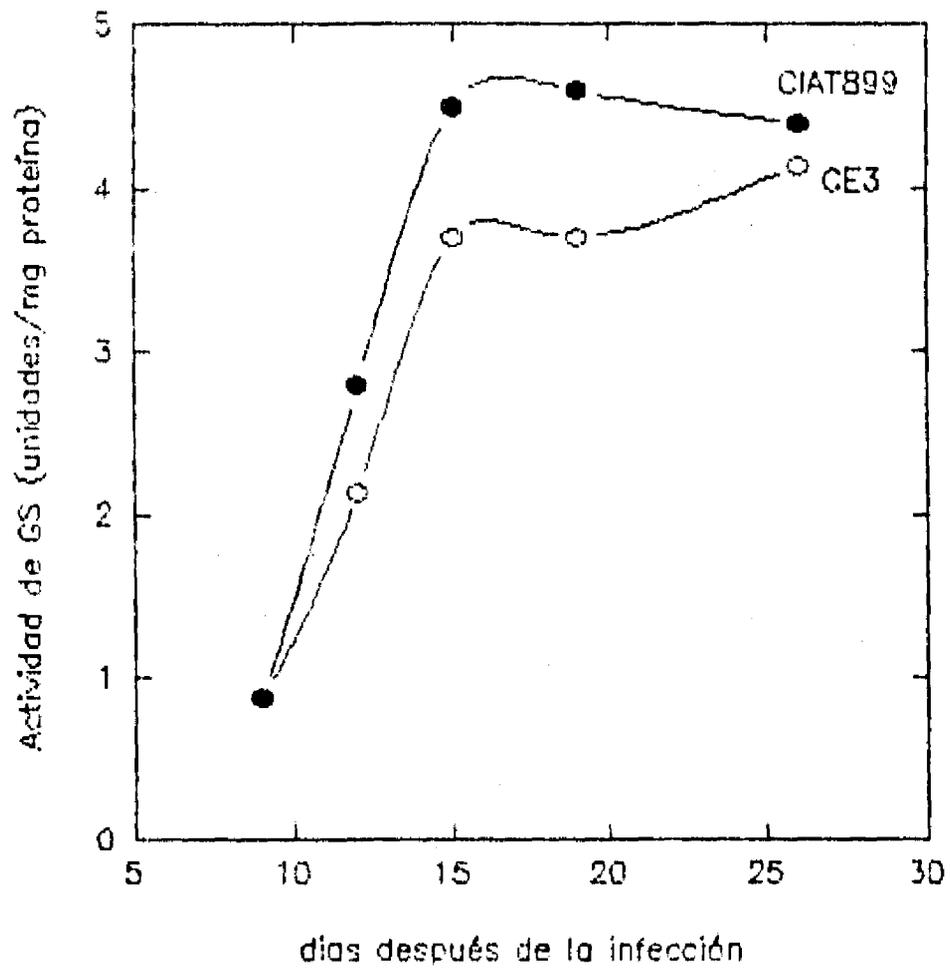


Figura 5. Actividad específica de Glutamina Sintetasa (transferasa) durante el desarrollo de nódulos de frijol infectados con Rhizobium tropici CIAT 899 y con Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli CE3.

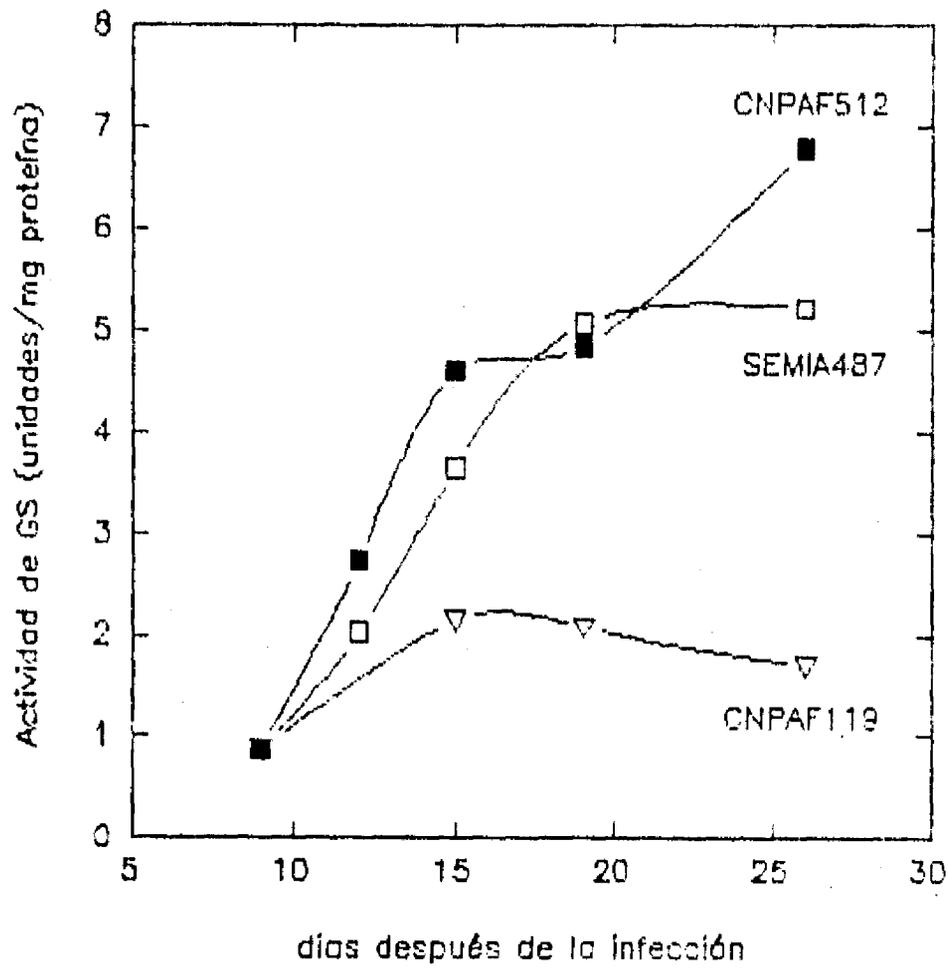


Figura 6. Actividad específica de Glutamina Sintetasa (transferasa) durante el desarrollo de nódulos de frijol infectados con las cepas de Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli CNPAF512, SEMIA487 y CNPAF119.

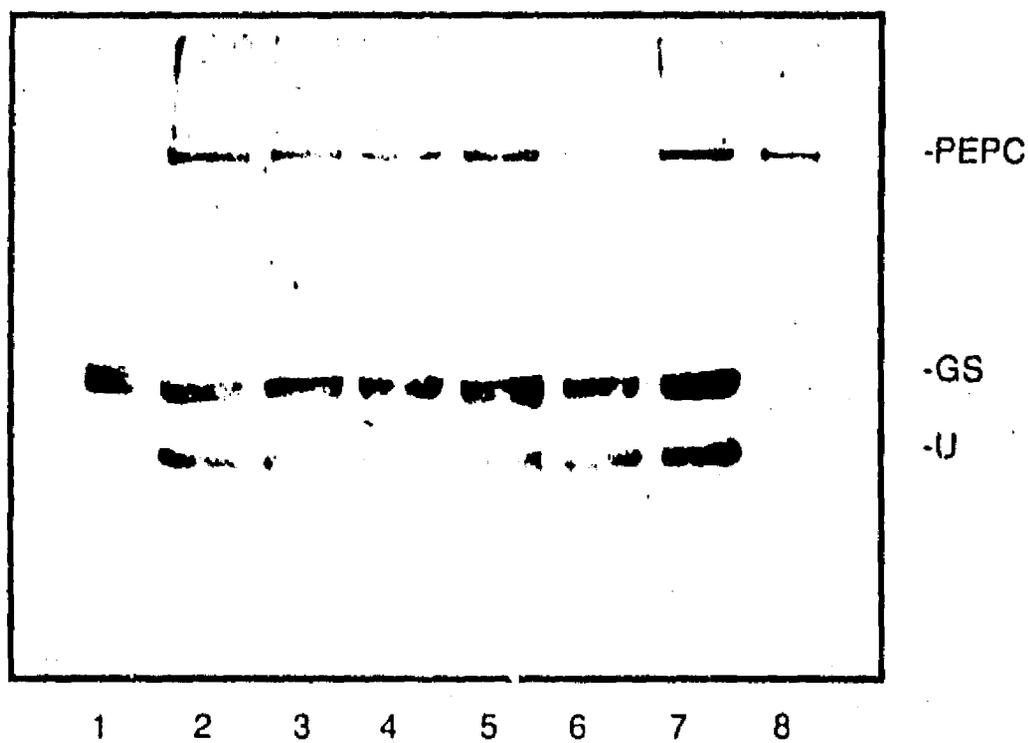


Figura 7. Inmunodetección con anticuerpos dirigidos contra fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), glutamina sintetasa (GS) y Uricasa (U) de nódulos, utilizando peroxidasa acoplada al segundo anticuerpo como sistema de detección. Cada carril contiene 60  $\mu\text{g}$  de proteína de extractos crudos de nódulos infectados con las cepas de Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli SEMIA 487 (carriles 2 y 7), CNPAF 512 (3), CE3 (4), CNPAF 119 (6) y Rhizobium tropici CIAT 899 (5). Como marcadores se utilizaron 2  $\mu\text{g}$  de GS pura de nódulos de frijol (1) y 3.5  $\mu\text{g}$  de PEPC pura de hojas de maíz (8).

## **Caracterización de la fosfoenol piruvato carboxilasa en nódulos de frijol.**

Se ha reportado que en nódulos de frijol se encuentra tres diferentes isoformas de la PEPC, que corresponden a tres bandas de tinción por actividad en geles nativos. Dos de éstas bandas, denominadas PEPC2 y PEPC3, se encuentran también en raíz y la otra, de menor movilidad electroforética (PEPC1), se expresa específicamente en el nódulo (Deroche *et al*, 1983; Deroche y Carrayol, 1989).

Con el fin de determinar si existen diferencias en la actividad de las diferentes isoformas de PEPC relacionadas a una mayor eficiencia en crecimiento vegetal, se analizó el patrón de isoformas de PEPC durante el desarrollo de nódulos infectados con diferentes cepas de Rhizobium. Los extractos de nódulos de diferentes días infectados con distintas cepas se enriquecieron por hidroxilapatita y se analizaron en geles nativos teñidos por actividad de PEPC (zimogramas). Existen dos diferentes tipos de cepas en cuanto a patrón de isoformas de PEPC. El primer tipo estaría ejemplificado por los nódulos infectados con la cepa CIAT899 (Figura 8), como puede observarse, en los nódulos de Rhizobium tropici la isoforma PEPC2 es más abundante que las isoformas PEPC1 y PEPC3, este patrón de isoformas se observa durante todo el desarrollo de los nódulos. El patrón de las isoformas de PEPC en los nódulos de las cepas de Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli CE3 y CFN037 es similar al de los nódulos la CIAT 899. (datos no mostrados). El otro tipo de patrón de isoformas se puede observar en los nódulos de la cepa de Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli SEMIA 487 (Figura 9). El zimograma de las fracciones enriquecidas en actividad de PEPC muestra que la isoforma específica de nódulo (PEPC1) es igual ó

más abundante que la isoforma PEPC2 en estos nódulos, el patrón de isoformas de PEPC es similar en los nódulos de la cepa CNPAF512. El mismo patrón de isoformas se observa durante todo el desarrollo de los nódulos infectados con estas dos cepas (datos no mostrados).

Con el fin de determinar si las diferentes isoformas de PEPC corresponden a la síntesis de distintas subunidades polipeptídicas, se purificó parcialmente la actividad de PEPC de extractos de nódulos de plantas infectadas con Rhizobium tropici CIAT 899, por hidroxilapatita y fenil sefarosa (Figura 10). La separación de proteínas de los extractos crudos de nódulos en columnas de hidroxilapatita, permite un enriquecimiento muy importante de las actividades de PEPC y de la GS; estas dos enzimas constituyen la mayor parte de la proteína de esta fracción (Figura 10, carril 3). La purificación posterior en una columna de fenil sefarosa no permite una mayor purificación que la obtenida previamente por hidroxilapatita (Figura 10, carriles 4 y 5). El patrón de isoformas de PEPC de las diferentes fracciones se mantiene durante la purificación parcial de la PEPC (Figura 8), sin embargo, la actividad de la PEPC es muy inestable y se pierde durante la diálisis de la fracción de fenil sefarosa (Figura 8, carril 4 y Figura 10, carril 5).

La fracción enriquecida por hidroxilapatita se corrió por cromatografía de intercambio iónico en HPLC, con el fin de obtener cada una de las isoformas por separado. Sin embargo, el patrón de elución de la actividad de PEPC en HPLC (Figura 11) no muestra una separación de isoformas, sino que eluye como un solo pico de actividad, a diferencia de lo que ocurre en los geles nativos, donde si se pueden separar tres isoformas (Figura 8). Aún así, el análisis de las diferentes

fracciones de actividad de PEPC por electroforésis en condiciones desnaturizantes muestra ligeras diferencias en la migración de las subunidades que constituyen la PEPC de las diferentes fracciones (Figura 12). Aparecen dos diferentes tipos de subunidades con pequeñas variaciones en peso molecular. Las primeras fracciones de actividad de PEPC que eluyen de la columna de intercambio iónico corresponderían a la isoforma específica de nódulo PEPC1 (más básica), estas fracciones se caracterizan por la presencia de un polipéptido de menor movilidad relativa (Figura 12, fracciones 27, 28 y 32). En las fracciones siguientes aparecen los dos tipos de polipéptidos (fracciones 29, 30 y 31), mientras que en las últimas fracciones se observa un solo polipéptido de PEPC de menor peso molecular (fracciones 33 a la 36), además de otras bandas contaminantes (fracciones 33 y 34).

Por otro lado se purificó parcialmente la actividad de PEPC de nódulos infectados con Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli SEMIA 487 por hidroxilapatita. Se analizó la composición de isoformas en geles nativos teñidos por actividad (Figura 9) y se corrió por cromatografía de intercambio iónico. En la cromatografía de intercambio iónico por Q Sefarosa se obtiene también un sólo pico de actividad que eluye entre 100 y 150 mM de NaCl (datos no presentados).

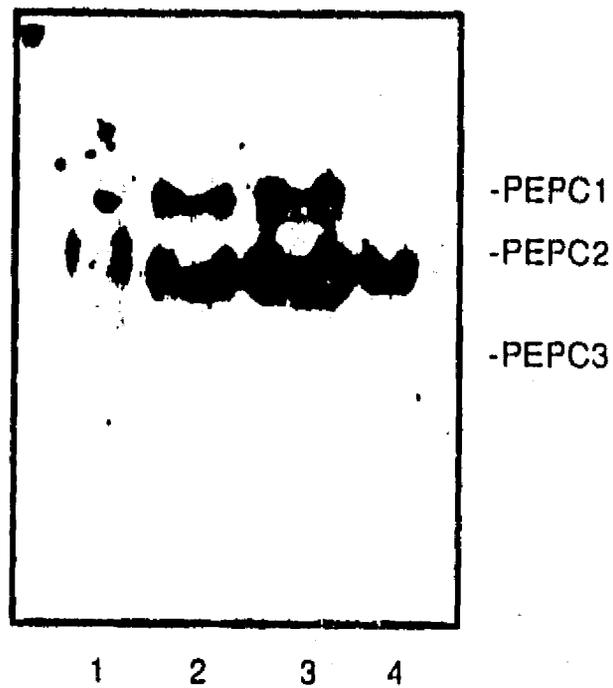


Figura 8. Patrón de isoformas de la fosfoenolpiruvato carboxilasa de nódulos de 21 días infectados con *Rhizobium tropici* CIAT 899, obtenido por electroforesis en geles nativos teñidos por actividad. (1) extracto crudo. (2) fracción enriquecida por hidroxilapatita. (3) fracción obtenida de fenilsulfarosa después de enriquecer con hidroxilapatita. (4) fracción anterior después de dializar. PEPC1, PEPC2 y PEPC3 son isoformas de fosfoenol piruvato carboxilasa.

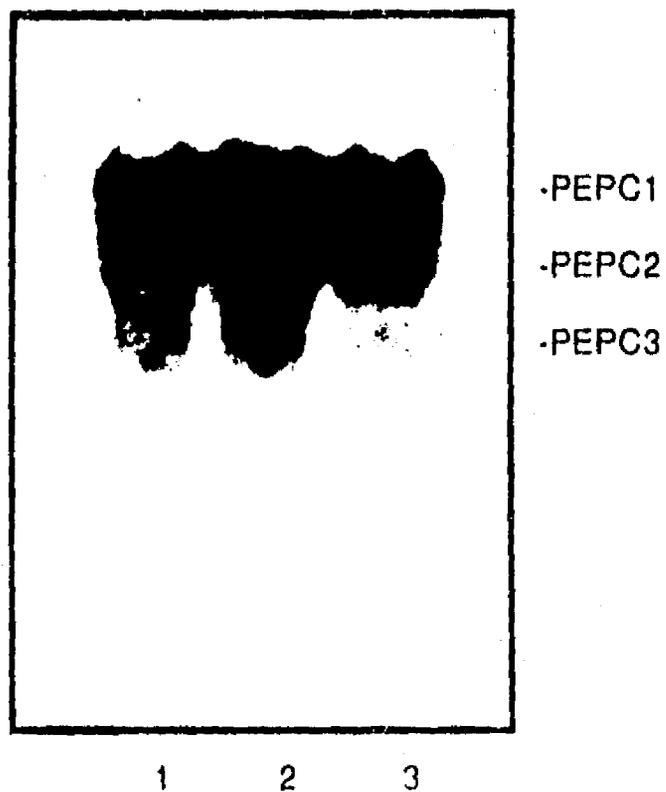


Figura 9. Patrón de isoformas de la fosfoenolpiruvato carboxilasa de nódulos de 21 días infectados con *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli SEMIA 487, obtenido por electroforesis en geles nativos teñidos por actividad. Los carriles 1, 2 y 3 tienen la misma muestra. PEPC1, PEPC2 y PEPC3 son isoformas de fosfoenolpiruvato carboxilasa.

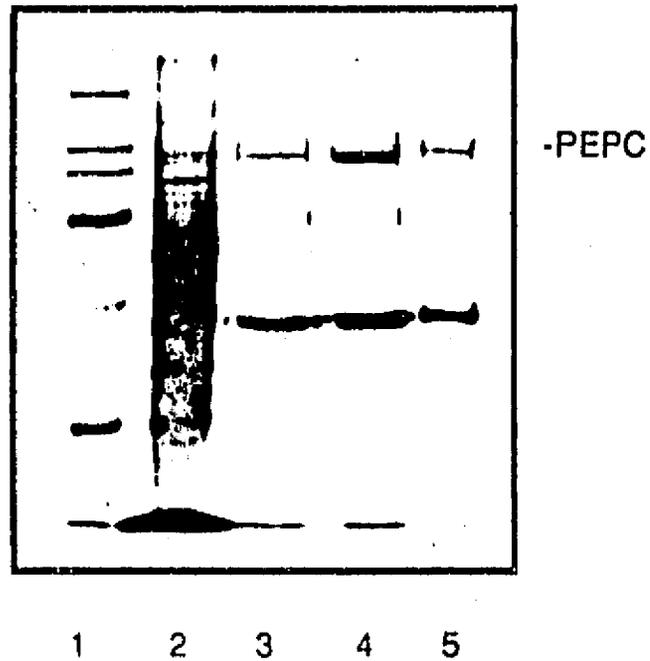


Figura 10. Gel desnaturalizante teñido por azul de Coomassie de la purificación parcial de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) de nódulos de 21 días infectados con Rhizobium tropici CIAT 899. (1) marcadores de peso molecular. (2) extracto crudo de nódulos. (3) fracción enriquecida por hidroxilapatita. (4) fracción obtenida de fenilseferosa después de enriquecer con hidroxilapatita. (5) fracción de fenilseferosa después de dializar.

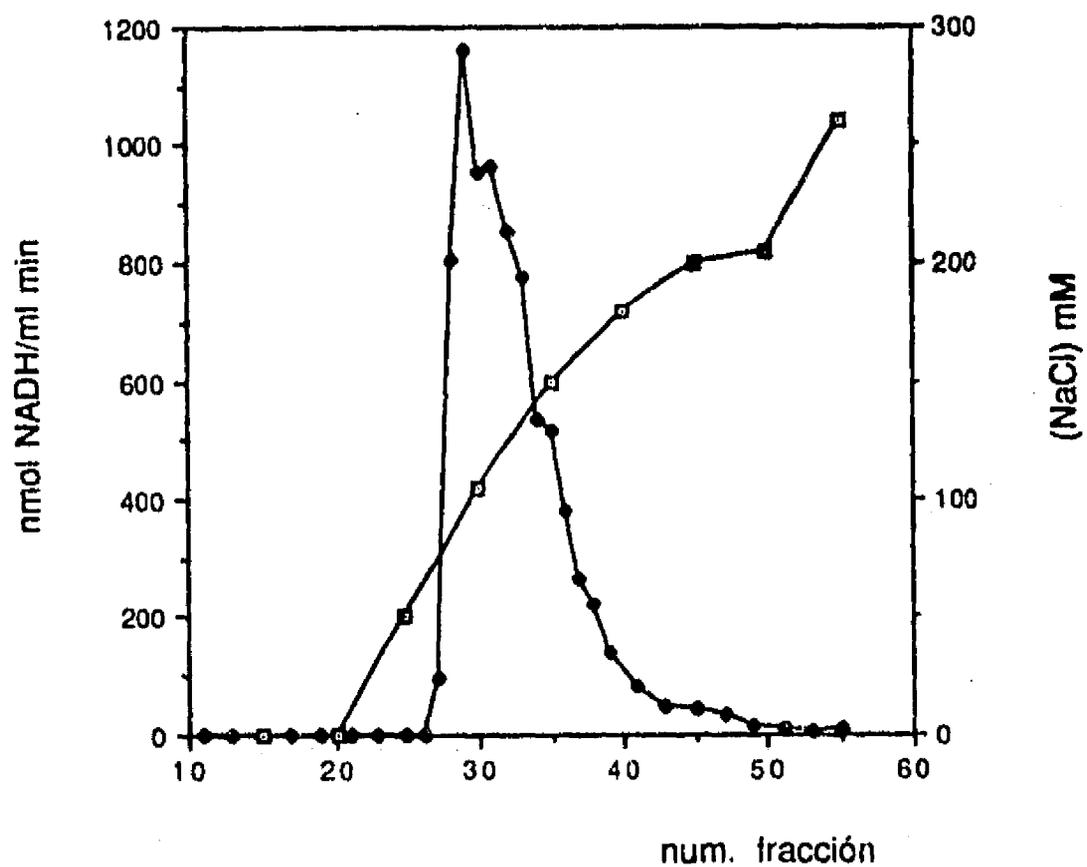


Figura 11. Perfil de elución de la actividad de la fracción de hidroxilapatita de fosfoenolpiruvato carboxilasa de nódulos de 21 días infectados con *Rhizobium tropici* CIAT 899 (♦), por cromatografía de intercambio iónico en HPLC; en una columna de TSK DEAE-2SW, utilizando un gradiente de 0 a 500mM de NaCl (□).

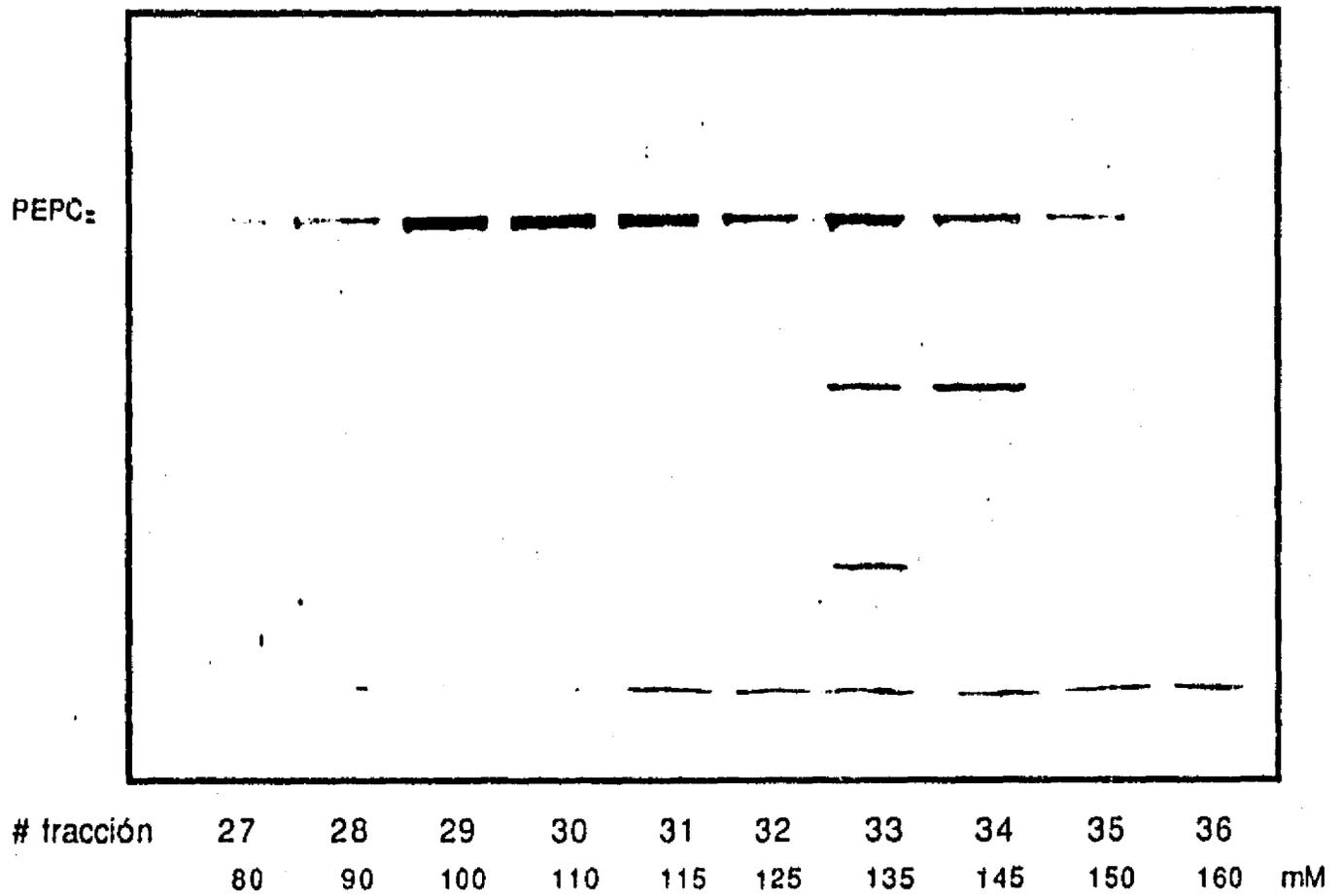


Figura 12. Electroforesis en SDS de las fracciones con actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa de nódulo (PEPC) obtenidas por cromatografía de intercambio iónico en el experimento de la figura 7. Los números corresponden a las fracciones con mayor actividad de PEPC del experimento anterior. Se incluyen también los valores de concentración mM de NaCl de cada fracción.

## **Efecto de la fertilización con CO<sub>2</sub> sobre el crecimiento y la fijación de nitrógeno.**

Se ha considerado que una de las principales limitaciones de la fijación de nitrógeno es la cantidad de fotosintato disponible en el nódulo. Un incremento en la concentración de CO<sub>2</sub> atmosférico resulta en una disminución del proceso de fotorespiración, haciendo más eficiente la fotosíntesis; en consecuencia, el aporte de fotosintato al nódulo debe aumentar, produciendo un aumento en la cantidad de nitrógeno fijado y finalmente en el rendimiento (Hardy y Havelka, 1975).

Con el fin de averiguar si un aumento en la eficiencia en fotosíntesis tiene algún efecto en el metabolismo del nódulo, se analizó el efecto de la concentración alta de CO<sub>2</sub> sobre la expresión y la composición de isoformas de la glutamina sintetasa y la fosfoenolpiruvato carboxilasa, en relación a la actividad de fijación de nitrógeno y al crecimiento vegetal, utilizando dos diferentes cepas de Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli.

Se inocularon plantas de frijol cv. negro Jamapa con dos diferentes cepas de Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli, la cepa silvestre CE3 y la mutante TMPD++ CFN037, cuyas principales características simbióticas son una diferenciación más temprana de los bacteroides y una inducción más temprana de la actividad de nitrogenasa (Soberón *et al.*, 1990). Las plantas infectadas se cultivaron en una cámara con ambiente controlado hasta el día 17 después de la infección, en concentraciones normales de CO<sub>2</sub> (0.02%), ó se cultivaron en condiciones de alto CO<sub>2</sub>, incrementando la concentración de CO<sub>2</sub> a 0.1% durante el fotoperiodo, a partir

del día 8 después de la infección.

La fertilización con CO<sub>2</sub> tuvo un efecto significativo sobre las tasas de crecimiento de las plantas, pero principalmente sobre el crecimiento de las plantas infectadas con la cepa CFN037 (Figura 13).

En condiciones de CO<sub>2</sub> normal, la actividad de nitrogenasa es mayor desde el inicio del desarrollo de los nódulos de la cepa CFN037 en comparación a los de la cepa silvestre (Figura 14), tal como se había reportado anteriormente (Soberón *et al*, 1990). La actividad de nitrogenasa se ve incrementada con el tratamiento con alto CO<sub>2</sub> en los nódulos de ambas cepas durante el desarrollo (Figura 14). A diferencia de lo que ocurre en CO<sub>2</sub> normal, en alto CO<sub>2</sub> la actividad de nitrogenasa en los nódulos es similar en los nódulos de la CE3 y los de la CFN037, excepto al inicio del desarrollo, cuando la actividad de nitrogenasa es mayor en los nódulos de la cepa CFN037 (Figura 14, 10 días).

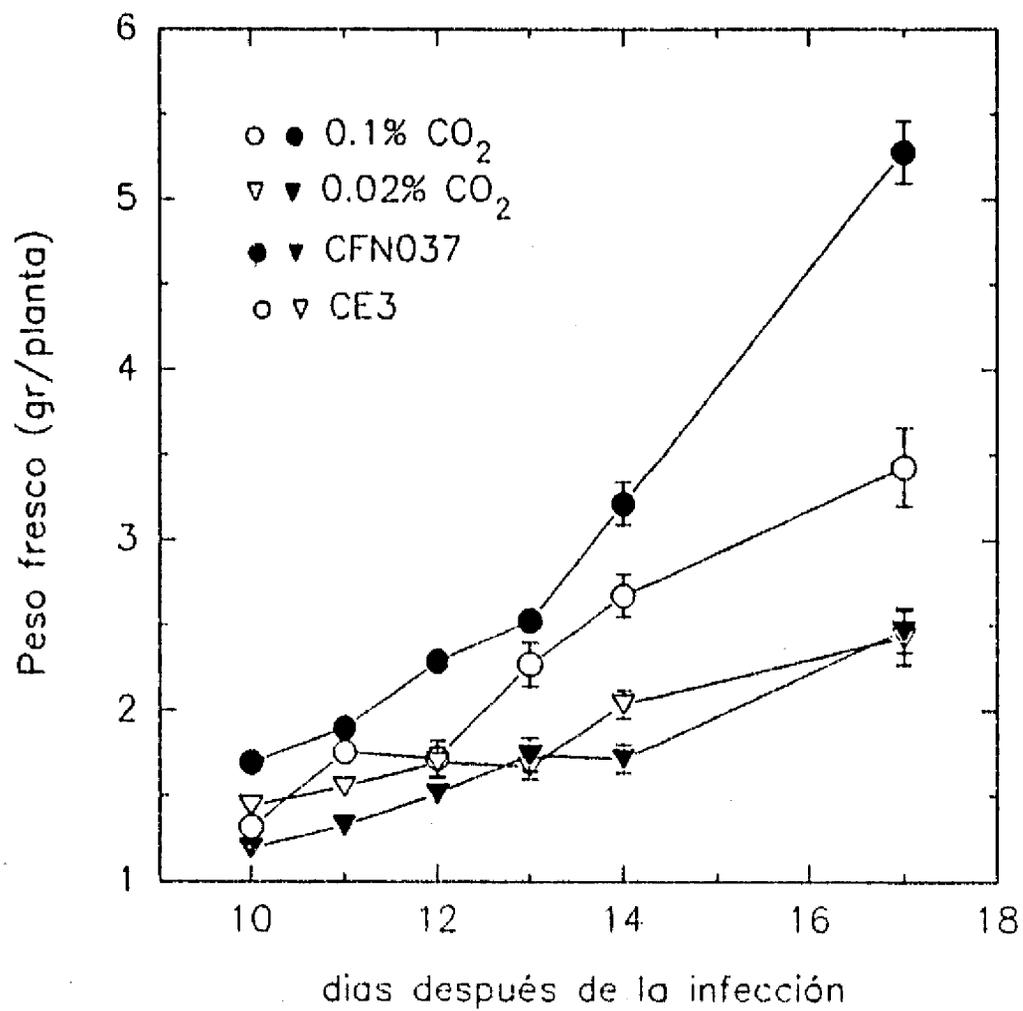


Figura 13. Incremento en peso fresco de plantas inoculadas con Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli CE3 ó CFN037, cultivadas en CO<sub>2</sub> normal (0.02%) ó en alto CO<sub>2</sub> (0.1%). Los valores son el promedio de 20 determinaciones. Las barras verticales son  $\pm$  el error estándar.

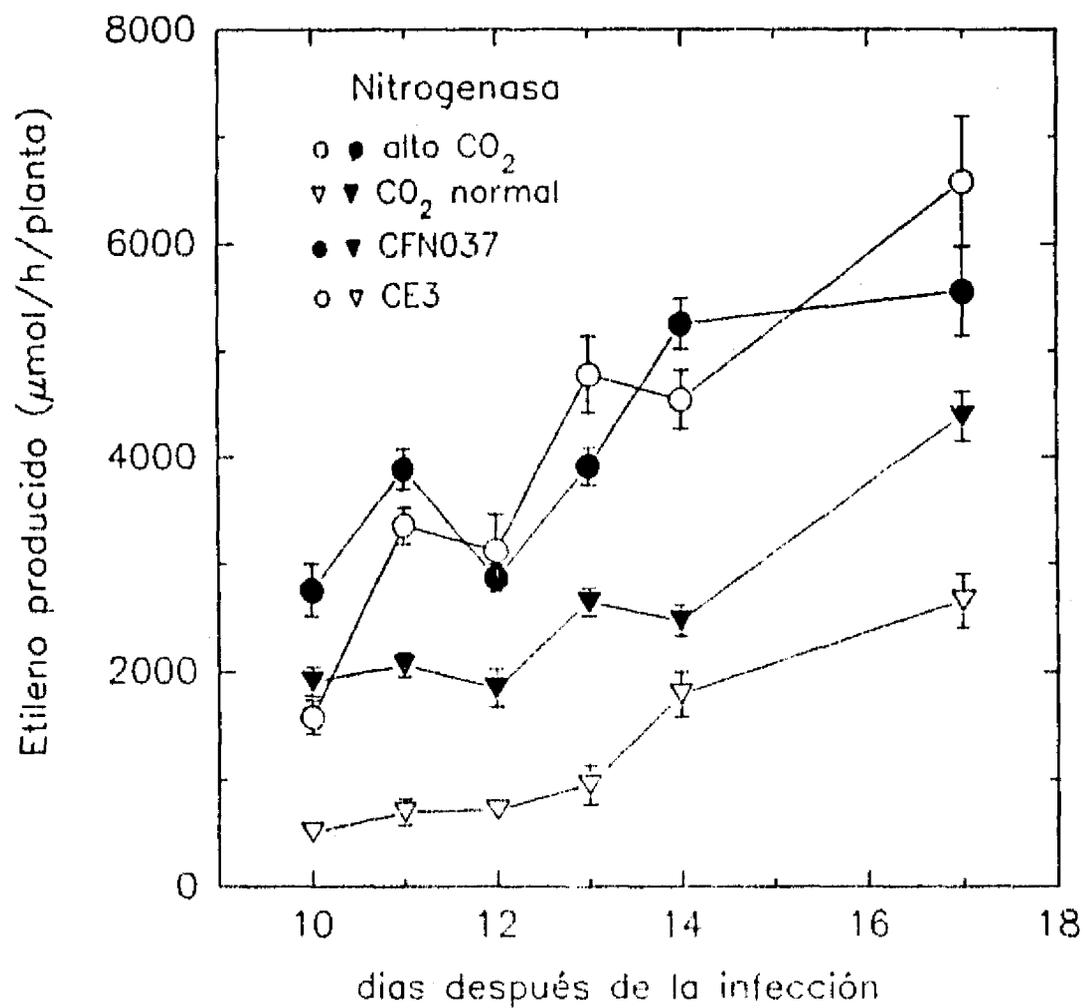


Figura 14. Actividad de nitrogenasa en nódulos de plantas infectadas con Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli CE3 ó CFN037 y cultivadas en CO<sub>2</sub> normal (0.02%) ó en alto CO<sub>2</sub> (0.1%). Los valores son el promedio de 20 determinaciones ± error estándar (barras verticales).

### **Efecto del alto CO<sub>2</sub> sobre la actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa y glutamina sintetasa de nódulos de frijol.**

Se determinó el efecto del incremento en fijación de nitrógeno, como consecuencia de la fertilización con CO<sub>2</sub>, sobre las actividades de la PEPC y GS durante el desarrollo de nódulos infectados con la cepa silvestre de Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli CE3. La actividad específica de PEPC en nódulos muestra una ligera inducción del día 10 al día 17 (Figura 15). Los nódulos de plantas en alto CO<sub>2</sub> muestran una inducción más rápida de la actividad de PEPC al día 12, que los nódulos de plantas cultivadas en CO<sub>2</sub> normal. Sin embargo, al día 17 la actividad específica de PEPC (248 vs. 216  $\eta\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) es similar en alto CO<sub>2</sub> y en CO<sub>2</sub> normal.

La actividad específica inicial de GS, a los 10 días de la infección, es 2 veces mayor en nódulos de plantas cultivadas en alto CO<sub>2</sub> que en nódulos de plantas cultivadas en CO<sub>2</sub> normal. (Figura 16). La actividad de GS se induce 5 veces del día 10 al día 17 en CO<sub>2</sub> normal, y 3.5 veces en alto CO<sub>2</sub>. Hay una inducción más rápida de la actividad de GS al día 14 en los nódulos de plantas en alto CO<sub>2</sub> con respecto a los nódulos de plantas cultivadas en CO<sub>2</sub> normal. Al día 17 la actividad específica de GS (5.1 vs. 4.1  $\text{U}_T \text{mg}^{-1}$ ) es similar en ambas condiciones de crecimiento.

Se compararon la actividades específicas de PEPC y GS en nódulos de la cepa silvestre CE3 con las actividades de PEPC y GS en nódulos de la mutante TMPD++ CFN037, a los 11 y 17 días después de la inoculación. Las actividades específicas de PEPC al día 11 no muestran diferencias significativas entre los nódulos de las dos

cepas ni entre los tratamientos con CO<sub>2</sub> (Figura 17). Se puede observar una inducción en la actividad de PEPC del día 11 al día 17, en nódulos de la cepa silvestre CE3 cultivados en CO<sub>2</sub> normal y en alto CO<sub>2</sub>. No se observa una inducción de la actividad de PEPC en nódulos de la cepa mutante CFN037 en ninguna de las dos condiciones de crecimiento, más aún, la actividad de PEPC disminuye de los 11 a los 17 días en alto CO<sub>2</sub>, en consecuencia, la actividad específica de PEPC es menor en los nódulos de la cepa CFN037 que en los nódulos de la cepa silvestre.

Si se compara la actividades específicas de GS en nódulos de la cepa silvestre CE3 con las actividades en nódulos de la mutante TMPD++ CFN037 se puede observar una actividad 2 veces mayor en nódulos de la cepa mutante en comparación con nódulos de la cepa silvestre a los 11 días de la infección en condiciones de CO<sub>2</sub> normal (Figura 18). En alto CO<sub>2</sub>, a los 11 días, no hay diferencias en actividad específica de GS entre nódulos de la cepa silvestre y nódulos de la cepa mutante. A los 11 días, tampoco hay diferencias en actividad de GS entre nódulos de la cepa mutante cultivados en alto CO<sub>2</sub> ó en CO<sub>2</sub> normal. De los 11 a los 17 días se observa una inducción de 7 veces en la actividad específica de GS en los nódulos de la cepa silvestre cultivados en CO<sub>2</sub> normal. La inducción es menor en las otras condiciones examinadas (2.5 a 3 veces). A los 17 días después de la infección no hay diferencias significativas en las actividades específicas de GS entre las diferentes condiciones de CO<sub>2</sub> ni entre las dos cepas de Rhizobium.

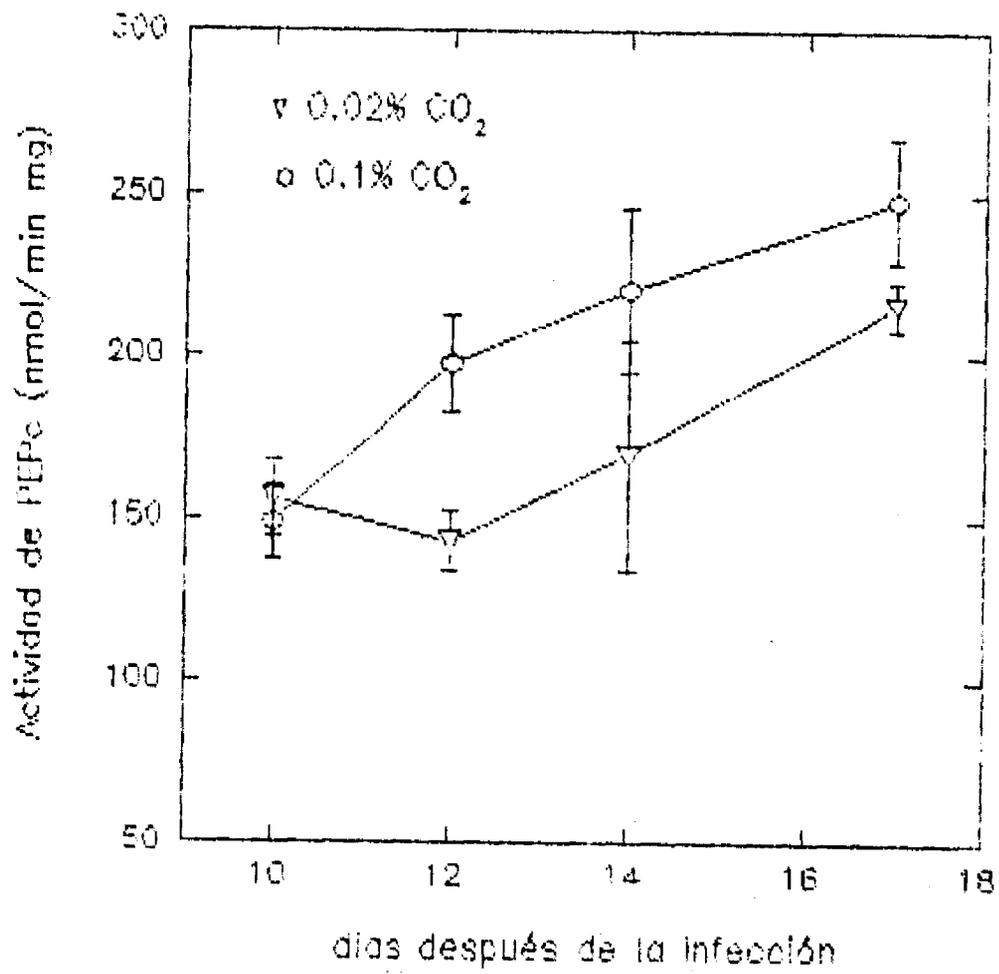


Figura 15. Actividad específica de fosfoenolpiruvato carboxilasa ( $\pm$  desviación estandard) durante el desarrollo de nódulos de plantas infectadas con Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli CE3, cultivadas en alto CO<sub>2</sub> (0.1%) y en CO<sub>2</sub> normal (0.02%).

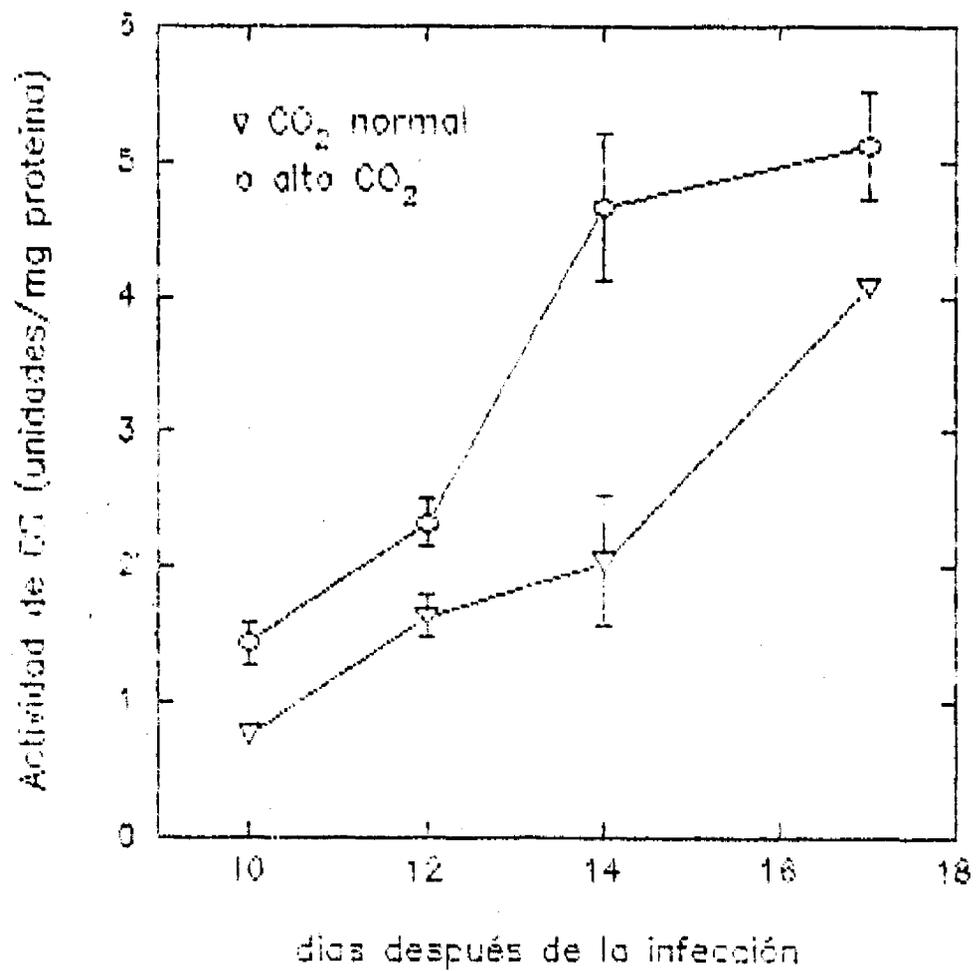


Figura 16. Actividad específica de glutamina sintetasa de nódulos (actividad de transferasa  $\pm$  desviación estandard), durante el desarrollo de plantas infectadas con Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli CE3, crecidas en alto CO<sub>2</sub> (0.1%) y en CO<sub>2</sub> normal (0.02%).

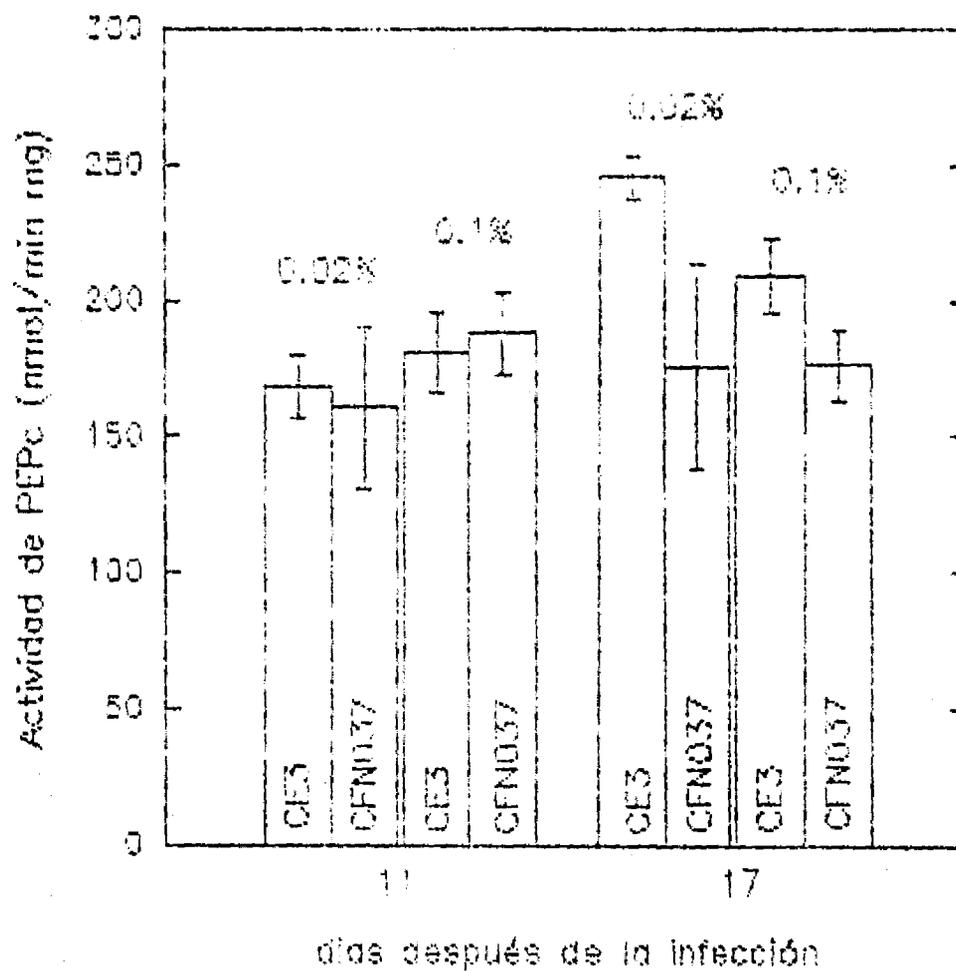


Figura 17. Actividad específica de fosfoenol piruvato carboxilasa de nódulos, a los 11 y a los 17 días después de la infección de plantas con las cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli CE3 y CFN037, cultivadas en alto CO<sub>2</sub> (0.1%) ó CO<sub>2</sub> normal (0.02%). Las barras verticales representan la desviación estandar.

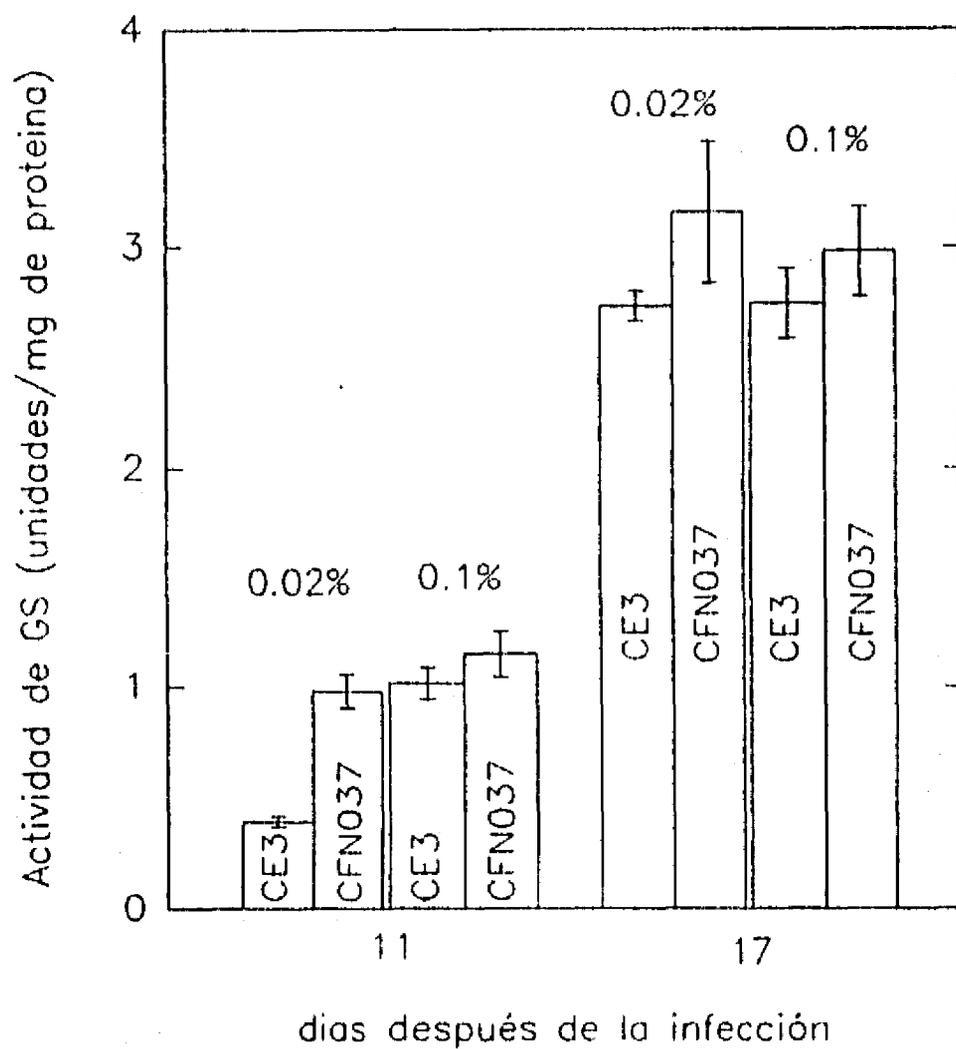


Figura 18. Actividad específica de glutamina sintetasa de nódulos (actividad de transferasa  $\pm$  desviación estándar), a los 11 y a los 17 días después de la infección con las cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli CE3 y CFN037. Las plantas infectadas se cultivaron en alto CO<sub>2</sub> (0.1%) ó en CO<sub>2</sub> normal (0.02%).

### **Regulación de las isoformas de la fosfoenol piruvato carboxilasa y la glutamina sintetasa del nódulo por alto CO<sub>2</sub>.**

De los resultados anteriores puede concluirse que la fertilización con CO<sub>2</sub> tiene poco efecto sobre la actividad de las enzimas del metabolismo del nódulo. El siguiente objetivo fue examinar si la mayor capacidad de fijación de nitrógeno, que resulta de la fertilización por CO<sub>2</sub> tenía algún efecto sobre la expresión de las distintas isoformas de las enzimas del metabolismo del nódulo.

Se analizó la composición de isoformas de la PEPC de nódulos de plantas cultivadas en alto CO<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> normal, a los 11 y 17 días después de la infección con las cepas de Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli CE3 y CFN037, por medio de electroforesis en geles nativos y tinción por actividad; sin embargo esta metodología no permite una interpretación clara de los resultados (datos no mostrados). Como se ha indicado anteriormente, dos distintos polipéptidos de PEPC pueden separarse por electroforesis en SDS (Figura 12), un polipéptido de mayor peso molecular que corresponde a la isoforma PEPC1, específica de nódulo, y un polipéptido de menor peso que correspondería a las isoformas PEPC2 y PEPC3. El análisis de la PEPC de nódulos por electroforesis e inmunodetección con anticuerpos (Figura 19) muestra cambios en la abundancia relativa de las subunidades de PEPC. A los 11 días después de la infección, la subunidad de la PEPC1 es más abundante en los nódulos de la cepa silvestre CE3 en alto CO<sub>2</sub> con respecto a CO<sub>2</sub> normal. Los nódulos de la cepa mutante CFN037 presentan también una mayor cantidad del polipéptido específico de nódulo, a los 11 días, en ambas condiciones de crecimiento. La

proporción relativa de los dos diferentes polipéptidos se mantiene, de los 11 a los 17 días, en los nódulos de la CE3 cultivados en CO<sub>2</sub> normal. Por otro lado, la cantidad relativa del polipéptido específico del nódulo es menor en nódulos de la cepa silvestre cultivados en alto CO<sub>2</sub>, y es aún más baja en los nódulos de la cepa CFN037, tanto en CO<sub>2</sub> normal como en alto CO<sub>2</sub>, a los 17 días de infección.

Finalmente, se analizó la composición de polipéptidos de la GS de nódulos de plantas infectadas con las cepas de Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli CE3 y CFN037, cultivadas en diferentes condiciones CO<sub>2</sub>. Las subunidades de la GS de nódulos de frijol pueden separarse como dos bandas polipeptídicas de aproximadamente 39 000 de peso molecular, por electroforesis desnaturalizante, e identificarse por inmunodetección (Bennett y Cullimore, 1989; Padilla *et al.*, 1987). Sin embargo, esta metodología no permitió la separación de los polipéptidos  $\beta$  y  $\gamma$  de la GS de nódulos en el sistema de electroforesis utilizado en estos experimentos. La figura 19 es un ejemplo de los resultados obtenidos utilizando diferentes concentraciones de proteína y/o anticuerpos. La composición de subunidades de la GS se analizó entonces por electroforesis en dos dimensiones, separación por punto isoelectrico la primera dimensión y por peso molecular en la segunda dimensión (O'Farrell, 1975). Los resultados del análisis de las subunidades de la GS (Figura 20) muestran que la expresión del polipéptido  $\gamma$ , específico de nódulo, disminuye significativamente en alto CO<sub>2</sub> a los 17 días después de la infección con Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli, mientras que la expresión del polipéptido  $\beta$  no se ve afectada por el tratamiento con alto CO<sub>2</sub>. Los mismos resultados se obtienen en

nódulos infectados con la cepa silvestre CE3 (Figura 20 A y B) y con la cepa mutante CFN037 (Figura 20 C y D). La relación de polipéptidos  $\beta/\gamma$ , determinada por densitometría, es 2 veces mayor en alto  $\text{CO}_2$  que en  $\text{CO}_2$  normal para nódulos de ambas cepas.

Los resultados también muestran que en  $\text{CO}_2$  normal, el polipéptido  $\gamma$  se expresa más en los nódulos de la CFN 037 que en los nódulos de la CE3 (Figura 20, A y C). La relación de polipéptidos  $\beta/\gamma$  es 1.2 en nódulos de la mutante CFN 037, y 2.1 para los nódulos de la cepa silvestre CE3.

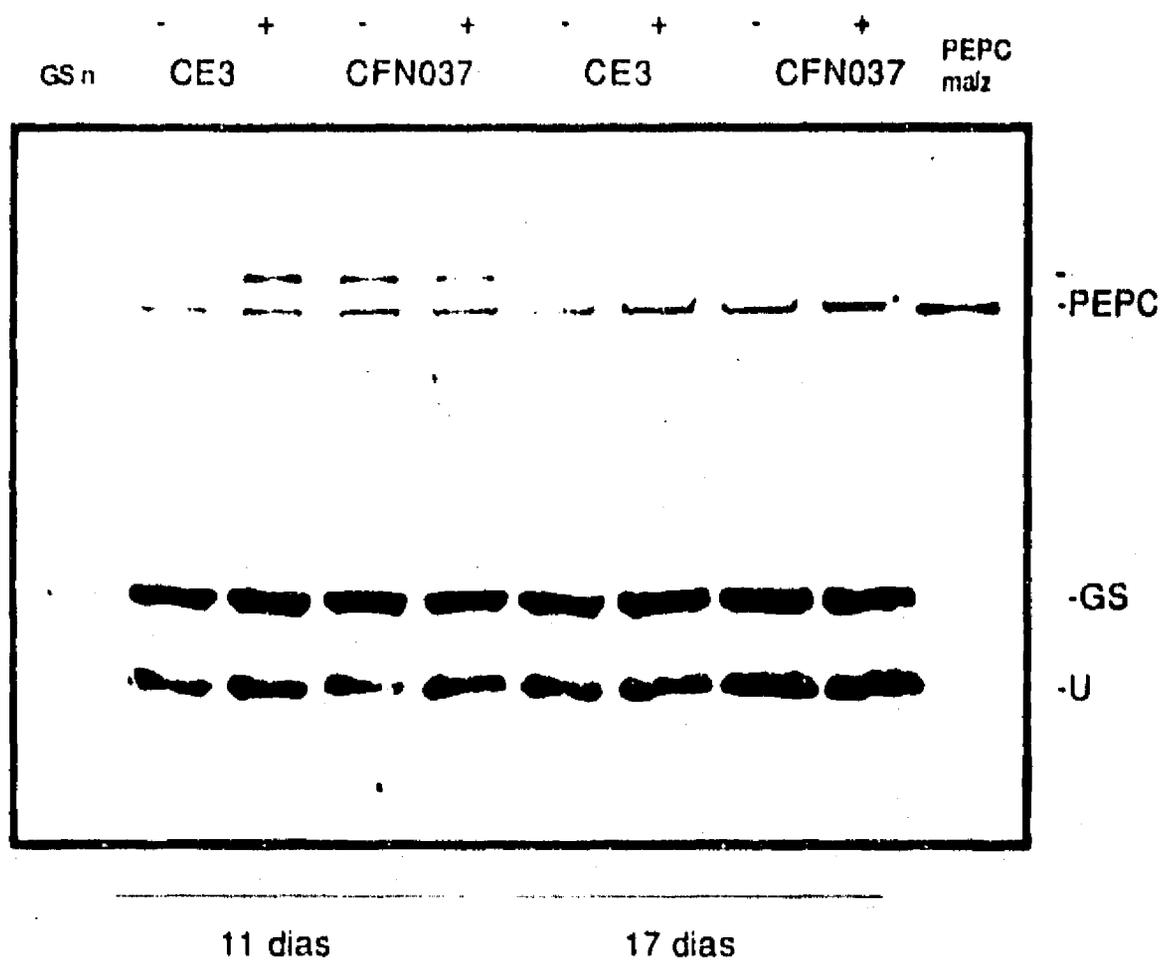


Figura 19. Inmunodetección con anticuerpos dirigidos contra fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), glutamina sintetasa (GS) y Uricasa (U), en extractos de nódulos de plantas crecidas en condiciones de alto CO<sub>2</sub> (+) y CO<sub>2</sub> normal (-), a los 11 y 17 días de la infección con las cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli CE3 y CFN037. Se utilizó fosfatasa alcalina acoplada al segundo anticuerpo como sistema de detección. Cada carril contiene 40 µg de proteína de nódulos. Se utilizaron 2 µg de GS pura de nódulos y 3.5 µg de PEPC pura de maíz como marcadores.

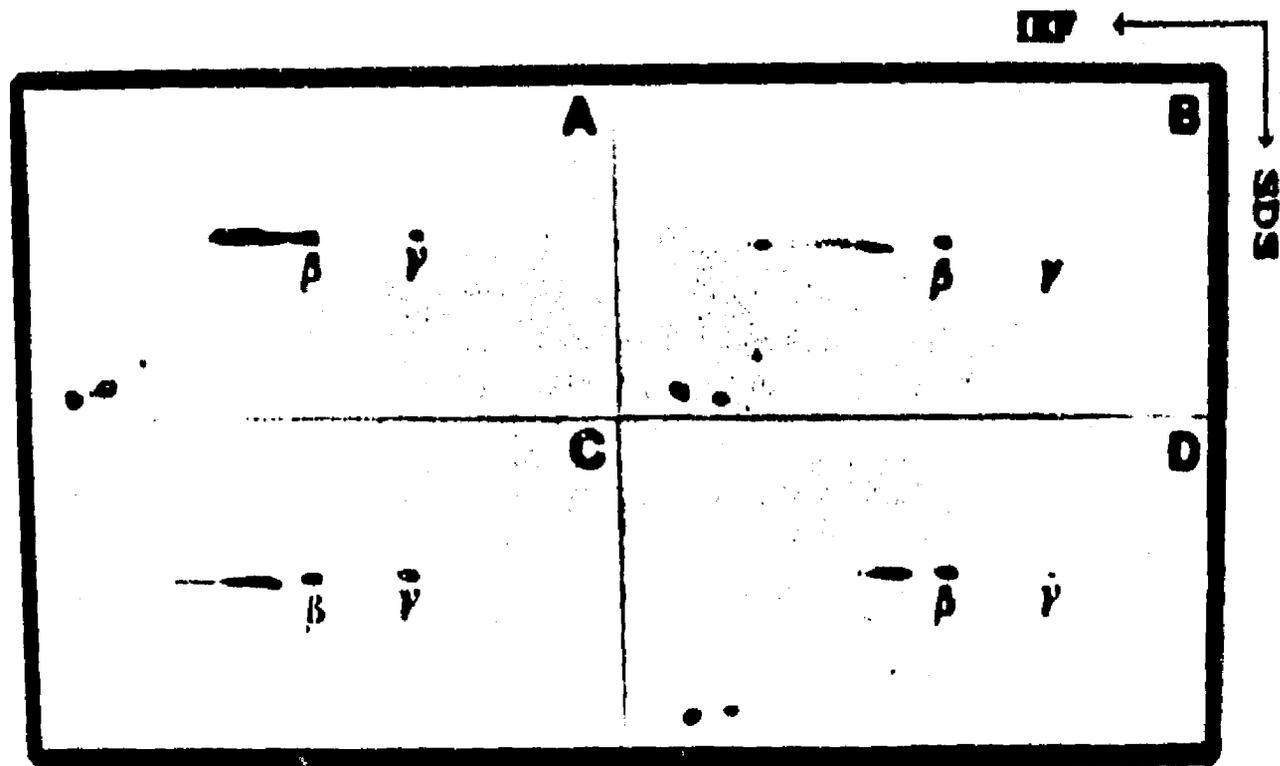


Figura 20. Composición de polipéptidos de la glutamina sintetasa de nódulos de frijol infectados con *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli CE3 (A y B) ó CFN 037 (C y D). Las plantas infectadas se crecieron en 0.02% de CO<sub>2</sub> (A y C) ó 0.1% de CO<sub>2</sub> (B y D). Los extractos se analizaron por electroforesis en dos dimensiones y se revelaron por Western utilizando anticuerpos contra la GS de nódulo y anticuerpos conjugados a fosfatasa alcalina como sistema de detección.  $\beta$  y  $\gamma$  son polipéptidos de GS.

## DISCUSION

### **Actividad de glutamina sintetasa y fosfoenol piruvato carboxilasa durante la simbiosis frijol-Rhizobium.**

La simbiosis entre frijol cv. negro Jamapa y las cepas de Rhizobium CIAT 899 y CNPAF512 se caracterizan por una más rápida inducción y una mayor actividad de PEPC (Figuras 3 y 4) y de GS (Figuras 5 y 6), en contraste con la expresión de PEPC y GS en la simbiosis entre frijol negro Jamapa y la cepas de Rhizobium CE3 y CNPAF119, simbiosis menos eficientes en acumulación de materia vegetal (Figuras 1 y 2). Estos resultados permiten considerar a Rhizobium tropici CIAT 899 como una cepa "precoz" similar a la CNPAF512 (Hungria *et al.*, 1991), las plantas noduladas con este tipo de cepas no muestran los síntomas de deficiencia de nitrógeno característico de otras cepas que nodulan frijol consideradas "tradicionales", como sería el caso de la CE3, debido a la falta de sincronización entre el agotamiento de las reservas de los cotiledones y el comienzo en la actividad de fijación y asimilación de nitrógeno en los nódulos. En general, los resultados de este trabajo muestran diferencias en la rapidez de la inducción y en los niveles de actividad específica de PEPC y GS en nódulos infectados con diferentes cepas de Rhizobium. Estas diferencias pueden correlacionarse con las tasas de crecimiento de las plantas (Figuras 1 a la 6). La cepa SEMIA487, por ejemplo, es una cepa intermedia entre la CNPAF512 y la CNPAF119 en cuanto a crecimiento, y presenta una inducción más lenta de la actividades de PEPC y GS, aunque los niveles de actividad de PEPC y GS son similares a los de la CNPAF512 al final del periodo de desarrollo.

### **Limitación de Carbono en el nódulo.**

El efecto de la fertilización con CO<sub>2</sub> sobre la actividad de fijación de nitrógeno y el crecimiento (Figuras 13 y 14) son evidencias de que en condiciones normales, la actividad del nódulo está limitada por el flujo de carbono (Murphy, 1986; Phillips *et al.*, 1976). Sin embargo, la verdadera limitación por el fotosintato debería reflejarse en un incremento en la actividad de específica de nitrogenasa. Se requiere determinar la actividad específica de nitrogenasa en condiciones de alto CO<sub>2</sub> para descartar la posibilidad de que la nodulación, más que la actividad del nódulo este afectada por el tratamiento con alto CO<sub>2</sub>. Aunque en otros sistemas como en chícharo se ha encontrado que el incremento en fijación de nitrógeno debido a un enriquecimiento del CO<sub>2</sub> atmosférico se refleja en un incremento en la actividad específica de nitrogenasa sin afectar la masa total de los nódulos (Masterson y Sherwood, 1978).

Se ha sugerido que la síntesis de ureidos es una estrategia metabólica de algunas leguminosas para enfrentar las condiciones de limitación de carbono en el nódulo (Schubert y Boland, 1990), puesto que los resultados de este trabajo indican un mayor aporte de fotosintato hacia el nódulo en condiciones de alto CO<sub>2</sub>, existía la posibilidad de que el metabolismo de síntesis de ureidos cambiara a un metabolismo de síntesis de amidas en los nódulos de plantas cultivadas en alto CO<sub>2</sub>. Sin embargo, las plantas cultivadas en alto CO<sub>2</sub> transportan más ureidos en el xilema ( $3.36 \pm 0.08$   $\eta\text{mol planta}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ ) y acumulan más ureidos en los nódulos ( $3.62 \pm 0.26$   $\eta\text{mol mg peso fresco}^{-1}$ ), en comparación con los nódulos ( $2.72 \pm 0.44$   $\eta\text{mol mg peso fresco}^{-1}$ ) y

el xilema ( $2.06 \pm 0.04 \text{ } \mu\text{mol planta}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ ) de plantas cultivadas en  $\text{CO}_2$  normal. Esto indica que la síntesis de ureidos está regulada por factores determinados genéticamente y no por las condiciones metabólicas. La mayor concentración de ureidos en las plantas cultivadas en alto  $\text{CO}_2$  refleja la mayor actividad de fijación de nitrógeno en los nódulos (Figura 14), pero también podría indicar una mayor actividad de asimilación de nitrógeno con respecto a los nódulos de plantas en  $\text{CO}_2$  normal.

La mayor actividad de nitrogenasa en los nódulos de la cepa CFN037, en condiciones de  $\text{CO}_2$  normal (Figura 14), sugiere un uso más eficiente del carbono por los bacteroides de la cepa CF037, probablemente como resultado de la expresión del citocromo  $a+a_3$  (Soberón *et al.*, 1990). En este caso la actividad de los nódulos de la cepa CFN037 estaría menos limitada por el fotosintato que los nódulos de la cepa CE3. En alto  $\text{CO}_2$ , las actividades de nitrogenasa por planta son similares en los nódulos de la cepa CE3 y los nódulos de la cepa CFN037, sugiriendo que en estas condiciones la nitrogenasa está funcionando a su capacidad máxima y que el aporte de fotosintato en alto  $\text{CO}_2$  ya no es un factor limitante para la actividad del nódulo. El mayor incremento en peso fresco en alto  $\text{CO}_2$  de las plantas infectadas con la cepa CFN037 (Figura 13), se puede explicar asumiendo que los bacteroides de la cepa CFN037 utilizan con más eficiencia el fotosintato del nódulo, dado que en alto  $\text{CO}_2$  la actividad de nitrogenasa es similar en los nódulos de ambas cepas, es evidente que el exceso de fotosintato se utiliza únicamente para incrementar la biomasa vegetal.

### **Caracterización y regulación de la fosfoenol piruvato carboxilasa de nódulos de frijol.**

Se ha demostrado que la PEPC desempeña un papel fundamental en el metabolismo del nódulo, ya que puede contribuir con un alto porcentaje del carbono que se requiere para la fijación de nitrógeno (Warembourg y Roumet, 1989). Además de su papel durante la fijación de nitrógeno, los resultados sugieren un papel muy activo de la PEPC durante las etapas tempranas de desarrollo del nódulo, la inducción más rápida de PEPC en los nódulos de las cepas CIAT899 y CNPAF512 (Figuras 3 y 4) permitiría un mayor aporte de carbono al metabolismo del nódulo. En las etapas iniciales del desarrollo, el aporte de carbono al nódulo podría ser más limitante debido a que las bacterias se están dividiendo activamente y la fijación de nitrógeno no ha comenzado aún. Esto se reflejaría posteriormente en una mayor capacidad de fijación de nitrógeno.

A pesar de su importancia en la fisiología del nódulo, poco se sabe acerca de las características bioquímicas y moleculares de la PEPC en este órgano. La PEPC de nódulos de frijol puede resolverse en tres isoformas por electroforesis nativa, una de estas isoenzimas (PEPC1) está presente únicamente en el nódulo, mientras que las otras dos (PEPC2 y PEPC3) también se encuentran en raíz (Deroche y Carrayol, 1989). En este trabajo se presentan resultados que indican que la PEPC de nódulos de frijol está constituida de diferentes polipéptidos, uno de los cuáles es el componente de la isoforma de nódulo PEPC1 y probablemente corresponda a un polipéptido específico de nódulo (Figuras 11 y 12), indicando que la PEPC puede ser una nódulina. Sin embargo se requiere de la caracterización molecular de la PEPC

de nódulos y de raíz por electroforesis en dos dimensiones y por inmunoprecipitación de los productos de traducción *in vitro*. Se han realizado experimentos de hibridación con RNA de diferentes tejidos de frijol, utilizando una sonda de cDNA de la forma fotosintética C<sub>4</sub> de PEPC de maíz (Hudspeth y Grula, 1989). Los resultados de estos experimentos (no mostrados) indican un mayor grado de homología del gen de maíz con los mensajeros de PEPC de hojas de frijol, que con los mensajeros de la PEPC de raíz ó nódulos; esto sugiere que la PEPC de tejido fotosintético de frijol es diferente a la PEPC de raíz y nódulo, lo que indica que la PEPC en frijol esta codificada por una familia de genes. Se ha demostrado que la PEPC está codificada por una familia de genes en maíz (Hudspeth y Grula, 1989), en Mesembryanthemum crystallinum (Cushman *et al.*, 1989) y también en especies de Flaveria C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub> (Hermans y Westhoff, 1990).

En este trabajo se encontraron diferencias en la composición de isoformas de PEPC entre nódulos de diferentes cepas de Rhizobium. Estas diferencias están representadas por las cepas CIAT899 y la SEMIA487. La actividad de la isoforma específica de nódulo PEPC1 en nódulos de Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli SEMIA 487 (Figura 9) es mayor que la actividad de esta isoforma en nódulos de Rhizobium tropici CIAT 899 (Figura 8). Los nódulos de las cepas de Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli CE3 y CFN037 muestran un patrón similar de isoformas de PEPC que la CIAT899, mientras que los nódulos de la CNPAF512 tienen un patrón de isoformas similar a los de la SEMIA487. Los resultados de este trabajo no indican una relación entre la actividad de la isoforma PEPC1 y una mayor eficiencia en fijación de nitrógeno, determinada como un mayor incremento en materia vegetal,

puesto que los nódulos de las cepas CIAT899 y CE3 presentan el mismo patrón de isoformas, mientras que se pueden observar diferencias significativas en las tasas de crecimiento de las plantas infectadas con estas dos cepas (Figura 1). El análisis de algunos atributos que definen la eficiencia en fijación de nitrógeno, ha demostrado que la cepa SEMIA 487 acumula más nitrógeno en tallos y frutos que otras cepas de Rhizobium (Hungria y Franco, 1988; Hungria y Neves, 1987). Esto se debe a una mayor eficiencia relativa (definida como la relación  $H_2$  liberado/ $C_2H_2$  reducido) de los nódulos, y un mayor porcentaje de nitrógeno transportado en forma de ureidos, en comparación con plantas infectadas con otras cepas (Hungria y Neves, 1986), y también se debe a una senescencia más tardía de los nódulos infectados con esta cepa. El papel de la isoforma específica del nódulo podría estar relacionado a diferentes estrategias metabólicas entre los distintos Rhizobium, relacionadas con una mayor eficiencia relativa ó una mayor tasa de síntesis de ureidos, ó con diferencias en el suministro de esqueletos de carbono al bacterioide.

La actividad de la PEPC se ve poco afectada por la fertilización con  $CO_2$ . (Figuras 15 y 17). Sin embargo, la actividad específica de PEPC es menor en los nódulos de la cepa CFN037 (Figura 17, 17 días), dado que la mayor actividad de nitrógenasa en los nódulos de la cepa CFN037 (Figura 14) sugiere un uso más eficiente del carbono por los bacteroides de la cepa CF037, la actividad de los nódulos de la cepa CFN037 estaría menos limitada por el fotosintato que los nódulos de la cepa CE3. Esto sería congruente con una menor actividad de asimilación de  $CO_2$  por PEPC en estos nódulos.

Los experimentos del efecto del  $CO_2$  sobre las isoformas de PEPC muestran

resultados contrastantes (Figura 19). A los 11 días se observa una inducción de la síntesis de la subunidad de la isoforma PEPC1 en los nódulos de la cepa CFN037 en ambas condiciones y en los nódulos de la CE3 en alto CO<sub>2</sub>, mientras que la subunidad de las isoformas PEPC2 y PEPC3 es más abundante en los nódulos de la CE3 en CO<sub>2</sub> normal. Por otro lado, la proporción de subunidades de las isoformas de PEPC se mantiene en los nódulos de la CE3 en CO<sub>2</sub> normal de los 11 a los 17 días, mientras que en los nódulos de la CFN037 y los de la CE3 en alto CO<sub>2</sub>, la el polipéptido de menor peso molecular, que correspondería al componente de las isoformas PEPC2 y PEPC3, es la subunidad prevalente. El análisis de los factores que regulan la actividad *in vitro* de la PEPC de nódulos de soya indican que la actividad de PEPC debe estar acoplada a la utilización de sacarosa para proveer de esqueletos de carbono al bacteroide y a la asimilación de amonio para reabastecer de intermediarios al ciclo de Krebs (Schuller *et al.*, 1990). Probablemente estas funciones específicas se lleven a cabo por diferentes isoformas de PEPC, lo que explicaría porqué se induce la síntesis del componente de la PEPC1 a los 11 días en los nódulos de la CFN037 y en los de la CE3 en alto CO<sub>2</sub>, mientras que su síntesis se mantiene únicamente en los nódulos de la CE3 en CO<sub>2</sub> normal a los 17 días (Figura 19). El efecto del CO<sub>2</sub> sobre las isoformas de PEPC tal vez pueda ser determinado más claramente utilizando otras cepa de Rhizobium, ya que los nódulos de las cepas CE3 y CFN037, con las cuáles se realizaron estos experimentos, tienen poca actividad de la isoforma PEPC1 en comparación con la actividad de la PEPC2. La purificación y la determinación de las características bioquímicas de cada una de las

isoformas de PEPC de nódulo permitirá entender el papel de las diferentes isoformas de esta enzima en el metabolismo general del nódulo.

### **Regulación de la GS en los nódulos de frijol.**

Durante los últimos años se ha realizado un progreso significativo en el conocimiento de la regulación de la expresión génica de la GS. Parte del trabajo se ha centrado en el análisis de la GS de nódulos, debido a su alto nivel de expresión y a su gran inducción durante la nodulación (Lea *et al.*, 1990). Las evidencias indican que en frijol, Rhizobium esta involucrado en la estimulación de la expresión específica de nódulo de la GS. La inducción inicial del polipéptido  $\gamma$  es independiente de la fijación de nitrógeno (Padilla *et al.*, 1987). Sin embargo, la expresión de *gln*  $\gamma$  es menor en nódulos de plantas infectadas con mutantes de Rhizobium Nod<sup>+</sup> Fix<sup>-</sup> y en nódulos Fix<sup>+</sup> cultivados en ausencia de nitrógeno atmosférico (Ar/O<sub>2</sub>), aún así, la expresión de *gln*  $\gamma$  se induce bastante en nódulos de las mutantes Fix<sup>-</sup> y en los nódulos cultivados en Ar/O<sub>2</sub>, con respecto a la expresión de *gln*  $\gamma$  en raíz (Cock *et al.*, 1990), indicando que la expresión inicial de *gln*  $\gamma$  se encuentra bajo un control de desarrollo. También en alfalfa, la expresión de la isoforma específica del nódulo puede ser detectada en nódulos infectados por bacterias Fix<sup>-</sup> con morfología normal (Dunn *et al.*, 1988). La penetración de la bacteria en las células infectadas y su diferenciación a bacteroides es la señal que inicia la expresión de la GS específica de nódulos de alfalfa (Norris *et al.*, 1988). En frijol, la inducción inicial de *gln*  $\gamma$  también parece requerir de la

penetración de la bacteria a las células infectadas, mientras que la inducción posterior de *gln*  $\gamma$  ha sido considerada como una respuesta secundaria que depende de la actividad de fijación de nitrógeno (Chen *et al.*, 1990; Cock *et al.*, 1990; Forde y Cullimore, 1989). La presencia de amonio derivado de la fijación de nitrógeno no parece ser un factor necesario para la inducción secundaria de la expresión de GS- $\gamma$  en los nódulos de frijol, ya que el amonio exógeno no incrementa la actividad de la GS- $\gamma$  en nódulos Fix- ó en nódulos cultivados en ausencia de nitrógeno atmosférico (Chen *et al.*, 1990). Los resultados de este trabajo demuestran además que la inducción de la expresión del polipéptido  $\gamma$  de la GS es independiente de la actividad de fijación de nitrógeno y por lo tanto, independiente de la presencia del amonio derivado de la fijación simbiótica. La fijación de nitrógeno en condiciones normales se requiere para incrementar y mantener la inducción de la GS- $\gamma$  en el nódulo (Chen *et al.*, 1990), sin embargo en alto CO<sub>2</sub>, la mayor actividad de fijación de nitrógeno parece reprimir la síntesis de GS- $\gamma$  (Figura 20). Por otro lado, también existen diferencias en la abundancia de la GS- $\gamma$  que probablemente estén relacionadas con una mayor eficiencia en fijación de nitrógeno: en condiciones normales de crecimiento, la expresión de la GS- $\gamma$  es mayor en los nódulos de Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli CFN037 que en los nódulos de la cepa CE3, a los 17 días después de la infección (Figura 20). Los nódulos de 17 días de plantas infectadas con Rhizobium tropici CIAT 899 cultivadas bajo las mismas condiciones

que las anteriores, muestran una relación  $\beta/\gamma$  aproximadamente 1:1 (datos no presentados), similar a los nódulos de la cepa CFN 037. Se ha demostrado que la actividad de las isoformas de GS ya no aumenta más a partir del día 17 después de la infección (Chen *et al.*, 1990), por lo que estos resultados reflejan los niveles máximos de expresión que puede alcanzar el polipéptido  $\gamma$  en las diferentes cepas de Rhizobium analizadas.

Los resultados en frijol están en marcado contraste con lo que ocurre en nódulos de soya. En soya, la ausencia de fijación de nitrógeno suprime la transcripción del mensajero de GS de nódulos (Hirel *et al.*, 1987). A diferencia de lo que ocurre en frijol, en estas plantas el amonio exógeno induce la expresión del mRNA de GS en nódulos Fix<sup>-</sup>, y en nódulos cultivados en ausencia de nitrógeno atmosférico (Hirel *et al.*, 1987). Por otro lado, la presencia de amonio en el medio induce la expresión de  $\beta$ -glucuronidasa bajo el promotor de GS de soya en nódulos de plantas transgénicas de Lotus corniculatus (Miao *et al.*, 1991). Esto indica diferencias en los mecanismos de regulación de la expresión de GS en nódulos de plantas de diferentes especies. Las diferencias en expresión de la GS en nódulos de frijol y de soya no se deben al tipo de morfología del nódulo, ya que ambas plantas poseen nódulos determinados, ni a diferencias en el metabolismo de los nódulos, ya que soya y frijol sintetizan ureidos como productos de la fijación de nitrógeno. Es interesante resaltar que en soya, lo mismo que en chícharo, un productor de amidas, no hay evidencias de un gen de GS específico de nódulo (Hirel *et al.*, 1987; Miao *et al.*, 1991; Tingey *et al.*, 1988), mientras que frijol y alfalfa, que transportan ureidos y amidas respectivamente,

poseen una GS expresada específicamente en el nódulo (Chen y Cullimore, 1989; Dunn *et al.*, 1988), tal vez las diferencias en regulación de GS entre frijol y soya se deban entre otros factores a la presencia ó no de un gen específico de nódulo.

Numerosos estudios han evaluado el papel funcional de la isoforma específica de nódulo en frijol. El análisis de la de la expresión de isoformas de GS en nódulos (Bennett y Cullimore, 1989; Chen *et al.*, 1990; Lara *et al.*, 1983; Lara *et al.*, 1984), de la expresión de los polipéptidos y de los mensajeros de GS en el nódulo (Bennet *et al.*, 1989; Padilla *et al.*, 1987), así como de la localización de las isoformas de GS en el nódulo (Chen y Cullimore, 1989) y de actividad de los promotores de *gln β* y *gln γ* en nódulos de plantas transgénicas (Forde *et al.*, 1989) han llevado a la conclusión de que la GS- $\gamma$  es responsable de la asimilación del amonio derivado de la fijación de nitrógeno. Los resultados de este trabajo demuestran que la GS- $\gamma$  no se requiere para la asimilación del amonio derivado de la fijación de nitrógeno (Figura 20). La isoforma constitutiva de GS (GS- $\beta$ ) es capaz de asimilar el amonio que se produce, aún en condiciones de mayor fijación de nitrógeno, como sucede en alto CO<sub>2</sub> (Figura 11), sin que haya una diferencia significativa en la actividad específica de GS. La similitud en las actividades específicas a los 17 días de la infección (Figuras 16 y 18), sugiere que debe haber una mayor síntesis de GS- $\beta$  en nódulos en alto CO<sub>2</sub> con respecto a nódulos en CO<sub>2</sub> normal. Aunque en general las evidencias indican que en frijol la expresión de los mensajeros de los diferentes genes de GS no se induce por la presencia de amonio exógeno (Cock *et al.*, 1990), en nódulos infectados con la

cepa de Rhizobium phaseoli CE108 (una mutante Fix<sup>-</sup> Nod<sup>+</sup> derivada de la CE3, que produce nódulos con morfología normal), la adición de amonio externo induce la expresión de *gln β* en un 100% (Cock *et al.*, 1990). Si hay una inducción de GS-β en nódulos crecidos en alto CO<sub>2</sub>, es posible que se deba al amonio derivado de la fijación de nitrógeno.

Los resultados de este trabajo permiten afirmar que además de los factores específicos de desarrollo, que controlan la expresión de GS-β y GS-γ en el nódulo, existen factores no relacionados directamente de la actividad de fijación de nitrógeno, sino que dependen del estado metabólico del nódulo. En chícharo, por ejemplo, se ha encontrado que las condiciones de fotorrespiración de las hojas inducen la expresión del mensajero de la GS<sub>2</sub> cloroplástica, pero no afectan la expresión del mRNA de la GS citoplásmica (Edwards y Coruzzi, 1989); indicando que las condiciones metabólicas pueden afectar la abundancia de las diferentes isoformas de GS.

La disponibilidad del fotosintato en los nódulos podría ser un factor determinante en la regulación de la expresión de GS. El efecto de la concentración de CO<sub>2</sub> sobre el crecimiento de las plantas y sobre la fijación de nitrógeno (Figuras 13 y 14) indica, como se ha sugerido en otros estudios (Murphy, 1986; Phillips *et al.*, 1976), que en frijol la actividad del nódulo esta limitada por el flujo de carbono. El mayor aporte de fotosintato hacia el nódulo en condiciones de alto CO<sub>2</sub> produciría una mayor proporción carbono/nitrógeno. Situaciones similares, relacionadas con la expresión de GS-γ, ocurrirían en nódulos Fix<sup>-</sup> y en nódulos Fix<sup>+</sup> cultivados en ausencia de nitrógeno atmosférico (Cock *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1990). En estos nódulos, al igual

que en alto CO<sub>2</sub>, habría una mayor relación C/N, debido a la ausencia de actividad de nitrógenasa. El balance C/N en el nódulo probablemente sea el factor determinante en la regulación de la expresión de las isoformas de GS. La mayor proporción C/N estaría relacionada con una considerable disminución en la expresión de GS- $\gamma$ . Esto podría explicar porque la expresión de *gln*  $\beta$  se induce por amonio en nódulos Fix- de la cepa CE108 y no en otras condiciones (Cock *et al.*, 1990).

La determinación de las características cinéticas de las isoformas de GS de nódulos ha mostrado que la GS- $\gamma$  (GS<sub>n-1</sub>) tiene una menor afinidad por el amonio y el glutámico, y una mayor afinidad por el ATP, en comparación a la GS- $\beta$  (GS<sub>n-2</sub>) (Cullimore *et al.*, 1983). Estas características de la GS- $\gamma$  serían más apropiadas para la asimilación de un exceso de amonio en condiciones de limitación de carbono, la condición normal del nódulo. En cambio, la actividad de la GS- $\beta$ , con una mayor afinidad por el amonio y el glutámico, y menor afinidad por el ATP, sería más apropiada para la asimilación de amonio en alto CO<sub>2</sub>, donde habría una mayor carga energética (relación ATP/ADP) debido al exceso de carbono, y las concentraciones de amonio podrían ser limitantes para la actividad de GS.

Se ha demostrado que el promotor de *gln* $\beta$  se expresa en el tejido vascular del nódulo (Forde *et al.*, 1989); es probable que la expresión de GS- $\beta$  en alto CO<sub>2</sub> deba compensar la ausencia de GS- $\gamma$  en las células infectadas de los nódulos cultivados en alto CO<sub>2</sub>, para asimilar el amonio derivado de la fijación de nitrógeno. Las

diferencias en actividad específica de la GS de nódulos en alto CO<sub>2</sub> y en CO<sub>2</sub> normal (Figuras 16 y 18) no indican una mayor asimilación de amonio en nódulos de plantas cultivadas en alto CO<sub>2</sub>. Sin embargo, los nódulos de plantas cultivadas en CO<sub>2</sub> normal acumulan más  $\alpha$ -cetoglutarato ( $4.73 \pm 0.38$   $\eta$ mol mg peso de nódulos<sup>-1</sup>) que los nódulos de plantas cultivadas en alto CO<sub>2</sub> ( $2.62 \pm 0.47$   $\eta$ mol mg peso de nódulos<sup>-1</sup>). La menor concentración de  $\alpha$ -cetoglutarato encontrada en los nódulos de plantas cultivadas en alto CO<sub>2</sub> sugiere un consumo más rápido debido a una mayor actividad de asimilación de nitrógeno por la vía GS/GOGAT, que en los nódulos de plantas cultivadas en CO<sub>2</sub> normal. Algunos estudios han sugerido que la actividad de GS puede ser un factor limitante de la fijación de nitrógeno (Pacovsky y Fuller, 1991; Pacovsky y Hungría, 1991). Esta sugerencia presupone que la baja relación transferasa/sintetasa de la GS en los nódulos de frijol indica que la GS del nódulo está funcionando a su nivel máximo. En este sentido, la actividad de la GS- $\beta$  sería más eficiente para la asimilación del amonio de la fijación de nitrógeno puesto que la relación transferasa/sintetasa de la GS- $\beta$  (GS<sub>n-2</sub>) es mayor que la GS- $\gamma$  (GS<sub>n-1</sub>) (Cullimore *et al.*, 1983). Sin embargo, el significado fisiológico de la relación transferasa/sintetasa no es claro, a pesar de que los cambios en esta relación parecen afectar los niveles de asimilación de amonio (Sims *et al.*, 1974). Los resultados de este trabajo no parecen apoyar la idea de que la actividad de la GS sea un factor limitante de la fijación de nitrógeno. Es probable que la actividad de la GOGAT desempeñe un papel clave en la regulación de asimilación de amonio en los

nódulos en condiciones de alto CO<sub>2</sub>.

Durante el análisis de la expresión de la GS en los diferentes tejidos de frijol (Bennett *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 1990; Ortega *et al.*, 1986; Padilla *et al.*, 1987), se ha encontrado que los cambios en las diferentes isoformas de GS siguen a cambios en la expresión de los diferentes mensajeros de GS. A partir de estos estudios se puede concluir que la regulación de la GS es principalmente a nivel transcripcional. Las diferencias encontradas en la expresión de las isoformas de GS en nódulos de plantas cultivadas en alto CO<sub>2</sub> probablemente también sean resultado de su regulación a nivel transcripcional. Sin embargo, no se puede descartar un control postranscripcional como diferencias en la estabilidad del mensajero de *gln*  $\gamma$  ó un tasa más rápida de recambio del polipéptido  $\gamma$ ; se requiere del análisis a nivel de expresión génica y de mRNA utilizando sondas específicas para *gln*  $\beta$  y *gln*  $\gamma$ . El análisis de la región del promotor de *gln*  $\gamma$  por experimentos de retardación en geles, usando extractos crudos de nucleos de raíz y nódulos, ha demostrado la presencia de dos regiones que contienen sitios de unión a proteínas, una región proximal que interactúa con múltiples factores tanto de raíz como nódulos, y una región distal que une a un factor presente en nucleos de raíz pero no de nódulos (Forde *et al.*, 1990), lo que podría sugerir mecanismos tanto de activación como de represión de *gln*  $\gamma$  en el nódulo. El análisis de factores que interaccionan con el promotor de *gln*  $\gamma$  a partir de extractos de nucleos provenientes de nódulos cultivados en diferentes condiciones de CO<sub>2</sub> podría ser útil para establecer los mecanismos moleculares de regulación de la

expresión de GS. Probablemente, los factores que inhiben o afectan la actividad de la GS *in vitro*, como aminoácidos, nucleótidos y la carga energética (Stewart *et al.*, 1980), también contribuyan a la regulación de la expresión de las isoformas de GS en el nódulo. Un análisis más detallado de las concentraciones de otros metabolitos en el nódulo, como glutámico, glutamina, ATP, ADP; así como de las actividades de otras enzimas como GOGAT, utilizando las estrategias seguidas en este trabajo, contribuya posiblemente a establecer un esquema metabólico que permita explicar los mecanismos de regulación de las isoformas de GS en el nódulo.

## CONCLUSIONES

Se encontraron diferencias en actividad de PEPC y GS del nódulo que pueden relacionarse con un mayor incremento en materia vegetal. Las cepas más eficientes en simbiosis presentan mayor actividad de PEPC y GS en los nódulos, las diferencias son más marcadas en actividad de PEPC.

La PEPC en nódulos de frijol está constituida de diferentes subunidades polipeptídicas con ligeras diferencias movilidad electroforética. Las subunidades de la isoforma PEPC1 tienen un mayor peso molecular que las subunidades de las isoformas PEPC2 y PEPC3.

Se encontraron diferencias en el patrón de isoformas de PEPC en nódulos de frijol infectados con diferentes cepas de Rhizobium. En las cepas CIAT899, CE3 y CFN037 la isoforma PEPC2 es la más abundante; mientras que en las cepas CNPAF512 y SEMIA487, la isoforma específica de nódulo PEPC1 y la isoforma PEPC2 se encuentran en la misma proporción. Esto probablemente se relacione con diferencias importantes en el metabolismo de los nódulos infectados con distintas cepas.

La fertilización con CO<sub>2</sub> incrementa la actividad de fijación de nitrógeno y las tasas de crecimiento vegetal, indicando que en frijol la actividad del nódulo está limitada por el flujo de carbono.

La actividad específica de la GS no se afecta por la fertilización con CO<sub>2</sub>, sin embargo la síntesis del polipéptido y de la GS se ve significativamente reducida en

alto  $\text{CO}_2$ .

La actividad de fijación de nitrógeno y el amonio derivado de ésta no son por si mismos factores determinantes en la regulación de GS- $\gamma$ . La proporción carbono/nitrógeno en el nódulo parece ser el factor importante que regula la expresión de GS- $\gamma$ .

\* Parte de los resultados de este trabajo fueron publicados en la revista Plant Physiology del mes de Febrero de 1992.

## REFERENCIAS

- Bennett M J, D A Lightfoot, J V Cullimore (1989) cDNA sequence and differential expression of the gene encoding the glutamine synthetase  $\gamma$  polipeptide of Phaseolus vulgaris L. *Plant Mol Biol* 12: 553-565.
- Bennet M J, J V Cullimore (1989) Glutamine synthetase isoenzymes of Phaseolus vulgaris L: subunit composition in developing roots nodules and plumules. *Planta* 179: 433-440.
- Bradford M M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-258.
- Bhuvaneswari T V, G B Turgeon, W D Bauer (1980) Early events in the infection of soybean (Glycine max L. Merr). *Plant Physiol* 66: 1027-1031.
- Blevins D G (1989) An overview of nitrogen metabolism in higher plants. *In*: Poulton J E, J T Romeo, E E Conn (eds) *Plant nitrogen metabolism*. pp 1-41. Plenum Publishing Corp. New York.
- Cai X, P P Wong (1989) Subunit composition of glutamine synthetase isozymes from root nodules of bean (Phaseolus vulgaris L). *Plant Physiol* 91: 1056-1062.
- Calvert H E, M K Pence, M Pierce, N S A Malik, W D Bauer (1984) Anatomical analysis of the development and distribution of Rhizobium infections in soybean roots. *Can J Bot* 62: 2375-2384.
- Cock J M, R M Mould, M J Bennett, J V Cullimore (1990) Expression of glutamine synthetase genes in roots and nodules of Phaseolus vulgaris following changes in the ammonium supply and infection with various Rhizobium mutants. *Plant Mol Biol* 14: 549-560.
- Cullimore J V, Bennett M J (1988) The molecular biology and biochemistry of plant glutamine synthetase from root nodules of Phaseolus vulgaris L and other legumes. *J Plant Physiol* 132: 387-393.
- Cullimore J V, C Gebhardt, R Saarelainen, B J Millin, K B Idler, R F Barker (1984) Glutamine synthetase of Phaseolus vulgaris L: organ-specific expression of a multigene family. *J Mol App Genet* 2: 589-599.
- Cullimore J V, M Lara, P J Lea, B J Millin (1983) Purification and properties of two forms of glutamine synthetase from the plant fraction of Phaseolus root nodules. *Planta* 157: 245-253.
- Cushman J C, G Meyer, C B Michalowski, J M Schmitt, H J Bohnert (1989) Salt stress leads to differential expression of two isogenes of phosphoenolpyruvate carboxylase during crassulacean acid metabolism induction in the common ice plant. *Plant Cell* 1: 715-725.
- Chen F L, M J Bennett, J V Cullimore (1990) Effect of the nitrogen supply on the activities of isoenzymes of NADH dependent glutamate synthase and glutamine synthetase in root nodules of Phaseolus vulgaris L. *J Exp Bot* 41: 1215-1221.

- Chen F L, J V Cullimore (1988) Two isoenzymes of NADH-dependent glutamate synthase in root nodules of Phaseolus vulgaris L. *Plant Physiol* 88: 1411-1417.
- Chen F L, J V Cullimore (1989) Location of two isoenzymes of NADH-dependent glutamate synthase in root nodules of Phaseolus vulgaris L. *Planta* 179: 441-447.
- Deroche M E, E Carrayol (1988) Nodule phosphoenolpyruvate carboxylase: a review. *Physiol Plant* 74: 775-782.
- Deroche M E, E Carrayol (1989) Some properties of legume nodule phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol Biochem* 27: 379-386.
- Deroche M E, E Carrayol, E Jollivet (1983) Phosphoenolpyruvate carboxylase in legume nodules. *Physiol Veg* 21: 1075-1081.
- Diaz C L, L S Melchers, P J J Hooykas, B J J Lugtenberg, J W Kijne (1989) Root lectin as a determinant of the host-plant specificity in the Rhizobium legume symbiosis. *Nature* 338: 579-582.
- Dunn K, R Dickstein, R Feinbaum, B K Burnett, T K Peterman, G Thoidis, H M Goodman, F M Ausubel (1988) developmental regulation of nodule-specific genes in alfalfa root nodules. *Mol Plant-microbe Interact* 1: 66-74.
- Edwards J W, G M Coruzzi (1989) Photorespiration and light act in concert to regulate the expression of the nuclear gene for chloroplast glutamine synthetase. *Plant Cell* 1: 241-248
- Edwards J W, E L Walker, G M Coruzzi (1990) Cell specific expression in transgenic plants reveals nonoverlapping roles for chloroplast and cytosolic glutamine synthetase. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 3459-3463.
- Farnham M W, S M Griffith, S S Miller, C P Vance (1990) Aspartate aminotransferase in alfalfa root nodules: genotypic and tissue expression of aspartate amino transferase in alfalfa and other species. *Plant Physiol* 94: 1634-1640.
- Ferguson A R, A P Sims (1974) The regulation of glutamine metabolism in Candida utilis: the role of glutamine in the control of glutamine synthetase. *J Gen Microbiol* 80: 159-171.
- Forde B G, J V Cullimore (1989) The molecular biology of glutamine synthetase in higher plants. *In: Millin B J (ed): Oxford surveys of plant molecular and cell biology.* pp 246-296. Oxford University Press, Oxford.
- Forde B G, H M Day, J F Turton, W J Shen, J V Cullimore, J E Oliver (1989) Two glutamine synthetase genes from Phaseolus vulgaris L display contrasting developmental and spatial patterns of expression in transgenic Lotus corniculatus plants. *Plant Cell* 1: 391-401.
- Forde B G, J Freeman, J E Oliver, M Pineda (1990) Nuclear factors interact with conserved A/T-rich elements upstream of a nodule-enhanced glutamine synthetase gene from french bean. *Plant Cell* 2: 925-939.
- Franssen H J, J P Nap, T Gloude-mans, W Stiekema, H Van Dam, F Govers, J Louwerse, A Van Kammen, T Bisseling (1987) Characterization of cDNA for nodulin-75 of soybean: a gene product involved in early stages of root nodule development. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 4495-4499.

- Gadal P (1983) Phosphoenolpyruvate carboxylase and nitrogen fixation. *Physiol Veg* 21: 1069-1074.
- Gebhardt C, J E Oliver, B G Forde, R Saarelainen, B J Millin (1986) Primary structure and differential expression of glutamine synthetase genes in nodules roots and leaves of Phaseolus vulgaris. *EMBO J* 5: 1429-1435.
- Govers F, J P Nap, M Moerman, H J Franssen, A Van Kammen, T Bisseling (1987) cDNA cloning and developmental expression of pea nodulin genes. *Plant Mol Biol* 8: 425-435.
- Hardy R W F, U D Havelka (1975) Photosynthate as a major factor limiting N<sub>2</sub> fixation by field-grown legumes with emphasis on soybeans. *In*: P S Nutman (ed): Symbiotic nitrogen fixation in plants. pp 421-439. Cambridge University Press. London.
- Hermans J, P Westhoff (1990) Analysis of expression and evolutionary relationships of phosphoenolpyruvate carboxylase genes in Flaveria trinervia (C<sub>4</sub>) and E. pringlei (C<sub>3</sub>). *Mol Gen Genet* 224: 459-468.
- Hirel B, C Bouet, B King, D Layzell, F Jacobs, D P S Verma (1987) Glutamine synthetase genes are regulated by ammonia provided externally or by symbiotic nitrogen fixation. *EMBO J* 6: 1167-1171.
- Hirel B, S F Mc Nally, P Gadal, N Sumar, G R Stewart (1984) Cytosolic glutamine synthetase in higher plants: a comparative immunological study. *Eur J Biochem* 138: 63-66.
- Hudspeth R L, J W Guala (1989) Structure and expression of the maize gene encoding the phosphoenolpyruvate carboxylase isozyme involved in C<sub>4</sub> photosynthesis. *Plant Mol Biol* 12: 579-589.
- Hungria M, C A A Barradas, R M Wallsgrave (1991) Nitrogen fixation, assimilation and transport during the initial growth stage of Phaseolus vulgaris L. *J Exp Bot* 240: 839-844.
- Hungria M, A A Franco (1988) Nodule senescence in Phaseolus vulgaris L. *Trop Agric* 65: 341-346.
- Hungria M, M C P Neves (1986) Interacao entre cultivares de Phaseolus vulgaris e estirpes de Rhizobium na fixacao e transporte do nitrogenio. *Pesq Agropec Bras* 21: 127-140.
- Hungria M, M C P Neves (1987) Cultivar and Rhizobium strain effect on nitrogen fixation and transport in Phaseolus vulgaris L. (1987) *Plant Soil* 103: 111-121.
- Jacobs F A, M Zhang, M G Fortin, D P S Verma (1987) Several nodulins of soybean share structural domains but differ in their subcellular locations. *Nucl Acids Res* 15: 1271-1280.
- King B J, D B Layzell, D T Canvin (1986) The role of dark carbon dioxide fixation in root nodules of soybean. *Plant Physiol* 81: 200-205.
- Kohl D H, K R Schubert, M B Carter, C H Hagedorn, G Shearer (1988) Proline metabolism in N<sub>2</sub>-fixing root nodules: Energy transfer and regulation of purine synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 2036-2040.

Latzko E, G J Kelly (1983) The many-faceted function of phosphoenolpyruvate carboxylase in C<sub>3</sub> plants. *Physiol Veg* 21: 805-815.

Laemmli U K (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lara M, J V Cullimore, P J Lea, B J Millin, A W B Johnston, J W Lamb (1983) Appearance of a novel form of plant glutamine synthetase during nodule development in Phaseolus vulgaris L. *Planta* 157: 254-258.

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

Lea P J, S A Robinson, G R Stewart (1990) The enzymology and metabolism of glutamine, glutamate and asparagine. In: B J Millin, P J Lea (eds): *The biochemistry of plants*. vol 16. pp 89- Academic Press. San Diego.

Lee J S, D P S Verma (1984) Structure and chromosomal arrangement of leghemoglobin genes in kidney bean suggest divergence in soybean leghemoglobin gene loci following tetraploidization. *EMBO J* 12: 2745-2752.

Legocki R P, D P S Verma (1980) Identification of nodule-specific host proteins (nodulins) involved in the development of Rhizobium-legume symbiosis. *Cell* 20: 153-163.

Lerouge P, P Roche, C Faucher, F Maillet, G Truchet, J C Promé, J Dénarié (1990) Symbiotic host-specificity of Rhizobium meliloti is determined by a sulphated and acetylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 344: 781

Lightfoot D A, N K Green, J V Cullimore (1988) The chloroplast located glutamine synthetase of Phaseolus vulgaris L: nucleotide sequence, expression in different organs and uptake into isolated chloroplasts. *Plant Mol Biol* 11: 191-202.

Marczewski W (1989) Kinetic properties of phosphoenolpyruvate carboxylase from lupin nodules and roots. *Physiol Plant* 76: 539-543.

Martinez-Romero E, L Segovia, F M Mercante, A A Franco, P Graham, M A Pardo (1991) Rhizobium tropici, a novel species nodulating Phaseolus vulgaris L. beans and Leucaena sp trees. *Int J Sys Bacteriol* 41: 417-426.

Masterson C L, M T Sherwood (1978) Some effects of increased atmospheric carbon dioxide on white clover (Trifolium repens) and pea (Pisum sativum). *Plant Soil* 49: 421-426.

Mc Nally S, B Hirel (1983) Glutamine synthetase isoforms in higher plants. *Physiol Veg* 21: 761-774.

Mellor R B, D Werner (1987) Peribacteroidal membrane biogenesis in mature legume root nodules. *Symbiosis* 3: 75-100.

Miao G H, B Hirel, M C Marsollier, R W Ridge, D P S Verma (1991) Ammonia-regulated expression of a soybean gene encoding cytosolic glutamine synthetase in transgenic Lotus corniculatus. *Plant Cell* 3: 11-22.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA 79

- Millin B J, P J Lea (1980) Ammonia assimilation. *In*: B J Millin (ed): The biochemistry of plants. vol 5. pp 169-202. Academic Press, New York.
- Miller S S, K L M Boylan, C P Vance (1987) Alfalfa root nodule carbon dioxide fixation: immunological studies of nodule phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol* 84: 501-508.
- Minchin F R, J S Pate (1973) The carbon balance of a legume and the functional economy of its root nodules. *J Exp Bot* 24: 259-271
- Morrison N, D P S Verma (1987) A block in the endocytosis of Rhizobium allows cellular differentiation in nodules but affects the expression of some peribacteroid membrane nodulins. *Plant Mol Biol* 9: 185-196.
- Murphy P M (1986) Effect of light and atmospheric carbon dioxide concentration on nitrogen fixation by herbage legumes. *Plant Soil* 95: 399-409.
- Nap J P, Bisseling T (1990a) Developmental biology of a plant-prokaryote symbiosis: the legume root nodule. *Science* 250: 948-954.
- Nap J P, Bisseling T (1990b) Nodulins and nodulin gene regulation in root nodule development: overview and discussion. *In*: P M Gresshoff (ed): Molecular biology of symbiotic nitrogen fixation, pp 181-229. CRC Press. Boca Raton FL.
- Nato F, B Hirel, A Nato, P Gadal (1984) Chloroplastic glutamine synthetase from tobacco leaves: a glycosylated protein. *FEBS Lett* 175: 442-446.
- Newcomb E H, S R Tandon (1981) Uninfected cells of soybean root nodules: ultrastructure suggests key role in ureide production. *Science* 212: 1394-1396.
- Nguyen T, M Zelechowska, V Foster, H Bergmann, D P S Verma (1985) Primary structure of the soybean nodulin-35 gene encoding uricase II localized in the peroxisomes of the infected cells of nodules. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 5040-5044.
- Noel K D, A Sánchez, L Fernández, J Leemans, M A Cevallos (1984) Rhizobium phaseoli symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. *J Bacteriol* 158: 148-155.
- Norris J H, L A Macol, A M Hirsch, (1988) Nodulin gene expression in effective alfalfa nodules and in nodules arrested at three different stages of development. *Plant Physiol* 88: 321-328.
- O'Farrell P. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250: 4007-4021.
- Ogren W L (1984) Photorespiration: pathways regulation and modification. *Ann Rev Plant Physiol* 35: 415-442.
- Ortega J L (1988) Tesis de maestría en investigación biomédica básica. UACPyP CCH, UNAM.
- Ortega J L, F Campos, F Sánchez, M Lara (1986) Expression of two different glutamine synthetase polypeptides during root development in Phaseolus vulgaris L. *Plant Physiol* 80: 1051-1054.

Pacovsky R S, G Fuller (1991) Nitrogen assimilation and partitioning in two nitrogen fixing cultivars of Phaseolus vulgaris L. *Plant Soil* 132: 139-148.

Pacovsky R S, M Hungria (1990) Glutamine syntetase may limit nitrogen fixation in Phaseolus vulgaris. *In*: P M Greshoff, E Rolh, G Stacey, W E Newton (eds): Nitrogen fixation: achievements and objectives. pp 359. Chapman and Hall. New York.

Padilla J E, F Campos, V Conde, M Lara, F Sánchez (1987) Nodule-specific glutamine synthetase is expressed before the onset of nitrogen fixation in Phaseolus vulgaris L. *Plant Mol Biol* 9: 65-74.

Pate J S, D B Layzell (1990) Energetics and biological costs of nitrogen assimilation. *In*: B J Millin, P J Lea (eds) *The biochemistry of plants*. vol 16. pp 1-42. Academic Press. San Diego.

Perrot-Rechenmann C, J Vidal, J Bruffert, A Buret, P Gadal (1982) A comparative immunocytochemical localization study of phosphoenolpyruvate carboxylase in leaves of higher plants. *Planta* 155: 24-30.

Phillips D A, K D Newell, S A Hassell, C E Felling (1976) The effect of CO<sub>2</sub> enrichment on root nodule development and symbiotic N<sub>2</sub> reduction in Pisum sativum L. *Am J Bot* 63: 356-362.

Rosendahl L, C P Vance, W D Pedersen (1990) Products of dark CO<sub>2</sub> fixation in pea root nodules support bacteroid metabolism. *Plant Physiol* 93: 12-19.

Sánchez F, F Campos, J Padilla, J M Bonneville, C Enriquez, D Caput (1987) Purification cDNA cloning and developmental expression of the nodule-specific uricase from Phaseolus vulgaris L. *Plant Physiol* 84: 1143-1147.

Sánchez F, J E Padilla, H Pérez, M Lara (1991) Control of nodulin genes in root-nodule development and metabolism. *In*: B J Millin, P J Lea (eds): *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42: 507-527.

Schubert, K R (1986) Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis transport and metabolism. *Ann Rev Plant Physiol* 37: 539-574.

Schubert K R, M J Boland (1990) The ureides. *In*: B J Millin, P J Lea (eds): *The biochemistry of plants*. vol 16. pp 197-282. Academic Press. San Diego.

Schuller K A, D H Turpin, W C Plaxton (1990) Metabolite regulation of partially purified soybean nodule phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol* 94: 1429-1435.

Sims A P, J Trone, V Box (1974) The regulation of glutamine synthesis in the food yeast Candida utilis: the purification and subunit structure of glutamine synthetase and aspects of enzyme deactivation. *J Gen Microbiol* 80: 485-499.

Soberón M, J Membrillo Hernández, G R Aguilar, F Sánchez (1990) Isolation of Rhizobium phaseoli Tn5-induced mutants with altered expression of cytochrome terminal oxidase *o* and *aa<sub>3</sub>*. *J Bacteriol* 172: 1676-1680.

Stewart G R, A F Mann, P A Fentem (1980) Enzymes of glutamate formation *In*: B J Millin (ed): *The biochemistry of plants*, Vol. 5. pp 271-327. Academic Press, New York.

- Swarup R, M J Bennett, J V Cullimore (1990) Expression of glutamine synthetase genes in cotyledons of germinating Phaseolus vulgaris L. *Planta* 183: 51-56.
- Thummler F, D P S Verma (1987) Nodulin 100 of soybean is the subunit of sucrose synthase regulated by the availability of free heme in nodules. *J Biol Chem* 262: 14730-14736.
- Tingey S V, F Y Tsai, J W Edwards, E L Walker, G M Coruzzi (1988) Chloroplast and cytosolic glutamine synthetases are encoded by homologous nuclear genes which are differentially expressed *in vivo*. *J Biol Chem* 263: 9651-9657.
- Tingey S V, E L Walker, G M Coruzzi (1987) Glutamine synthetase genes of pea encode distinct polypeptides which are differentially expressed in leaves roots and nodules. *EMBO J* 6: 1-9.
- Towbin H, T Staehelin, J Gordon (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheet: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350-4354.
- Van Kammen A (1984) Suggested nomenclature for plant genes involved in nodulation and symbiosis. *Plant Mol Biol Rep* 2: 43-45.
- Vance C P (1990) Symbiotic nitrogen fixation: Recent genetics advances. *In*: B J Millin, P J Lea (eds): *The biochemistry of plants*. vol 16. pp 43-48. Academic Press. San Diego.
- Vance C P, G H Heichel (1991) Carbon in N<sub>2</sub> fixation: limitation or exquisite adaptation. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42: 373-392.
- Vance C P, Stade S (1984) Alfalfa root nodule carbon dioxide fixation: partial purification and characterization of root nodule phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol* 75:261-264.
- Vanlerberghe G C, K A Schuller, R G Smith, R Fell, W C Plaxton, D H Turpin (1990) Relationship between NH<sub>4</sub><sup>+</sup> assimilation rate and *in vivo* phosphoenolpyruvate carboxylase activity. *Plant Physiol* 94: 284-290.
- Verma D P S, M G Fortin, J Stanley, V P Mauro, S Purohit, N Morrison (1986) Nodulins and nodulin genes of Glycine max: a perspective. *Plant Mol Biol* 7: 51-61.
- Verma D P S, G H Miao, C I Cheon, H Suzuki (1991) Genesis of root nodules and function of nodulins. *In*: H Hennecke, D P S Verma (eds): *Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions*. vol 1. pp 291-299. Kluwer Academic Press. The Netherlands.
- Vezina L P, H J Hope, K W Joy (1987) Isoenzymes of glutamine synthetase in roots of pea (Pisum sativum L cv little Marvel) and alfalfa (Medicago media Pers cv Saraniac). *Plant Physiol* 83: 58-62.
- Vidal J, G Cavalié (1974) Mise en évidence de formes isofonctionnelles de la PEP carboxylase chez Phaseolus vulgaris L. *Physiol Veg* 12: 175-188.
- Wallsgrave R M, J C Turner, N P Hall, A C Kendall, S W J Bright (1987) Barley mutants lacking chloroplast glutamine synthetase-biochemical and genetic analysis. *Plant Physiol* 83: 155-158.

Warembourg F R, C Romet (1989) Why and how to estimate the cost of symbiotic N<sub>2</sub> fixation? a progressive approach based on the use of <sup>14</sup>C and <sup>15</sup>N isotopes. Plant Soil 115: 167-177.

## Regulation of Nodule Glutamine Synthetase by CO<sub>2</sub> Levels in Bean (*Phaseolus vulgaris* L.)<sup>1</sup>

José-Luis Ortega, Federico Sánchez, Mario Soberón, and Miguel Lara Flores\*

Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 2-246, Cuernavaca, Mor. México

### ABSTRACT

Nodulated bean (*Phaseolus vulgaris*) plants were grown for 17 days after infection in normal (0.02%) CO<sub>2</sub> and from day 8 to 17 in high (0.1%) CO<sub>2</sub> in order to increase nitrogen fixation and define how nodule glutamine synthetase (GS) isoforms are regulated by the ammonia derived from the bacteroid. Nitrogenase activity was detected by day 10, and by day 17 activity was over twofold higher in 0.1% of CO<sub>2</sub> compared with plants grown in 0.02% CO<sub>2</sub> and inoculated with *Rhizobium* wild-type strain CE3. Likewise, plant fresh weight increased in response to increased CO<sub>2</sub>, particularly in plants inoculated with the *Rhizobium phaseoli* mutant strain CFN037. Glutamine synthetase specific activity increased 2.5- to 6.5-fold from day 11 to 17. However, increased CO<sub>2</sub> did not appear to have an effect on GS specific activity. Analysis of the nodule GS polypeptide composition revealed that the  $\gamma$  polypeptide was significantly reduced in response to high CO<sub>2</sub>, whereas the  $\beta$  polypeptide was not affected. The significance of this result in relation to the regulation of GS isoforms and their role in the assimilation of ammonia in the nodule is discussed in this paper.

GS<sup>2</sup> in bean (*Phaseolus vulgaris*) root-nodules is expressed as two different isoforms designated GS<sub>n-1</sub> and GS<sub>n-2</sub> (3). GS<sub>n-1</sub> is expressed during nodule development concomitantly with nitrogenase activity (8). The nodule GS<sub>n-1</sub> is composed of a polypeptide called  $\gamma$ , and the GS<sub>n-2</sub> isoform is composed of the  $\beta$  polypeptide, which is also expressed in roots and leaves (9). Initial expression of GS- $\gamma$  polypeptide, as other nodulins (5), is independent of nitrogenase activity (12), but its optimal induction requires normal nitrogen fixation. Studies on the expression of the  $\gamma$  (Gln- $\gamma$ ) and  $\beta$  (Gln- $\beta$ ) GS genes in *Lotus corniculatus* transgenic plants demonstrated that Gln- $\gamma$  is expressed in the infected zone of mature nodules where ammonia assimilation takes place, and Gln- $\beta$  is expressed in the nodule cortex (7). These results indicate that the GS<sub>n-1</sub> ( $\gamma$ ) is responsible for the ammonia assimilation in bean nodules. Furthermore, in bean plants grown in argon (Ar) in which

nitrogen fixation is inhibited, the  $\gamma$  polypeptide is reduced, suggesting that ammonia regulates its expression (2). Recently, it has been reported that ammonia induces soybean GS gene expression in transgenic *L. corniculatus* roots (10). Here, we report differences in the synthesis of GS isoforms when higher nitrogenase activity is induced by increasing CO<sub>2</sub> concentration.

### MATERIALS AND METHODS

#### Plant Material

Bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv Negro Jamapa) inoculated with *Rhizobium leguminosarum* by *phaseoli* wild-type strain CE3 or a TMPD<sup>2</sup> mutant CFN037 (13) was grown in a controlled-environment growth chamber programed for 12-h photoperiod at 25°C day/night temperature; the PPFD during the photoperiod was 906  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . At day 8 after inoculation, CO<sub>2</sub> was raised to 0.1% during the photoperiod and held at that level until day 17. Chamber CO<sub>2</sub> concentration was maintained with a Conviron CMP3246 CO<sub>2</sub> controller (Controlled Environments Inc.). CO<sub>2</sub> concentration was monitored by the nondispersive infrared absorptiometry method. Plants were harvested daily for fresh weight and nitrogenase determination. The data presented per day are the average of at least 20 plants.

#### Enzyme Activity

GS activity was measured by the transferase assay (6). One unit of activity represents 1  $\mu\text{mol}$  of  $\gamma$ -glutamyl-hydroxamate formed per min at 30°C. Nitrogenase activity was measured by acetylene reduction as described by Dart *et al.* (4). Protein was determined by the Bradford procedure with BSA as a standard (1).

#### Analysis of GS Polypeptides

Nodule extracts were loaded on a 0.5 mL hydroxylapatite column equilibrated in 20 mM phosphate buffer, pH 7.8, washed with 4 mL of 80 mM phosphate, and GS activity was eluted with 400 mM phosphate buffer. Fractions of 200  $\mu\text{L}$  were collected. Fractions containing GS activity were used for the polypeptide analysis. GS polypeptide composition was examined by two-dimensional PAGE (11), followed by western immunodetection (14) with an anti-GS antiserum raised against the purified enzyme from nodule (9) and an alkaline phosphatase-conjugated second antibody. The intensity of the

<sup>1</sup> Supported in part by grant BNF-MX-6-87-77 from the National Research Council through the U.S. Agency for International Development and from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (P22HCCO-X880343). J.-L.O. was supported by a fellowship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.

<sup>2</sup> Abbreviations: GS, glutamine synthetase;  $\beta$  and  $\gamma$ , glutamine synthetase polypeptides; TMPD, *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine.

developed spots was quantified with a laser scanning densitometer (Biomed Instruments SLR-2D/11D). The GS- $\beta$ /GS- $\gamma$  polypeptide ratio was determined with an Autosover Video-phoresis program (Biomed Instruments, Inc.).

**RESULTS AND DISCUSSION**

**Plant Growth and Nitrogenase Activity**

Plants were inoculated with two different *Rhizobium phaseoli* strains: the wild-type strain CE3 and the mutant strain CFN037 isolated by its increased ability to oxidase TMPD<sup>2+</sup>, which confers earlier bacteroid development and nitrogenase induction (13). Plant fresh weight increased from day 10 to 17 after infection. High CO<sub>2</sub> (0.1%) stimulated plant growth, particularly in those plants inoculated with *Rhizobium* strain CFN037 (Fig. 1). Plants grown in 0.1% CO<sub>2</sub> also display higher nitrogenase activity than those grown in 0.02% CO<sub>2</sub>. In normal CO<sub>2</sub> (0.02%), nitrogenase activity in plants inoculated with the CFN037 *Rhizobium* mutant was higher and remained higher from day 11 to 17 than in plants inoculated with the wild-type strain CE3, as previously reported (13) (Fig. 2). In high CO<sub>2</sub> (0.1%), no difference in nitrogenase activity was observed in plants inoculated with either the CFN037 or the CE3 *Rhizobium* strains. This result suggests that the *Rhizobium* strain CFN037 not only promotes early bacteroid development and nitrogenase induction (13), but also provides more fixed N to incorporate into plant fresh weight when CO<sub>2</sub> is increased.

**Characterization of Glutamine Synthetase**

Glutamine synthetase activity increased almost sevenfold from day 11 to day 17 in nodules from plants infected with

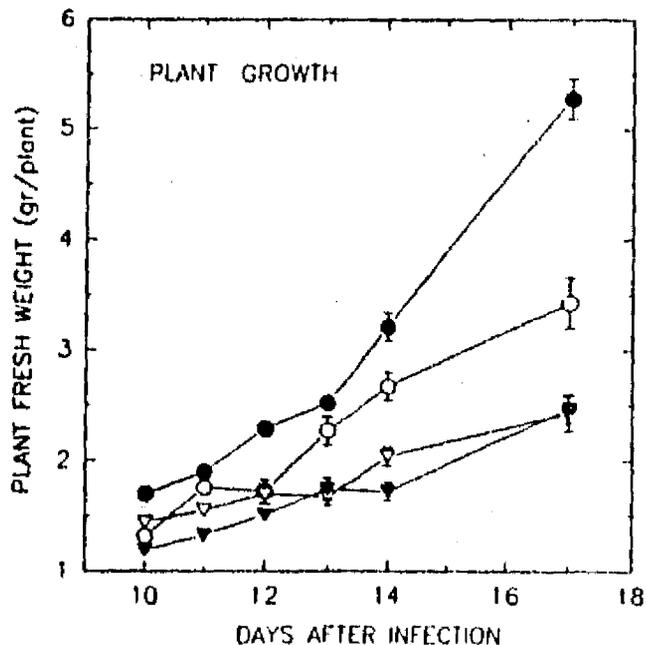


Figure 1. Effect of CO<sub>2</sub> on the increase in plant fresh weight of plants inoculated with *R. phaseoli* CE3 (O,  $\nabla$ ) and CFN037 ( $\bullet$ ,  $\blacktriangledown$ ). Plants were grown in 0.1% (circles) and 0.02% (triangles) CO<sub>2</sub>. Vertical bars are  $\pm$  SE.

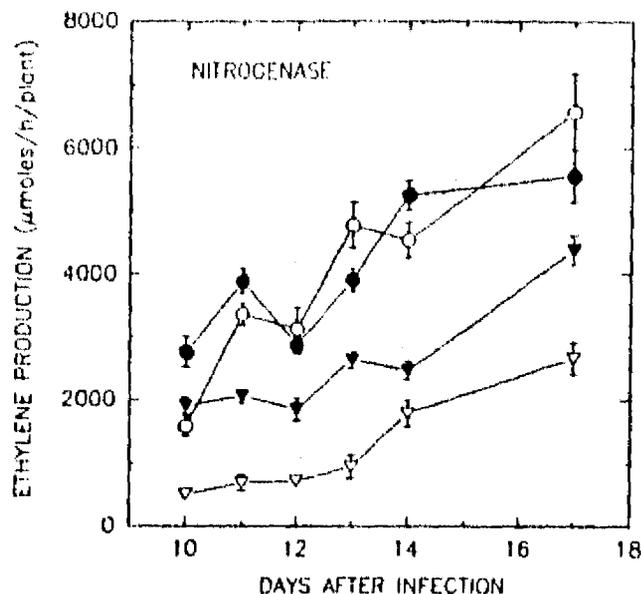


Figure 2. Effect of CO<sub>2</sub> on nitrogenase activity during nodule development. Plants inoculated with *R. phaseoli* (CE3 (O,  $\nabla$ ) and CFN037 ( $\bullet$ ,  $\blacktriangledown$ ) were grown in 0.1% (circles) and 0.02% (triangles) CO<sub>2</sub>. Vertical bars are  $\pm$  SE.

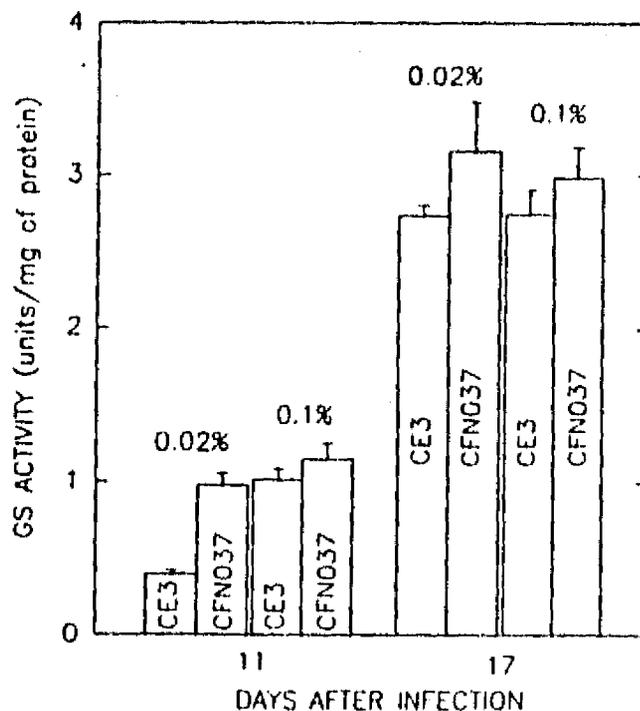


Figure 3. Nodule glutamine synthetase activity at day 11 and 17 after infection of plants inoculated with *R. phaseoli* strains CE3 and CFN037. Plants were grown in 0.1% and 0.02% CO<sub>2</sub>. One unit of activity = 1  $\mu$ mol of  $\gamma$ -glutamyl-hydroxamate formed per min at 30°C. Vertical bars are  $\pm$  so.

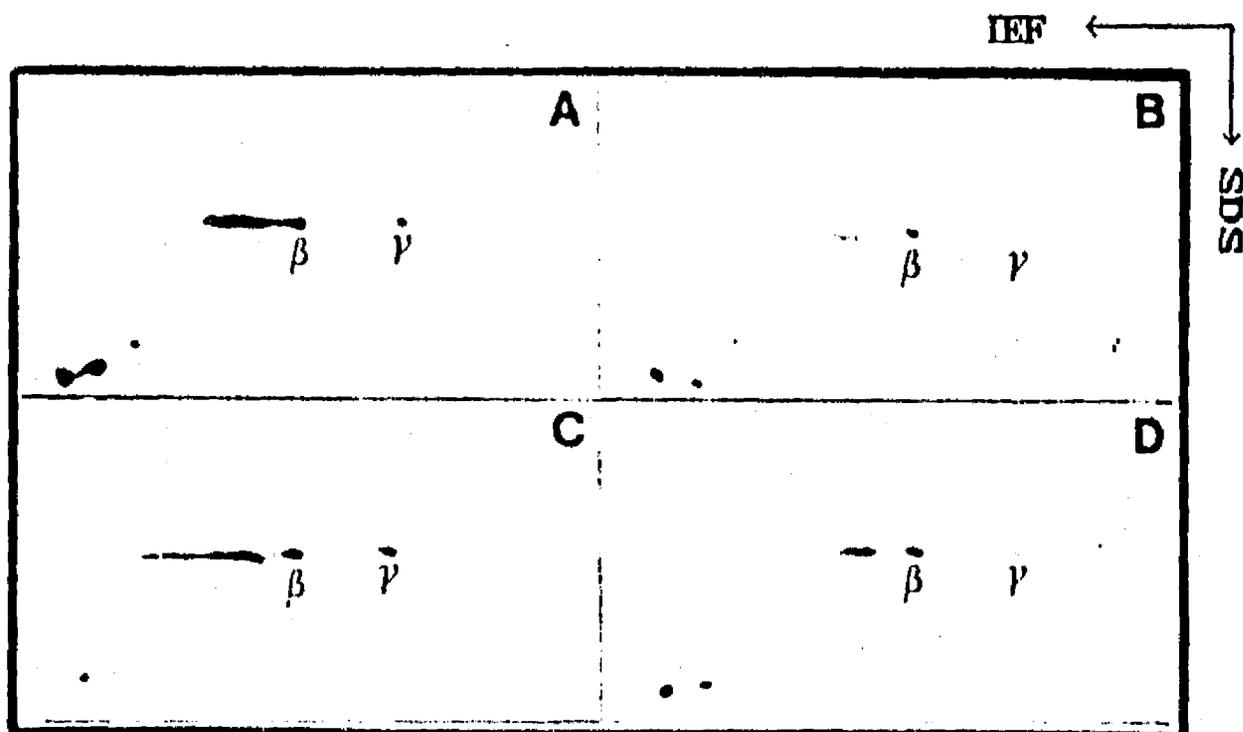


Figure 4. Glutamine synthetase polypeptide composition at day 17 after infection. Plants inoculated with *R. phaseoli* strains CE3 (A, B) and CFN037 (C, D) were grown in 0.02% (A, C) and 0.1% (B, D) CO<sub>2</sub>. Forty micrograms of protein were applied to each gel.

the wild-type *Rhizobium* CE3 strain and grown in 0.02% CO<sub>2</sub> (Fig. 3). In the other conditions tested, GS activity increased 2.5- to 3-fold. No effect on GS activity by high CO<sub>2</sub> was found at day 17 under any of the conditions tested (Fig. 3). However, analysis of the GS polypeptide composition at day 17 after infection revealed that, in high CO<sub>2</sub>, where nitrogenase activity is two- to threefold higher, the GS- $\gamma$  polypeptide was significantly reduced, whereas the GS- $\beta$  polypeptide was not affected (Fig. 4). In nodules infected with the wild type CE3 strain, the GS- $\beta$ /GS- $\gamma$  polypeptide ratio determined by scanning densitometry was 2.6 in normal CO<sub>2</sub> and 5.9 in high CO<sub>2</sub>. In the nodules infected with the mutant CFN037 strain, the GS- $\beta$ /GS- $\gamma$  ratio was 1.2 and 2.1 in normal CO<sub>2</sub> and high CO<sub>2</sub>, respectively. The GS- $\beta$ /GS- $\gamma$  ratio was twofold higher in 0.1% CO<sub>2</sub> compared with 0.02% CO<sub>2</sub> in both strains. The fact that the reduction in the GS- $\gamma$  polypeptide does not reduce GS total activity requires further evaluation. In contrast with this result, recent studies (2) showed that, in nodulated root systems of beans grown in an Ar:O<sub>2</sub> atmosphere, the activity of the nodule GS- $\gamma$  isoenzyme was reduced (85%) along with that of nitrogenase, whereas the GS- $\beta$  isoenzyme was unaffected (2). Together these results suggest that both high and low nitrogenase activity can be correlated with a reduction of GS- $\gamma$ . Because in both experimental procedures (excess of CO<sub>2</sub> or absence of N<sub>2</sub>) one could expect a higher carbon/nitrogen (C/N) ratio, these data suggest that the C/N balance within the nodule and not the ammonia derived from the bacteroid *per se* may be a primary modulating factor of nodule GS- $\gamma$  isoenzyme. Whether the reduction in the GS- $\gamma$  is due to a reduced synthesis or to a posttranslational modi-

fication mechanism needs to be defined. If carbon availability plays an important role in GS regulation, this result could also explain why a gene encoding a cytosolic GS from soybean increased its expression with ammonia in *L. corniculatus* but not in transformed tobacco plants (10).

#### ACKNOWLEDGMENT

We thank José Luis Zitalpopoca for technical assistance.

#### LITERATURE CITED

- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-258
- Chen FL, Bennett MJ, Cullimore JV (1990) Effect of nitrogen supply on the activities of isoenzymes of NADH-dependent glutamate synthase and glutamine synthetase in root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. *J Exp Bot* 41: 1215-1221
- Cullimore JV, Lara M, Leon PJ, Millin BJ (1983) Purification and properties of two forms of glutamine synthetase from the plant fraction of *Phaseolus* root nodules. *Planta* 157: 245-253
- Dart PJ, Day JM, Harris D (1972) Assay of nitrogenase activity by acetylene reduction. In *Use of Isotopes for Study of Fertilizer Utilization by Legume Crops*. J FAO/IAEA Technical Report Series 149, pp 85-97
- Egli MA, Griffith SM, Miller SS, Anderson MP, Vance CP (1989) Nitrogen assimilating enzyme activities and enzyme protein during development and senescence at effective and plant gene controlled ineffective alfalfa nodules. *Plant Physiol* 91: 898-904
- Ferguson AR, Sims AP (1974) The regulation of glutamine metabolism in *Candida utilis*: the role of glutamine in the control of glutamine synthetase. *J Gen Microbiol* 80: 159-181
- Forde HG, Day HM, Turton JF, Wen-jun S, Cullimore JV, Jane

- EO (1989) Two glutamine synthetase genes from *Phaseolus vulgaris* L. display contrasting developmental and spatial patterns of expression in transgenic *Lotus corniculatus* plants. *Plant Cell* 1: 391-401
8. Lara M, Cullimore JV, Lea PJ, Millin BJ, Johnston AWB, Lamb JW (1983) Appearance of a novel form of plant glutamine synthetase during nodule development in *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 157: 254-258
9. Lara M, Porta H, Padilla J, Folch J, Sánchez F (1984) Heterogeneity of glutamine synthetase polypeptides in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol* 76: 1019-1023
10. Miao GII, Hirel B, Marsollier MC, Ridge RW, Verma DP (1991) Ammonia-regulated expression of a soybean gene encoding cytosolic glutamine synthetase in transgenic *Lotus corniculatus*. *Plant Cell* 3: 11-22
11. O'Farrell PH (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250: 4007-4021
12. Padilla JE, Campos F, Conde V, Lara M, Sánchez F (1987) Nodule specific glutamine synthetase is expressed before the onset of nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Mol Biol* 9: 65-74
13. Soberón M, Membrillo-Hernández J, Aguilar GR, Sánchez F (1990) Isolation of *Rhizobium phaseoli* Tn5-induced mutants with altered expression of cytochrome terminal oxidase  $\alpha$  and  $\alpha\alpha^1$ . *J Bacteriol* 172: 1676-1680
14. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheet: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354