



03072

2
25

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

*Unidad Académica de los Ciclos
Profesionales y de Posgrado
Colegio de Ciencias y Humanidades
Instituto de Biotecnología*

PAPEL DE LA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA
(PEPC) EN LA SIMBIOSIS FRIJOL-RHIZOBIUM

T E S I S

Que para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGIA

Que presenta

GABRIELA FUENTES ORTIZ

Cuernavaca, Morelos

1999

0271525

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

Dedicatorias

Por 10 años, he estado pensando en este momento

A Dalila

Como un pequeño obsequio a la persona que amo desde el
primer momento que la vi

A Ricardo

Como bien lo sabes (no está demás decirlo) por todo lo que te
amo y hemos aprendido juntos

A Ruth

Por que tu me enseñaste a ser menos egoista, como bien sabes
muchas cosas en mi vida las riges, te amo.

A Jorge

Con mi amor y mi admiración. Por formar parte de esta aventura.

Agradecimientos

A Miguel Lara por enseñarme que la ciencia es diversión

A Jose Luis Ortega, por los inicios en estos menesteres

Al comite tutorial y de revixión: Dr. Miguel Lara, Dra. Gladys Cassab, Dr. Fernando Valle, Dra Herminia Loza, Dr. Marco Villanueva, Dr. Jorge Santamaría por los comentarios y la formación.

A Raúl N, por ser mi amigo, A Sonia S, Alberto C, Lourdes B, por las discusiones de grupo. A Araceli por las plantas y los geles. Alejo por las fotografias. Sossana por los dibujos, A Marcela, por las tardes de café.

Mucha gente ha estado en mis etapas de formación y deformación, a ellas.

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCION	
Desarrollo del nódulo	3
Metabolismo de N	7
PEPC en tejidos fotosintéticos	13
PEPC en tejidos no fotosintéticos	14
Metabolismo de C en la fijación simbiótica de N ₂	17
Justificación	21
Hipótesis	22
OBJETIVOS	24
Estrategia Experimental	26
MATERIALES Y METODOS	
Material Vegetal	29
Cepas de <i>Rhizobium</i>	29
Condiciones de cultivo (invernadero)	32
Recolección de muestras	32
Determinación de crecimiento	33
Extracción de proteína	34
Actividades enzimáticas	35
Ureidos	37
Electroforesis	38
Transferencia de proteínas	38
Técnica de inmunodetección (western blot)	39
Técnica de inmunoprecipitación	41

RESULTADOS

Crecimiento de las plantas no noduladas vs. inoculadas	44
Actividad de N ₂ asa	51
Actividad de PEPC	53
Transporte de ureidos	56
Proteína de la PEPC en nódulos	58
PEPC en raíz	60
Actividad de GS y GOGAT	65
Proteína de la GS	66
Proteína de la GOGAT	69

DISCUSIÓN

1) Crecimiento de las plantas no noduladas vs. inoculadas	74
2) Papel de PEPC en el crecimiento de las plantas	76
3) Papel de PEPC en el metabolismo de N	79
Papel de PEPC en la actividad de N ₂ asa en el nódulo	79
Papel de PEPC en la actividad de GS y GOGAT en el nódulo	83
4) Papel de PEPC en el transporte de ureidos	85

CONCLUSIONES	91
--------------	----

BIBLIOGRAFIA	94
--------------	----

ANEXO	100
-------	-----

RESUMEN

El proceso de nodulación promueve un metabolismo muy activo de carbono (C) y de nitrógeno (N) entre la bacteria y la planta hospedera (Christeller *et al.*, 1977). El N es aportado por el bacteroide mientras que la planta aporta los esqueletos de C necesarios para la asimilación y transporte de NH_4^+ . El objetivo del presente trabajo fué caracterizar el papel de la enzima responsable de la fijación de CO_2 en el nódulo, la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) en el metabolismo de N y en el crecimiento de plantas de frijol inoculadas con tres cepas de *Rhizobium*. Los resultados indicaron que la actividad de la PEPC tiene un papel importante en el metabolismo de N y puede influir en el crecimiento de las plantas inoculadas. Se determinó que tanto la actividad de PEPC como su cantidad, se incrementaron significativamente durante el desarrollo de la simbiosis y que dicho incremento se presentó antes del incremento en la actividad de cualquiera de las otras enzimas estudiadas incluyendo la nitrogenasa (N_2 asa). Las plantas que presentaron mayor crecimiento fueron las inoculadas con la cepa CNPAF 512 que presentaron también la mayor actividad de PEPC. Aunque el tiempo de inducción de las enzimas y el transporte de ureidos dependió de la cepa de *Rhizobium* empleada como inoculante, la inducción temprana en la actividad de PEPC correlacionó en forma positiva con las actividades de la GS, la GOGAT y el transporte de ureidos.

En el análisis de la composición de polipéptidos de la PEPC en nódulos, se detectó un componente de 106 kD. En raíces y en nódulos inducidos con la cepa CIAT 899 se encontró una banda adicional con un peso de 112 kD. La banda de 112 kD posiblemente corresponde a una modificación de la banda de 106 kD que puede ser inmunodetectada con anticuerpos anti-ubiquitina. La ubiquitinación de esta proteína puede representar un nuevo mecanismo de regulación de la PEPC.

INTRODUCCION

El nitrógeno (N) es el nutriente más limitante para la mayoría de las especies vegetales. Después de la asimilación fotosintética de carbono (C), la asimilación de N es el segundo evento en importancia para el crecimiento y el desarrollo de las plantas.

Las plantas generalmente adquieren N del suelo, en forma natural y a través de fertilizantes químicos sin embargo, algunas especies pueden adquirir N de la atmósfera. La forma de N más abundante, es el nitrógeno atmosférico (N_2), el cual se encuentra sólo disponible para un número restringido de microorganismos, los fijadores de N_2 . Si bien éstos pueden ser de vida libre, otros sólo fijan N_2 al asociarse simbióticamente con plantas. La simbiosis agrícola más importante es la que se establece entre las raíces de las leguminosas y las bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. La fijación simbiótica de N_2 resulta de la interacción compleja entre los genes de la planta hospedera y la bacteria. De esta forma, la planta obtiene una fuente de nitrógeno reducido (NH_4^+), mientras que suministra los fotosintatos necesarios como una fuente de energía para el establecimiento y el funcionamiento del nódulo (Brewin, 1991). El nódulo es el órgano simbiótico que contiene a las bacterias fijadoras de N_2 (Vance and Heichel, 1991).

El N_2 es reducido a amonio (NH_4^+) por la enzima microbiana nitrogenasa (N_2asa) (EC 1.18.6.1). Las enzimas glutamina sintetasa (GS) (EC 6.3.1.2) y glutamato sintasa (NADH-GOGAT) (EC 1.4.1.14) constituyen la vía de asimilación del NH_4^+ en la planta.

Desarrollo del nódulo

La capacidad para la fijación simbiótica de N_2 es adquirida a través de la expresión coordinada y controlada de genes de la planta y de la bacteria los cuales dan origen al nódulo. Los nódulos de las raíces son masas de tejido altamente organizados e hiperplásticos derivados de las células corticales de la raíz. La serie de eventos que derivan en la formación del nódulo van desde el reconocimiento entre los rhizobia (bacterias fijadoras de N_2 sin actividad de N_2asa) y la zona de emergencia de los pelos radiculares, la deformación y enroscamiento de los pelos radiculares, la invasión y colonización bacterial de la rizósfera, la formación de los hilos de infección que llevan a las bacterias a los centros de actividad mitótica en el córtex, diferenciación del nódulo (en las células de los primordios de los nódulos con una alta actividad meristemática, se presentan cambios morfológicos como migración del núcleo y formación de una pared celular adicional como una barrera de difusión al O_2), metabolismo de C para la fijación de N_2 , producción de ácidos orgánicos, asimilación de NH_4^+ , senescencia y posiblemente supresión de

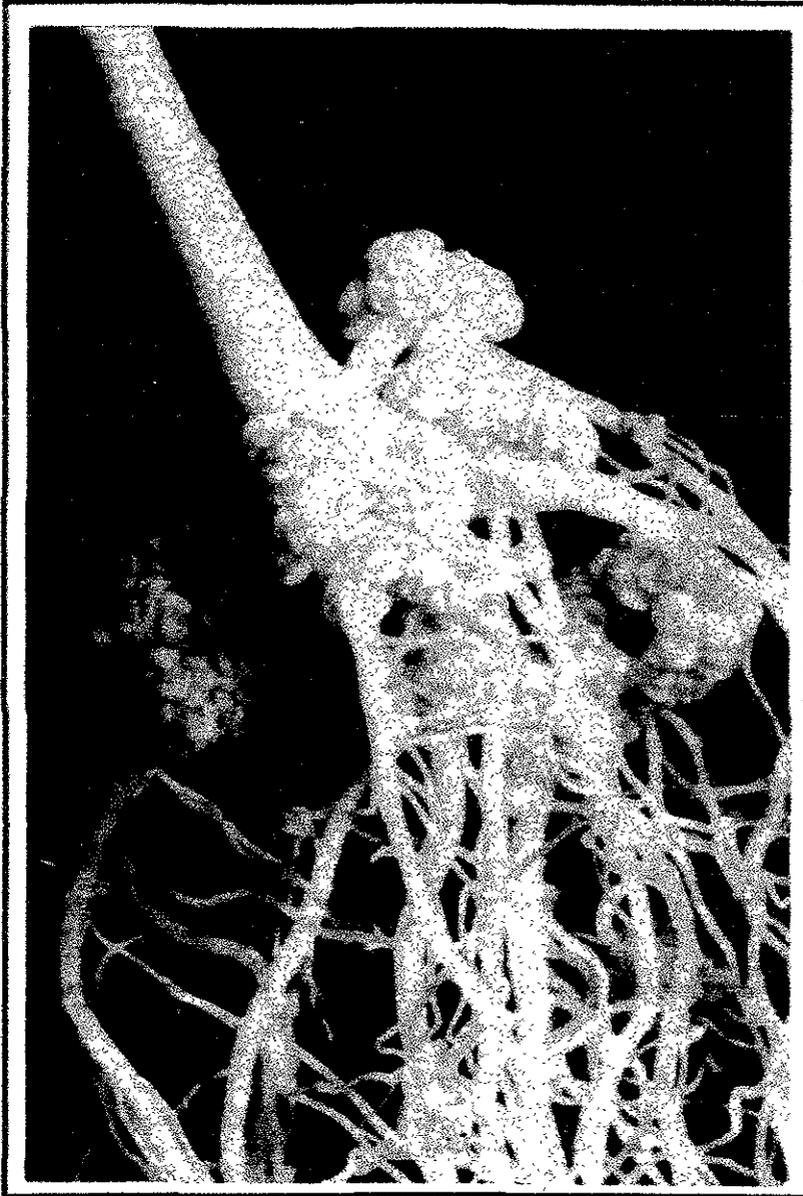
El N_2 es reducido a amonio (NH_4^+) por la enzima microbiana nitrogenasa (N_2asa) (EC 1.18.6.1). Las enzimas glutamina sintetasa (GS) (EC 6.3.1.2) y glutamato sintasa (NADH-GOGAT) (EC 1.4.1.14) constituyen la vía de asimilación del NH_4^+ en la planta.

Desarrollo del nódulo

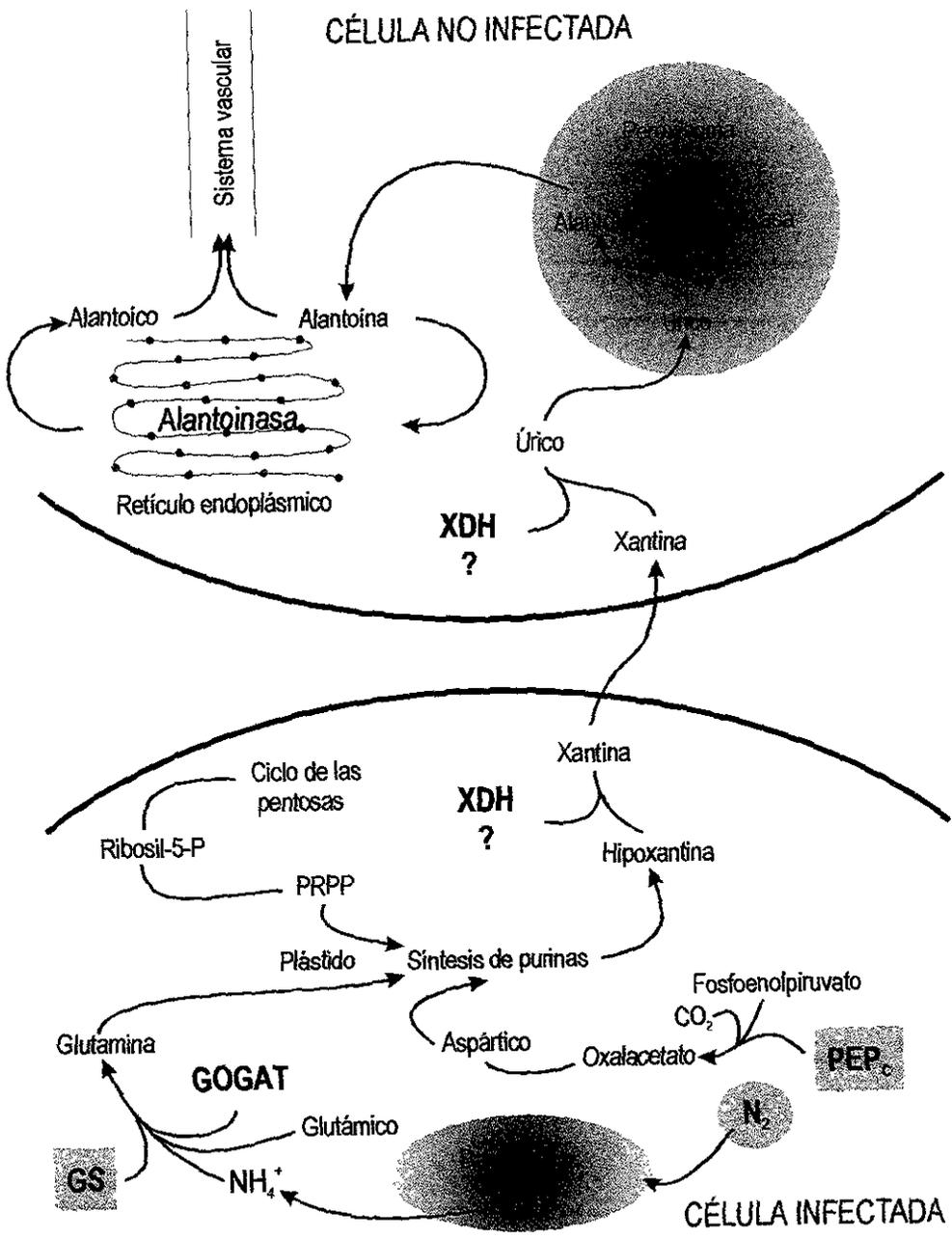
La capacidad para la fijación simbiótica de N_2 es adquirida a través de la expresión coordinada y controlada de genes de la planta y de la bacteria los cuales dan origen al nódulo. Los nódulos de las raíces son masas de tejido altamente organizados e hiperplásticos derivados de las células corticales de la raíz. La serie de eventos que derivan en la formación del nódulo van desde el reconocimiento entre los rhizobia (bacterias fijadoras de N_2 sin actividad de N_2asa) y la zona de emergencia de los pelos radiculares, la deformación y enroscamiento de los pelos radiculares, la invasión y colonización bacterial de la rizósfera, la formación de los hilos de infección que llevan a las bacterias a los centros de actividad mitótica en el córtex, diferenciación del nódulo (en las células de los primordios de los nódulos con una alta actividad meristemática, se presentan cambios morfológicos como migración del núcleo y formación de una pared celular adicional como una barrera de difusión al O_2), metabolismo de C para la fijación de N_2 , producción de ácidos orgánicos, asimilación de NH_4^+ , senescencia y posiblemente supresión de

los genes de defensa de la planta requeridos para compatibilidad. De esta forma los genes de la planta hospedera y de la bacteria contribuyen a la simbiosis (Vance and Griffith, 1990).

Los nódulos según su estructura, actividad meristemática y el producto de N transportado se clasifican en dos grupos: a) Nódulos esféricos (Esquema 1) que no presentan un meristemo persistente (por lo que las etapas de desarrollo están separadas temporalmente). Estos nódulos se presentan en especies tropicales como cacahuete, soya y frijol las cuales transportan ureidos (alantoina y ácido alantoico) como productos finales de la fijación simbiótica de N_2 (Esquema 2). Estos compuestos constituyen los principales compuestos nitrogenados transportados desde el nódulo al resto de la planta (Schubert, 1986); y b) Nódulos elongados-cilíndricos con un meristemo persistente (por lo que las etapas de desarrollo se encuentran separadas espacialmente). Estos nódulos se presentan en especies templadas como alfalfa, chícharo, lupinus y trébol, donde el NH_4^+ asimilado, es incorporado principalmente en forma de amidas [glutamina (gln) y asparagina (asn)], las cuales son transportadas por el xilema a la parte aérea de la planta (Esquema 3).



Esquema 1. Nódulos inducidos por bacterias del género *Rhizobium* en raíces de la planta trópic, frijol (*Phaseolus vulgaris*) cv. Negro Jamapa.



Esquema 2. Localización de la vía de síntesis de ureidos en plantas leguminosas noduladas de origen tropical.

Metabolismo de N

Fijación simbiótica de N₂ a través de la enzima nitrogenasa.

Las plantas de la familia *Leguminosae* como el frijol, adquieren N a través de la enzima nitrogenasa (N₂asa), expresada durante la fijación simbiótica de N₂ por las bacterias del género *Rhizobium*. Se ha demostrado que tratamientos que inhiben la actividad de la N₂asa también reducen fuertemente la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC, EC 4.1.1.31) y la incorporación de ¹⁴CO₂ en aminoácidos en el nódulo (Laing et al., 1979).

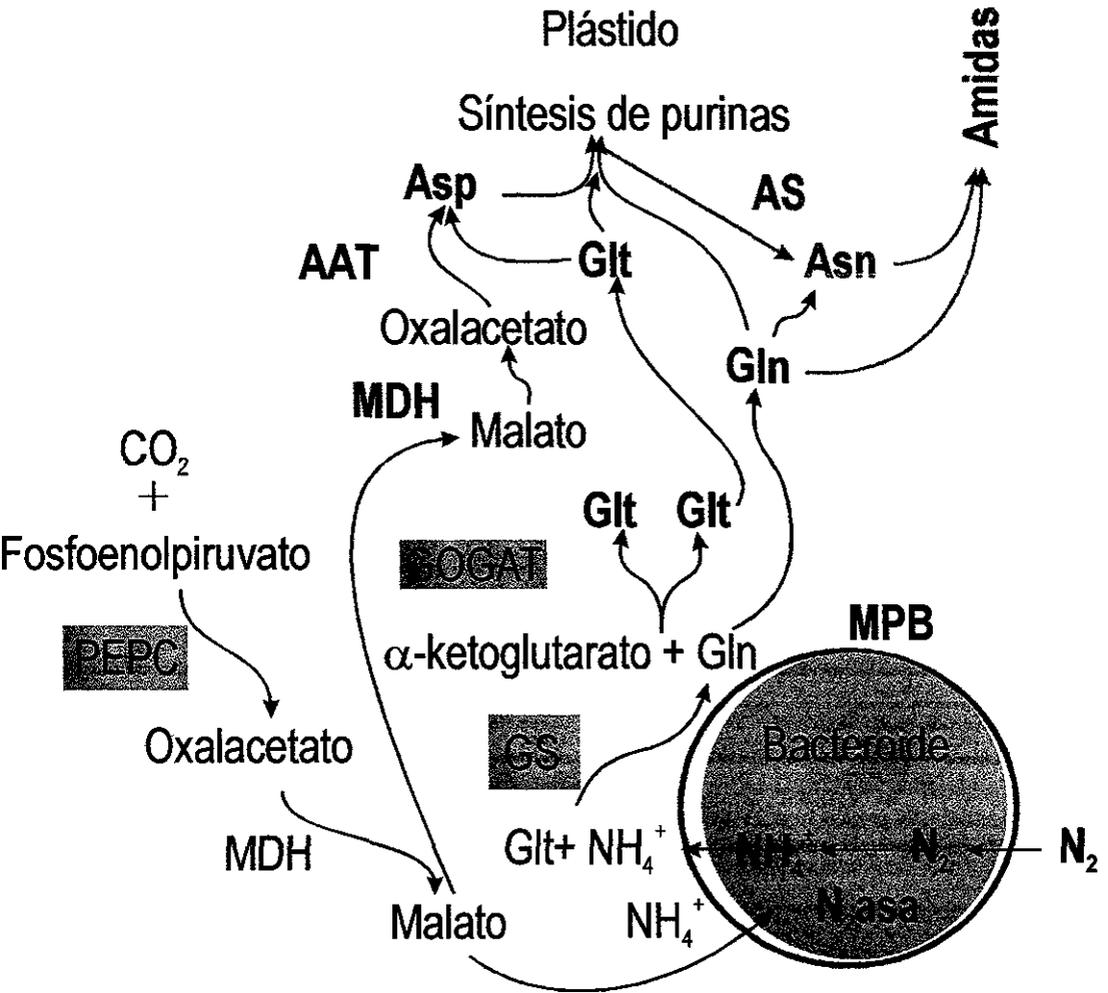
Asimilación de NH₄⁺ en el nódulo

La asimilación primaria de NH₄⁺ que se lleva a cabo por la GS depende fuertemente de metabolitos de C. La función integrada de enzimas citosólicas y asociadas al nódulo es requerida para establecer una relación entre la asimilación de NH₄⁺ con el metabolismo de C.

Glutamino Sintetasa

La enzima GS que cataliza la asimilación inicial de NH₄⁺ representa del 1-2 % de la proteína total soluble del nódulo en

CÉLULA INFECTADA



Esquema 3. Esquema general de síntesis de las amidas glutamina y asparagina que se lleva a cabo en plantas leguminosas noduladas de origen templado.

órganos asimilando N activamente. La actividad de la GS se incrementa durante el desarrollo del nódulo en las raíces de las leguminosas (Egli *et al.*, 1991), en hojas etioladas expuestas a la luz o en hojas y raíces de plantas crecidas en NH_4^+ ó NO_3^- . La holoenzima tiene una masa molecular de 320/380 kD y está compuesta de ocho subunidades con un peso molecular por subunidad de 38-46 kD. Se han identificado isoformas de la GS: *cloroplástica* y *citoplásmica* tanto en especies monocotiledóneas como dicotiledóneas. En nódulos de raíces de leguminosas se expresan dos formas citosólicas de GS y en algunos casos una de ellas es nódulo específica (Ortega, 1992; Ortega *et al.*, 1992). Los anticuerpos de la GS reconocen otras GS's del mismo origen pero generalmente no reconocen GS's de diferente origen. Las subunidades de la GS están codificadas por varios genes, en algunas especies por una pequeña familia multigénica. La GS se ha purificado de varios órganos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y se han preparado anticuerpos de la GS de nódulos de raíces. La enzima citosólica en cada órgano está compuesta de diferentes proporciones de las variantes isoeléctricas α , β y γ . Estas subunidades están codificadas por cuatro genes distintos: *gln- α* , *gln- β* , *gln- γ* y *gln- δ* . El gen *gln- δ* está expresado preferencialmente en células infectadas rhizobiales en nódulos (Ortega *et al.*, 1992).

La expresión de la GS se afecta en forma variable por el papel del NH_4^+ y el NO_3^- . En algunas especies como soya y arroz

la transcripción y la traducción de ciertas formas de genes citosólicos de la GS están aumentados y/o inducidos por el NH_4^+ ó NO_3^- . Sin embargo, en otras especies como *Phaseolus* o *Medicago*, la expresión del gene de la GS citosólico parece no requerir ninguna de éstas dos fuentes de N para su expresión inicial (Vance, 1997).

Los genes de la GS son diferencialmente expresados dependiendo de la edad, órgano y tejido, de la especie y de la condición de N.

Glutamato Sintasa

La GOGAT cataliza la transferencia reductiva del grupo amido de la gln a la posición α -keto del 2-oxoglutarato (α -ketoglutarato) resultando en la formación de dos moléculas de glutamato. La GOGAT en colaboración con la GS funcionan para mantener un flujo cíclico de N a partir de NH_4^+ en gln y glutamato (glt). En plantas superiores la GOGAT se presenta en dos formas: NADH-GOGAT y ferredoxina-GOGAT (Fd-GOGAT). Anticuerpos de la NADH-GOGAT no reconocen anticuerpos de la Fd-GOGAT, ni viceversa. Lo que indica que ambas proteínas son diferentes. Los nódulos en las raíces de leguminosas se ha reportado que presentan la Fd-GOGAT, sin embargo, su papel no ha sido entendido. La NADH-GOGAT se localiza principalmente en tejidos no verdes. La enzima se presenta como un monómero

con un peso molecular de 200 kD. Los anticuerpos de nódulo de la NADH-GOGAT reconocen polipéptidos comparables de 200 kD en otros tejidos. La actividad de NADH-GOGAT de nódulo se incrementa marcadamente durante el desarrollo de nódulos efectivos y este incremento está acompañado por un incremento en la proteína y el mRNA. En contraste, raíces noduladas inefectivas que no fijan N_2 presentan poca o ninguna actividad de la NADH-GOGAT, de su proteína o de su mRNA. Este dato sugiere que la expresión de la NADH-GOGAT de nódulo está controlada a nivel transcripcional. Se propone que la NADH-GOGAT puede ser un paso limitante en la asimilación de N_2 fijado simbióticamente (Vance, 1997).

Transporte de N_2 en frijol simbióticamente fijado: ureidos

Las leguminosas tropicales de la tribu *Phaseoleae* que transportan N en forma de amidas cambian su metabolismo de N a la síntesis de ureidos cuando ellas son noduladas (Ireland, 1997; Schubert, 1986). Este cambio puede deberse a la economía del uso del C: los costos metabólicos relativos al transportar ureidos o amidas no han sido claros pero parece que los productores de ureidos usan menos C orgánico para transportar la misma cantidad de N que los productores de amidas.

Los ureidos alantoina y ácido alantoico representan entre el 60-90 % del N total en la savia de leguminosas tropicales noduladas. El papel de éstos compuestos en el transporte de N_2 fijado simbióticamente se confirmó al utilizar [^{15}N] N_2 (Pate, 1989; Schubert, 1986).

Los ureidos son sintetizados por la vía de oxidación de las purinas y requieren de la compartimentalización del nódulo: células infectadas y células no infectadas. El N_2 fijado por el bacteroide es reducido a NH_4^+ el cual es excretado en el citosol de la célula hospedera infectada, entonces es asimilado por la GS en gln. La síntesis de la purina que tiene como sustrato a la gln se lleva a cabo en el plastidio (Ireland, 1997). La purina, xantina, es exportada al citosol donde es oxidada a ácido úrico por la xantina deshidrogenasa (XDH). El ácido úrico una vez en el peroxisoma de las célula no infectada se convierte a alantoina con la producción de peróxido de hidrógeno y CO_2 por acción de la uricasa. Dependiendo de la especie vegetal la alantoina se utiliza directamente en el transporte de N en el xilema o puede ser primeramente convertida a ácido alantoico en el retículo endoplásmico, por la enzima alantoinasa (Schubert, 1986).

Aunque las raíces noduladas de plantas que transportan ureidos tienen una PEPC muy activa el papel de ésta enzima en la síntesis de ureidos no es clara.

En el caso de las leguminosas templadas que transportan amidas (gln y asn), la actividad de la PEPC tiene una significación especial, ya que el producto de la reacción (oxalacetato) es el sustrato para la síntesis de asparagina (Laing *et al.*, 1979).

Metabolismo de C

PEPC en tejidos fotosintéticos

La PEPC cataliza la β -carboxilación irreversible del PEP en presencia de HCO_3^- y Mg^{2+} , para producir oxalacetato y Pi. Esta enzima está ampliamente distribuida en plantas y microbios jugando un papel crucial en el metabolismo de C y N. La mayoría de los estudios sobre la PEPC en plantas se han enfocado a las especies con metabolismo C_4 y CAM, donde ésta enzima es la responsable de la asimilación primaria de CO_2 en las hojas.

La PEPC es un tetrámero compuesto de subunidades de 100-110 kD y varias isoformas de la PEPC han sido detectadas en especies C_4 y CAM (Pathirana *et al.*, 1992). La regulación de la enzima se logra a través de eventos tanto transcripcionales como post-traduccionales. En maíz y sorgo, la luz incrementa los niveles del mRNA y de la proteína de la PEPC. En la planta de hielo, *Mesembryanthemum crystallinum*, el estrés por sal es el que promueve un incremento en la estabilidad del mRNA de la PEPC

y de su proteína (Bauer *et al.*, 1992; Jiao and Chollet, 1991). La regulación de la PEPC se presenta a varios niveles: post-traducciona l de la PEPC que se logra mediante la fosforilación de la proteína (Bakrim *et al.*, 1993), mientras la oligomerización depende del fosfoenolpiruvato (PEP), malato y glucosa-6-P. También se presenta regulación de la PEPC por recambio de la proteína.

PEPc en tejidos no fotosintéticos

En plantas con metabolismo C_3 se han hipotetizado varias funciones para la PEPC pero su papel más definido está relacionado con el aporte de esqueletos de C en la asimilación inicial del NH_4^+ en nódulos de leguminosas. La fijación de CO_2 en los nódulos a través de la PEPC está integralmente asociada con la fijación de N_2 y asimilación de NH_4^+ . Se presenta una relación directa entre el metabolismo de N y el metabolismo de C.

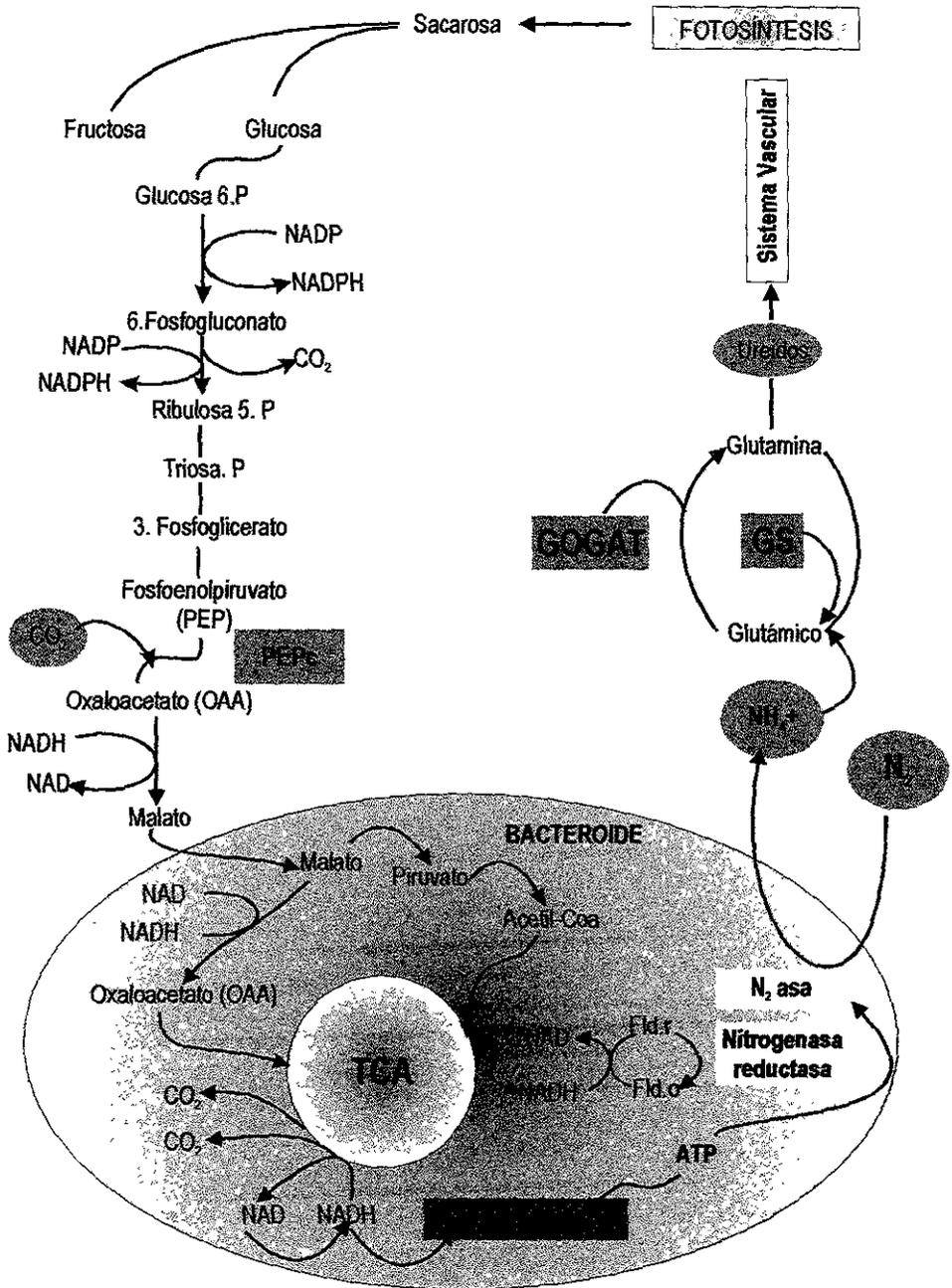
El papel que la PEPC juega en la asimilación de NH_4^+ se ha estudiado en especies como *Selenastrum* y maíz (Vanlerberghe *et al.*, 1989). Los resultados indican que se presenta un incremento en la actividad de la PEPC y su mRNA en respuesta a adiciones de NH_4^+ . En experimentos con plantas tratadas con NH_4^+ se ha detectado la incorporación rápida de ^{14}C a través de la fijación de $^{14}CO_2$ mediante la actividad de la PEPC. El ^{14}C se ha incorporado en aminoácidos nuevamente

sintetizados lo cual ejemplifica las interrelaciones del metabolismo de C con el del N.

En nódulos, se ha observado que la glicólisis deriva en la síntesis de malato, el cual puede ser reducido a fumarato y succinato. Estos ácidos orgánicos son claramente usados como una fuente de energía para la fijación de N_2 por los bacteroides.

La PEPC aporta cantidades substanciales de C para la síntesis de aspartato y asparagina y para reabastecer (actividad anaplerótica) las pozas de ácidos orgánicos (intermediarios en el ciclo del ácido tricarboxílico) (Esquema 4). Algunos de los papeles que ésta enzima juega en la simbiosis son: a) Síntesis de ácidos dicarboxílicos C4 como malato y succinato, los cuales son usados como sustratos por los bacteroides, para la generación de ATP; b) Provisión de esqueletos de C para la asimilación de NH_4^+ y para la síntesis de los compuestos transportadores de N (amidas y ureidos); y c) Síntesis de ácidos orgánicos para mantener el balance de carga y el pH intracelular (King *et al.*, 1986).

En nódulos aislados de lupinus expuestos a [^{14}C]glucosa el único aminoácido marcado en los primeros 10 minutos de exposición fué aspartato (Laing *et al.*, 1979).



Esquema 4. Metabolismo de carbono y nitrógeno en la planta hospedera y en el nódulo.

En raíces noduladas de plantas de chícharo incubadas con $^{14}\text{CO}_2$ se observó que 63 % del ^{14}C se incorporó en el citoplasma en forma de malato y succinato, lo cual confirma que la PEPC proporciona esqueletos de C en el nódulo (Rosendahl *et al.*, 1990).

En nódulos de chícharo expuesto a $^{14}\text{CO}_2$ el primer producto marcado detectable fué malato con una subsecuente conversión a aminoácidos (DeVries *et al.*, 1980).

Metabolismo de C en la fijación simbiótica de N_2

Los procesos de fijación de N_2 y de asimilación de NH_4^+ en el nódulo, requieren de una gran cantidad de fotosintatos, es decir, de C derivado de la fotosíntesis, para contender con la elevada demanda de ATP de la N_2 asa y de la GS, así como para proporcionar los esqueletos de C necesarios para la síntesis de los compuestos transportadores de N en el nódulo.

El consumo de C en el nódulo, representa del 15-30 % del C asimilado por la planta vía la fotosíntesis (Cocker and Schubert, 1981). El "dogma" actual sugiere que la fijación de N_2 y su asimilación en los nódulos de las raíces está limitada por la disponibilidad de C derivada de la fotosíntesis (fotosintatos) (Vance and Gantt, 1992). Se ha demostrado por Ta *et al* (1987) que sin un suplemento adecuado de fotosintatos a los nódulos, la

fijación de N_2 disminuye considerablemente y puede llegar a ser nula. Lo anterior establece que la disponibilidad de C es un factor limitante para que se lleve a cabo la fijación de N_2 . Es importante entonces que exista una fuente de C adicional al C derivado de la fotosíntesis, para que exista un buen desarrollo y funcionamiento del nódulo. En este órgano existe una enzima capaz de fijar bióxido de carbono atmosférico (CO_2), lo cual representa un aporte adicional de C hacia el nódulo. Esta enzima es la PEPC.

Estudios recientes han demostrado que a través de la actividad de la PEPC, se permite reasimilar parte del CO_2 respirado por los bacteroides (Coker and Schubert, 1981; King *et al.*, 1986). La actividad de la PEPC, permite incrementar el aporte de C al nódulo y de esta forma, se puede aumentar la provisión de C necesaria para la fijación de N_2 y la asimilación de NH_4^+ .

Por experimentos realizados con $^{14}CO_2$, se ha demostrado que entre el 25-40 % del C requerido para la fijación de N_2 por la N_2 asa, es aportado por la actividad de la PEPC (Vance *et al.*, 1983). Se considera un costo mínimo de 4 mg de C por cada mg de N_2 fijado y una parte importante de éste es aportado por la actividad de la PEPC (1.5 mg de C/ mg de N fijado).

Cookson (1980) demostró que en nódulos aislados de *Phaseolus vulgaris* el 25 % del C fijado a partir de $^{14}CO_2$ se incorporó en aminoácidos mientras del 60-70 % se incorporó en

intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico y el resto de la marca se encontró en aspartato, arginina, lisina y alantoína.

La PEPC es una proteína citosólica, presente en todas las especies vegetales. En tejidos no fotosintéticos como en nódulos la PEPC, comprende entre 1-2 % de la proteína total soluble, niveles similares a aquellos encontrados en hojas de especies con metabolismo C_4 y CAM. La actividad específica de la PEPC de nódulo es comparable a la de las PEPC's C_4 y CAM. En nódulos inefectivos inducidos por rhizobia inefectivos o controlados por genes vegetales, la PEPC se ve fuertemente limitada en su actividad y en su proteína.

La PEPC ha sido purificada de nódulos de soya, alfalfa y lupinus. Se ha sugerido la presencia de formas nódulo-específicas de la PEPC, pero no se ha confirmado ésta hipótesis. Actualmente sólo la PEPC de nódulo de alfalfa ha sido ampliamente estudiada a nivel de mRNA y de proteína. Utilizando anticuerpos monoespecíficos a la PEPC de nódulos de alfalfa se aisló un cDNA de 3.6 kb. Este codifica una proteína de 966 aminoácidos que produce una proteína de 111 kD. La secuencia de aminoácidos de la PEPC de nódulos de alfalfa muestra un 80 % de identidad con las PEPC's de especies con metabolismo C_4 y CAM (Pathirana *et al.*, 1992; Vance and Gantt, 1992).

En nódulos de soya (Schuller and Werner, 1993) se ha trabajado en inmunocitoquímica, a nivel de localización de la PEPC en la célula infectada y a nivel fisiológico y bioquímico.

Existe sin embargo menos información sobre el papel de la PEPC en nódulos de leguminosas tropicales y hasta nuestro conocimiento no se ha estudiado ampliamente en relación con las enzimas de asimilación de NH_4^+ en el nódulo.

En la presente tesis se presenta un estudio del papel que tiene la PEPC con relación a enzimas en la fijación de N_2 , la asimilación de NH_4^+ y el transporte de ureidos y de como dependiendo de la cepa de *Rhizobium*, se afecta este metabolismo durante el desarrollo de la simbiosis frijol-*Rhizobium*.

JUSTIFICACION

La importancia agronómica de utilizar especies como el frijol que promueven una fijación simbiótica de N_2 radica en que esto ayude a: 1) reducir costos de manejo del cultivo, por disminuir la utilización de fertilizantes químicos, 2) aminorar problemas posteriores de contaminación del suelo, como acidez y salinización, 3) recuperar los niveles de N perdidos de los suelos cuando se intercala con otros cultivos que son incapaces de fijar N_2 simbióticamente.

En los últimos 30 años se ha venido trabajando sobre la fisiología y bioquímica y más recientemente sobre la biología molecular del metabolismo de N en la simbiosis frijol-*Rhizobium* enfocado a la parte de la bacteria fijadora de N_2 . Comparativamente sólo recientemente se ha estudiado a la especie vegetal hospedera. Actualmente se están haciendo esfuerzos por estudiar de manera integral la regulación y coordinación del metabolismo de C y N durante la simbiosis planta-*Rhizobium*. Nuestro grupo está interesado en estudiar las características del metabolismo del C en la simbiosis y su relación con el metabolismo de N adquirido en forma simbiótica.

HIPOTESIS

En base a lo discutido en la introducción, se proponen las siguientes hipótesis:

1) La PEPC no sólo juega un papel en el metabolismo de N en el nódulo, sino que juega un papel integral en el desarrollo de la simbiosis que da como resultado un mayor crecimiento de la planta nodulada. Es posible que la cepa de *Rhizobium* CNPAF 512 que presenta mayor capacidad de nodulación que las otras cepas estudiadas (CIAT 899 y CE3) presente mayor actividad de PEPC correlacionada con un mayor crecimiento de las plantas.

2) La PEPC aumenta en actividad y cantidad durante el desarrollo de la simbiosis. Es posible que la cepa de *Rhizobium* CNPAF 512 que presenta una mayor capacidad de nodulación que las otras cepas estudiadas (CIAT 899 y CE3) presente una mayor actividad y cantidad de PEPC.

3) La actividad de PEPC se induce en forma más temprana y con tasas mayores que la actividad de la N_2 asa durante el desarrollo de la simbiosis. Se esperaría que en las tres cepas, la actividad de la PEPC anteceda a la actividad de la N_2 asa. Es posible que la cepa de *Rhizobium* CNPAF 512 que presenta mayor capacidad de nodulación que las otras cepas

estudiadas (CIAT 899 y CE3) promueva mayor actividad de la PEPC y N_2 asa.

4) El ciclo GS/GOGAT requiere de esqueletos de C para la asimilación del NH_4^+ , derivado de la N_2 asa. La PEPC puede aportar éstos esqueletos de C por lo que se esperaría una correlación alta entre las actividades de GS/GOGAT con la PEPC en plantas inoculadas con cualquiera de las tres cepas de *Rhizobium* estudiadas.

5) La PEPC aporta esqueletos de C para la síntesis de ureidos (que distribuyen el N del nódulo a resto de la planta). Se esperaría que hubiera una alta correlación entre la actividad de PEPC y el transporte de ureidos en plantas inoculadas con cualquiera de las tres cepas de *Rhizobium* estudiadas.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Evaluar el papel de la PEPC en la fijación de N_2 , asimilación del NH_4^+ , el transporte de ureidos y el crecimiento de la planta durante la simbiosis frijol-*Rhizobium*, utilizando tres cepas con capacidad de nodulación diferente.

Objetivos Específicos:

1) Evaluar el papel de PEPC en el establecimiento y desarrollo del nódulo y su relación con el crecimiento de las plantas inoculadas con tres cepas diferentes de *Rhizobium*.

2) Determinar la actividad y la cantidad de la PEPC y su relación con la actividad de la N_2 asa durante el desarrollo de plantas inoculadas con tres cepas diferentes de *Rhizobium*.

3) Definir si la actividad de la PEPC contribuye en el aporte de sustratos para las enzimas GS/GOGAT que catalizan la asimilación de NH_4^+ en el nódulo de plantas inoculadas con tres cepas diferentes de *Rhizobium*.

4) Analizar el transporte de N en forma de ureidos y su relación con PEPC y N₂asa durante el desarrollo de las plantas de frijol inoculadas con tres cepas diferentes de *Rhizobium*.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental seguida para cumplir con los objetivos propuestos en la presente tesis se ennumeran a continuación y se resumen en el Cuadro 1.

1) Germinar semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L) cv Negro Jamapa e inocularlas con tres cepas diferentes: *Rhizobium etli* CE3, *R. tropici* CIAT 899 y *R. leguminosarum* bv *phaseoli* CNPAF 512.

2) Cuantificar a los 8, 10, 12, 15, 18 y 24 días después de la inoculación (DDI) los siguientes parámetros:

- a) Crecimiento de las plantas
- b) Actividad y cantidad de PEPC
- c) Actividad de N_2 asa
- d) Actividad y cantidad de GS y GOGAT
- e) Transporte de ureidos

3) Determinar la actividad y la cantidad de PEPC en raíces de frijol no inoculadas. Inmunoprecipitar la proteína de raíz con anticuerpos anti-PEPC.

4) Analizar los polipéptidos de reacción a anticuerpos anti-ubiquitina en extractos de raíz y de nódulos inducidos con las tres cepas diferentes de *Rhizobium* antes mencionadas.

Tabla 1. Estrategia de trabajo propuesta en la presente tesis.

Semillas de frijol: cv. Negro Jamapa	Cepas de <i>Rhizobium</i> : CNPAF 512 CIAT 899 CE3	
Inoculación		
Simbiosis 8, 10, 12, 15, 18 y 24 DDI		
Análisis		
Parte aérea de la planta	Crecimiento	Peso fresco Area foliar Altura
Xilema	Ureidos	Transporte
Nódulo	Proteína	Proteína: soluble en gel.
	Actividades enzimáticas	N ₂ asa, PEPC, GS, GOGAT.
	Detección de polipéptidos con anticuerpos específicos	PEPC, GS, GOGAT, ubiquitina.
Raíz	Actividad enzimática	PEPC
	Detección de polipéptidos con anticuerpos específicos	PEPC, GS, GOGAT, ubiquitina.
	Inmunoprecipitación	PEPC, ubiquitina

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal

Se utilizaron semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Negro Jamapa, las cuales fueron esterilizadas en la superficie con una solución al 10 % (V/V) de hipoclorito de sodio comercial, por 5 minutos. Enseguida se lavaron con abundante agua destilada estéril. Las semillas fueron colocadas en charolas de aluminio sobre papel humedecido y crecidas en un cuarto oscuro a 27 °C por tres días para su germinación.

Cepas de Rhizobium

Las inoculantes utilizadas fueron las cepas: *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* CNPAF 512 (Hungria *et al.*, 1991), *Rhizobium tropici* CIAT 899 (Martínez-Romero *et al.*, 1991) y *Rhizobium etli* CE3 (Noel *et al.*, 1984). Por facilidad se designaron como: CNPAF 512, CIAT 899 y CE3 respectivamente. Su capacidad de nodulación en un experimento preliminar con frijol (*Phaseolus vulgaris*) cv. Negro Jamapa (Cuadro 2). La cepa CE3 se consideró como control, debido a sus características fisiológicas presentadas en simbiosis (Cuadro 3).

La cepa de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* CNPAF 512 se hospeda en la planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Su origen geográfico es Goiania, Brasil. Se considera una cepa "precoz" debido a que las hojas de las plantas de frijol que nodula no presentan síntomas de deficiencia de N visibles (clorosis) (Hungria *et al.*, 1991).

La cepa *R. tropici* CIAT 899, pertenece al sub-grupo B, originalmente se hospeda en la planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Su origen geográfico es Colombia (Martínez-Romero *et al.*, 1991).

La cepa *R. etli* CE3 originalmente se hospeda en la planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Su origen geográfico es México. Esta cepa es una derivativa de la cepa silvestre *R. phaseoli* CFN 42. Es resistente a estreptomicina y nodula y reduce acetileno con la habilidad de la cepa silvestre (Noel *et al.*, 1984).

Tabla 2. Parámetros estimados para definir la capacidad de nodulación de cada cepa de *Rhizobium* estudiada en plantas de frijol cv. Negro Jamapa. El número de + refleja la velocidad relativa de cada parámetro.

Cepas de <i>Rhizobium</i>	Tiempo de nodulación	Cantidad de nódulos	Tamaño de nódulos
CE3	+	+	+
CIAT 899	++	++	++
CNPAF 512	+++	+++	+++

Tabla 3. Características del crecimiento de la parte aérea de las plantas de frijol cv. Negro Jamapa y de nódulos inducidos por las tres diferentes cepas de *Rhizobium* estudiadas.

Cepa de <i>Rhizobium</i>	Peso fresco de parte aérea (g/planta)	Peso seco de parte aérea (g/planta)	Peso seco de nódulos (mg/planta)
CE3	1.6	0.22	41.4
CIAT 899	3.38	n.d.*	53.6
CNPAF 512	3.38	0.42	52.6

* no se determinó Fuente: Ortega, 1992.

Condiciones de cultivo (invernadero)

Las semillas una vez germinadas se colocaron en macetas con vermiculita, se separaron en tres lotes y cada uno se inoculó con una cepa de *Rhizobium*. Las plántulas se cultivaron en invernadero en condiciones de fotoperíodo natural de 14 hrs luz/10 hrs oscuridad, con una temperatura promedio diaria de 25-30°C y con una humedad relativa de 45 %. Las plantas se regaron cada tercer día con solución nutritiva MS (1962) sin N y alternativamente se regaron solamente con agua destilada.

Recolección de muestras

Las muestras de nódulos y material vegetal (parte aérea y xilema) se colectaron siguiendo una cinética de crecimiento para cada una de las cepas de *Rhizobium* utilizadas. Las muestras se recolectaron a los días: 8, 10, 12, 15, 18 y 24 después de la inoculación (DDI) de las raíces de las plantas de frijol. El material recolectado fué almacenado a -70°C hasta su análisis.

Control

Se utilizaron dos sistemas de control: 1) semillas de frijol germinadas por siete días en la oscuridad (ver Material vegetal). El hipocotilo se recolectó y se guardó a -70°C hasta su análisis; y

2) semillas de frijol germinadas por tres días en la obscuridad y posteriormente sembradas en vermiculita. La fertilización se realizó cada tercer día con solución nutritiva MS (1962) adicionada con N [10 mM nitrato de potasio, KNO_3 y 2mM sulfato de amonio, $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$]. Estas plantas se cultivaron en las mismas condiciones de invernadero que las plantas inoculadas. Se realizaron colectas de material vegetal a los: 8, 10, 12, 15, 18 y 24 días después de su siembra en macetas con vermiculita y se guardaron a $-70\text{ }^\circ\text{C}$ para su análisis.

Determinación de crecimiento

Como parámetros de crecimiento se determinó el peso fresco, la talla y el área foliar de la parte aérea de las plantas inoculadas con cada cepa de *Rhizobium* a lo largo de la cinética de desarrollo. La determinación de la talla se tomó midiendo en centímetros (cm) la parte aérea de la planta desde el nivel de la corona (nodo cotiledonar) hasta la punta de la última hoja producida por la planta. La determinación de peso fresco se realizó de la siguiente forma: inmediatamente después de registrar la altura de la parte aérea de la planta se tomó su peso en una balanza digital. Una vez registrados los datos de altura y de peso fresco de la parte aérea de las plantas se determinó el área foliar. Se cortaron las hojas (lámina sin peciolo) de cada planta y a cada par de hojas opuestas se les tomaron fotocopias para el posterior análisis de su área foliar. Este parámetro se

determinó mediante la fórmula de área de un triángulo (forma similar a la hoja de la planta de frijol).

Extracción de proteínas

Todos los procedimientos de extracción se llevaron a cabo a 4°C, a menos que se contraindique. Muestras de raíz (2 g) y de nódulos (1g) fueron macerados en un mortero con nitrógeno líquido y adicionados con 20 % y 2 % (P/P) de PVPP para raíz y nódulos, respectivamente. El tejido se incubó hasta alcanzar la temperatura ambiente (27°C). Inmediatamente se homogenizó en 3 vol (P/V) de buffer de extracción. El buffer de extracción consistió en 50 mM Tris-HCl pH 7.8, 5 mM EDTA, 10 % glicerol, 10 % etilenglicol, 1 mM PMSF y 1 mM DTT. El homogenado fué centrifugado por 20 min a 20,000 g. El sobrenadante contenía la parte soluble vegetal y fué utilizado para los análisis de proteínas totales, y cantidad y actividades enzimáticas del metabolismo de N (GS) y de C (PEPC).

En el caso de raíces, debido a la baja actividad de la PEPC en éstos tejidos, se decidió concentrar la enzima en el extracto realizando una precipitación con $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ en un porcentaje de saturación entre 40-60 %. Los extractos fueron desalados contra buffer de extracción Tris-HCl 50 mM pH 7.8, en columnas de Sephadex G 50, antes de los análisis de actividades enzimáticas y determinaciones de proteína.

Actividades enzimáticas

N₂asa

La actividad de N₂asa se determinó por el procedimiento de reducción de acetileno. Se colocó el sistema radicular de las plantas inoculadas en botellas de vidrio de 250 mL enriquecido con una una atmósfera de 10 % de acetileno. Las raíces inoculadas se incubaron durante 45 minutos. La concentración de etileno (C₂H₄) producido se determinó en un cromatógrafo de gases con detector de ionización de flama (Varian). La actividad de N₂asa se expresó como nmol de C₂H₄ producido por hora por planta.

PEPC

La actividad de PEPC se determinó espectrofotométricamente acoplado el ensayo a la malato deshidrogenasa (MDH) y se analizó la oxidación del NADH a 340 nm, como está descrito para la enzima de frijol (Deroche *et al.*, 1983). La mezcla de reacción consistió en 100 µmol Tris-HCl pH 7.8, 2.5 µmol PEP, 5 µmol HCO₃, 5 µmol MgCl₂, 100 nmol NADH y 5 unidades de MDH (Sigma), en un volumen final de 1 mL. La reacción fué iniciada por la adición de PEP. Las muestras con 10 µg de proteína de extracto de nódulo ó 20 µg de proteína de extracto de raíz enriquecido se utilizaron en el análisis de la

actividad de la PEPC. El blanco consistió de la mezcla de reacción excepto el sustrato. Una unidad de actividad enzimática está dada por la cantidad de enzima requerida para producir 1 μmol de oxaloacetato por minuto a 22°C.

GS

La actividad de GS se determinó por el ensayo de transferasa (Ferguson and Sims, 1974). Una unidad de actividad equivale a 1 μmol de g-glutamil hidroxamato formado por minuto a 30°C.

GOGAT

Para la extracción de esta enzima se utilizó buffer de fosfatos 50 mM pH 7.5. La enzima se analizó con 100 μg de proteína de extracto de nódulo en un volumen de reacción final de 1 mL. La mezcla de reacción consistió en 100 mM K_2HPO_4 pH 7.5, 1 % b-mercaptoetanol y 1.0 mM oxoglutarato. La reacción se monitoreó por la oxidación de NADH a 340 nm a 30°C. La reacción inició con la adición de 5 mM de L-glutamina (Hungria *et al.*, 1991). El blanco consistió de mezcla de reacción sin adición del sustrato (gln). Una unidad de actividad equivale a producir 1 μmol de glutamato formado por minuto a 30°C.

Proteína total soluble

Se determinó la concentración de proteína total soluble (PTS) en los extractos de raíz y de nódulo para cada cepa de *Rhizobium* analizada durante la cinética. La PTS se determinó se determinó por el método de Bradford (1976), utilizando una curva de calibración con albúmina (BSA) como estándar de proteína. La proteína también se analizó mediante geles de poliacrilamida al 10 %, mediante su tinción con el colorante azul de Coomassie.

Las actividades enzimáticas y la concentración de polipéptidos detectados con anticuerpos específicos se analizaron en función de la PTS en la raíz y en el nódulo.

Ureidos

La savia del xilema del tallo se colectó siguiendo la cinética de desarrollo del nódulo. Los tallos de las plantas de frijol se cortaron por debajo del nodo cotiledonar e inmediatamente se colocó una manguera de plástico cuyo diámetro interno igualara al diámetro del tallo. La savia se recolectó a las 12:00 P.M., durante 30 minutos. Las muestras se almacenaron a -70°C hasta su análisis. La concentración de ureidos se determinó espectrofotométricamente a 535 nm, monitoreando la producción del ácido glioxílico según el protocolo descrito por Vogel and Van der Drift (1970).

Electroforesis

La composición de los diferentes polipéptidos se determinó de extractos de nódulos y de raíz. Los extractos de nódulo y de raíz crudos y dializados, respectivamente, se cargaron en geles de poliacrilamida al 10 % (para GS) y 8 % (para PEPC y GOGAT) en condiciones desnaturalizantes (Laemmli, 1970). Las electroforesis se llevaron a cabo en un sistema mighty small a temperatura ambiente (27 °C) por 1 hr a 90 V. Después de la separación de los polipéptidos por su peso se procedió a su transferencia a membranas inmobilón-P.

Transferencia de proteínas

Una vez que las proteínas se distribuyeron en el gel, se procedió a transferirlas a un soporte sólido, membrana inmobilón-P (PVDF) la cual se colocó sobre el gel y ambos se cubrieron entre dos hojas de papel Whatman No. 1. El paquete se sujetó entre un par de mallas de plástico y hules espuma con cierta presión. Este dispositivo se colocó dentro de una cámara de transferencia en un sistema líquido, donde a través de carga eléctrica (400 mA, corriente constante) se transfirieron las proteínas. Las transferencias se llevaron a cabo por 2 h a 4°C.

Técnica de inmunodetección (western blot)

Para detectar los diferentes polipéptidos se utilizó la técnica de inmunodetección (Towbin *et al*, 1979). Una vez obtenidas las membranas con los polipéptidos, se procedió a la tinción de la membrana con una solución de Ponceau, para marcar los estándares de peso molecular. La membrana se enjuagó con abundante agua destilada para eliminar el exceso de colorante y se incubó con el primer anticuerpo, anti-PEPC (anticuerpo policlonal mono específico contra la PEPC de nódulo de frijol) por 1 h a 25°C; se realizaron 2 lavados por 1 minuto y 3 lavados por 5 minutos, con una solución de TBS (10 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl y 0.1 % Tween 20). Se incubó durante 1 h con el anticuerpo secundario (IgG de conejo-AP) acoplado a la fosfatasa alcalina (Boehringer), utilizada como sistema de detección. Para la reacción se requieren como sustratos NBT (Nitrobluetetrazolium) y BCIP (5-bromo, 4-cloro, 3-indolfosfato) los cuales producen un precipitado de color violeta. En el análisis final los productos de color violeta caracterizan a los polipéptidos estudiados.

Análisis de polipéptidos

Análisis de PEPC.

Para detectar la PEPC se utilizaron anticuerpos anti-PEPC de nódulos de alfalfa (*Medicago sativa*) (Miller *et al.*, 1987), generosamente proporcionados por el Dr. Carroll Vance (Universidad de Minnesota). Estos anticuerpos fueron previamente inmunopurificados contra la PEPC inmovilizada y parcialmente purificada de nódulos de frijol (Ortega, 1992), con lo cual se generaron anticuerpos anti-PEPC policlonales monoespecíficos.

Análisis de GS.

Los componentes de la GS se detectaron con anticuerpos policlonales monoespecíficos anti-GS de nódulos de frijol (Ortega, 1992).

Análisis de la GOGAT

La GOGAT se detectó haciendo uso de anticuerpos policlonales monoespecíficos anti-GOGAT de haba (*Vicia faba*) y de nódulos de alfalfa. Donados generosamente por el Dr. Carroll Vance (Universidad de Minnesota).

Polipéptidos de ubiquitina

Para detectar los polipéptidos de reacción con anticuerpos anti-ubiquitina se corrieron extractos de raíz y de nódulos en geles de poliacrilamida al 8%. Se electrotransfirieron las proteínas a membranas inmobilon-P y se determinó si la banda de 112-kDa observada en extractos de raíz y en algunos extractos de nódulo, detectada con anticuerpos anti-PEPC, presentaba inmunoreacción con anticuerpos anti-ubiquitina. Los anticuerpos anti-ubiquitina se obtuvieron comercialmente de la casa Boehringer.

Técnica de inmunoprecipitación

A diferencia de los extractos de nódulo donde no fué necesario inmunoprecipitar la PEPC, en los extractos de raíz fué necesario inmunoprecipitar la proteína para poder observar la reacción con el anticuerpo anti-ubiquitina. Los extractos de raíz pasaron por una etapa de precipitación con $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, en un corte del 40-60 % (a 4°C) (Cuadro 4). Después de centrifugar por 10 minutos a 10 000 rpm, se recolectó el precipitado y se dializó en columnas de Sephadex G 50. Los extractos enriquecidos y dializados de raíz (150 mL), se inmunoprecipitaron con las siguientes concentraciones del anticuerpo anti-PEPC: 1, 2, 5, 10 y 20 mL, se agregó TBS hasta cubrir el volumen final (300 mL). El coctel de reacción se agitó y se dejó reaccionando toda la noche

(O/N) a 4°C. La muestra se centrifugó a 14 000 rpm por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante y el precipitado obtenidos se analizaron para la actividad de la PEPC y PTS. Se realizaron las inmunodetecciones con los anticuerpos anti-PEPC y anti-ubiquitina.

Tabla 4. Técnica de Inmunoprecipitación de extractos de raíz con anticuerpos anti-PEPC, para analizar la reacción con anticuerpos anti-ubiquitina.

Raíz (Sin inocular)	
Extraer Buffer 50 mM Tris-HCl pH 7.8	
Precipitar con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Corte entre 40-60 %	
Dializar G-50	
Precipitar con anticuerpos anti-PEPC 1, 2, 5, 10 y 20 μL	
Incubar O/N, 4°C	
Centrifugar 14,000 rpm, 4°C	
Sobrenadante	Análisis de proteínas totales
Precipitado	Actividad de PEPC
Gel poliacrilamida al 10 %	
Transferir por 2h a 400 mA a 4°C	
Inmunodetectar: anticuerpos anti-PEPC y anti-ubiquitina	

RESULTADOS

Crecimiento de las plantas no noduladas vs inoculadas.

Peso Fresco

El crecimiento de las plantas se analizó a través de los parámetros: peso fresco, área foliar y altura. Las plantas no noduladas mostraron una mayor acumulación de biomasa (peso fresco y área foliar) comparado con plantas inoculadas con cualquiera de las tres cepas CNPAF 512, CIAT 899 y CE3 (Figura 1 I). En etapas tempranas las raíces inoculadas con la cepa CNPAF 512, produjeron plantas con un peso de 1.5 g en el día 8 lo que representa 25 % mayor peso fresco que las plantas inoculadas con la cepa CIAT 899 y 50 % mayor peso fresco que las plantas inoculadas con la cepa CE3 (Figura 1 II). Esta tendencia se mantuvo durante el desarrollo de la cinética. En el día 12, la cepa CNPAF 512 indujo un incremento en el peso fresco en relación a las otras dos cepas de *Rhizobium* (Figura 1 II C). Las plantas inoculadas con la cepa CIAT 899, iniciaron con 0.75 g en su peso fresco de la parte aérea sólo hasta el día 15 se observó incremento en la velocidad de crecimiento (Figura 1 II B) y en el día 24 el valor de peso fresco fué similar al obtenido con las plantas inoculadas con la cepa CNPAF 512. Las plantas inoculadas con la cepa CE3 presentaron en el día 8 el valor de

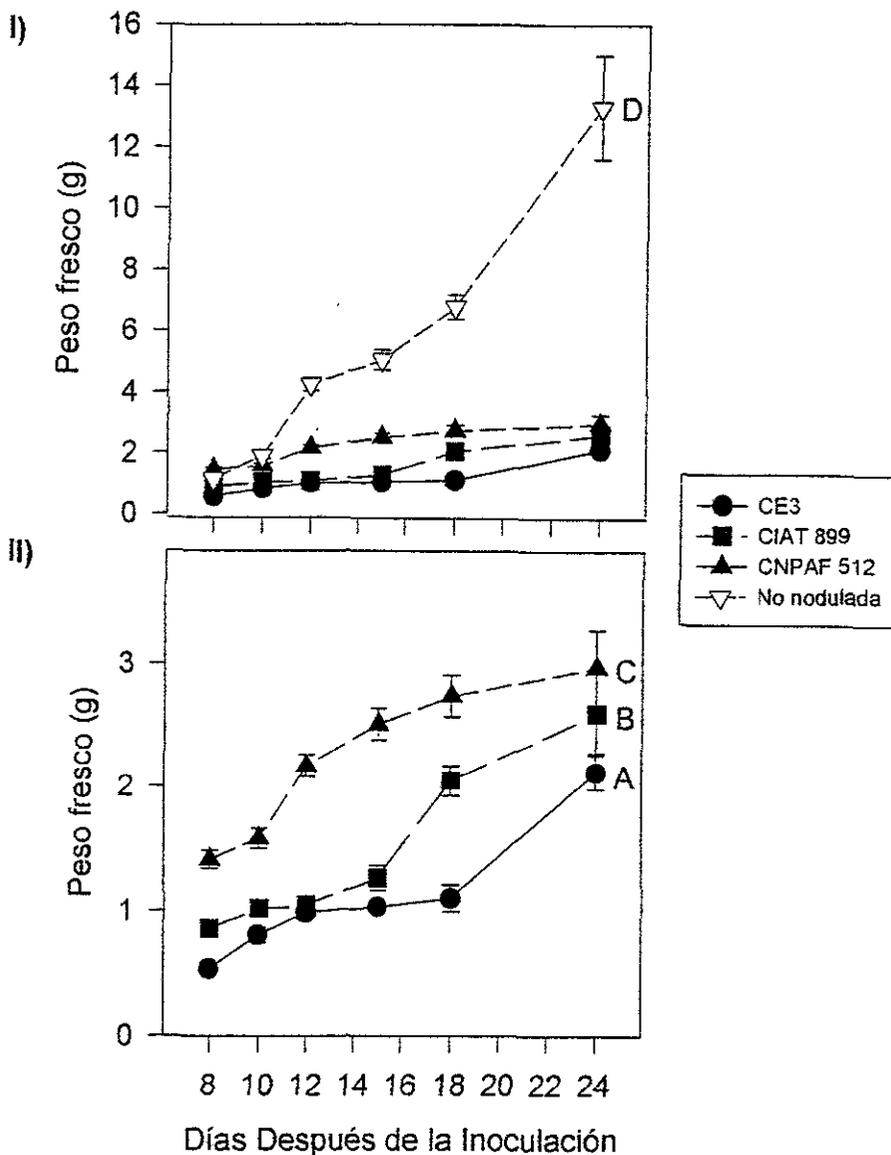


Figura 1. I) Peso fresco de la parte aérea de las plantas de frijol: no noduladas (D) vs inoculadas. II) Detalle de peso fresco de las plantas inoculadas con las cepas: (A) *Rhizobium etli* CE3, (B) *R. tropici* CIAT 899 y (C) *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* CNPAF 512. El experimento se llevó a cabo en un invernadero por 24 días. Las barras corresponden al error estándar de tres experimentos.

peso fresco más bajo (0.5 g) observado entre las plantas inoculadas. Durante el día 8 hasta el día 18 se observó un ligero aumento en el peso (Figura 1 II A) y sólo en el día 24 se observó un valor de 1.8 g, semejante al obtenido en las partes aéreas de las plantas inoculadas con la cepa CIAT 899.

En general se observó que: 1) las plantas inoculadas con la cepa CNPAF 512 presentaron un mayor incremento de peso fresco desde etapas iniciales del desarrollo del nódulo acentuándose en el día 12; 2) las plantas inoculadas con la cepa CIAT 899 presentaron valores de peso fresco intermedios y tardíos a la largo de la cinética; y 3) las plantas inoculadas con la cepa CE3, fueron las que presentaron el mayor retraso en peso fresco y sólo en el día 24 se presentó un incremento. Las plantas no noduladas mostraron mayor crecimiento que las plantas inoculadas con cualquiera de las tres cepas de *Rhizobium*. El peso fresco de la parte aérea fué de 4 g en el día 12 y de 13 g en el día 24 (Figura 1 I D).

Area Foliar

El área foliar también se determinó como parámetro de crecimiento presentado por las plantas no noduladas e inoculadas con las diferentes cepas de *Rhizobium*. Las determinaciones se realizaron en dos fechas: 18 y 24 DDI. Las

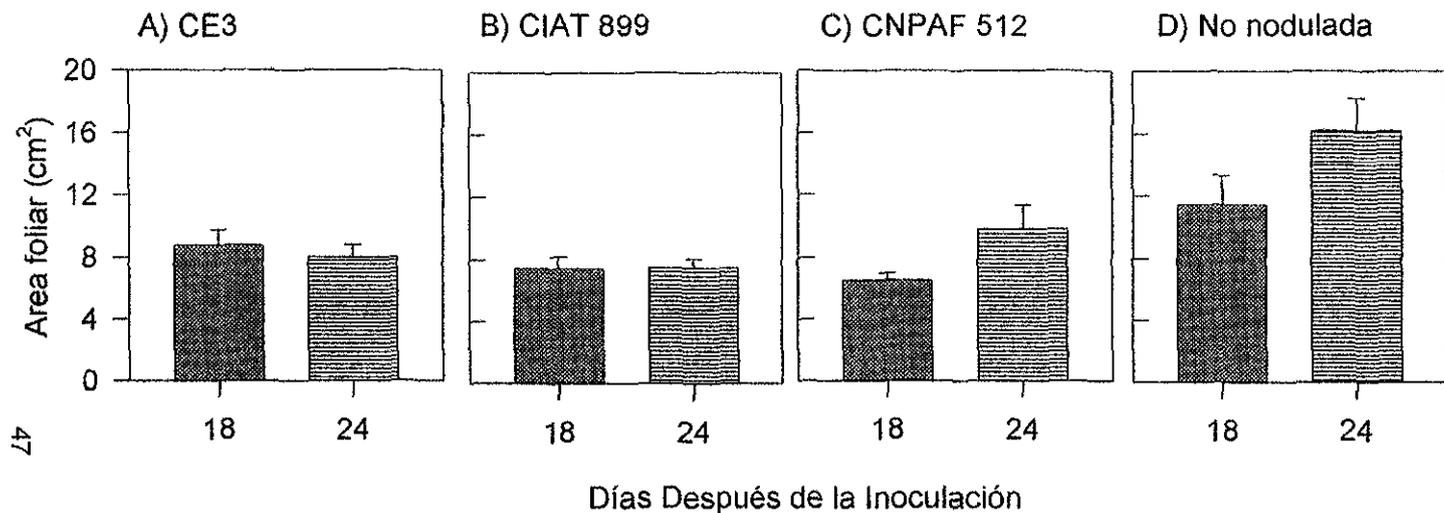
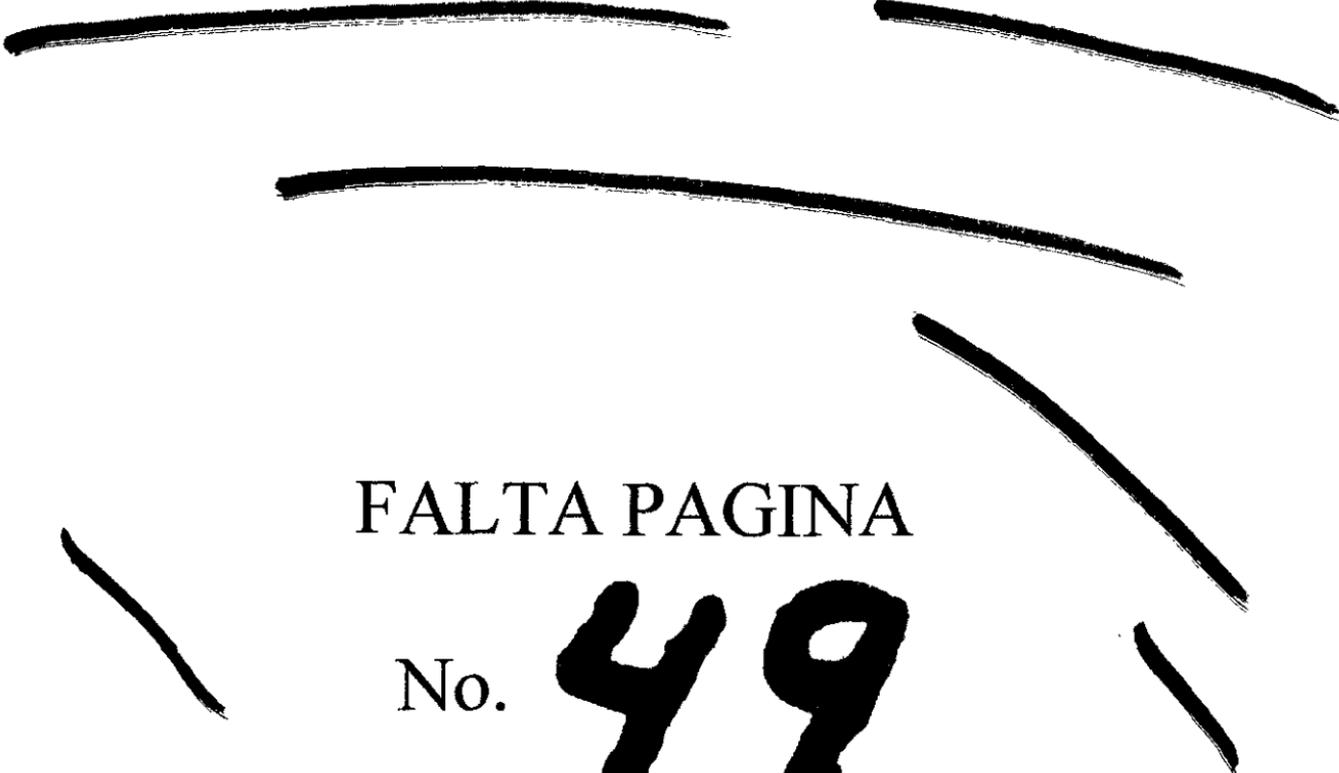


Figura 2. Area foliar de plantas de frijol inoculadas con las cepas: (A) *Rhizobium etli* CE 3, (B) *R. tropici* CIAT 899, (C) *R. leguminosarum* CNPAF 512; y (D) plantas no noduladas (D). Las barras corresponden el error estándar de 50 plantas.

plantas no noduladas utilizadas como control (positivo adicionada con N en forma de KNO_3 y $[\text{NH}_4]_2 \text{SO}_4$) presentaron los valores más altos de área foliar en relación a las plantas inoculadas con cualquiera de las tres cepas de *Rhizobium* (Figura 2). El área foliar de las plantas inoculadas con la cepa CNPAF 512 fué de 6.6 cm^2 al día 18 y de 10 cm^2 al día 24 (Figura 2 C). Esta misma tendencia de incremento en el área foliar la presentaron las plantas no noduladas (Figura 2 D). Las cepas CIAT 899 y CE3 produjeron áreas foliares menores a las observadas por la cepa CNPAF 512. En las plantas inoculadas con la cepa CIAT 899 se observó el mismo valor de área foliar en el día 18 y en el día 24 (7.5 cm^2) (Figura 2 B), éstos valores en promedio fueron intermedios entre los obtenidos con las cepas de *Rhizobium* CNPAF 512 y CE3. Las plantas inoculadas con la cepa CE3 presentaron mayor área foliar en el día 18 que en el día 24 (Figura 1 A).

Altura

La altura como un parámetro de crecimiento se determinó y se relacionó con los otros dos: peso fresco y área foliar (Figura 3). Las plantas inoculadas con la cepa CNPAF 512 (Figura 3 C), mostraron las mayores tallas (durante el desarrollo del experimento) entre las plantas inoculadas por las tres cepas de *Rhizobium* y las plantas no noduladas. Se observó que las

The image features several thick, black, hand-drawn scribbles that form a rough, irregular border around the central text. These scribbles are located at the top, bottom, and sides of the page.

FALTA PAGINA

No.

49

plantas presentaron inicialmente tallas de 10 y 11.5 cm en los días 8 y 10 y luego se incrementaron en forma importante con valores de: 15-18.5 cm en los días 12-18, en el día 24 se presentaron valores de 23 cm. En la etapa inicial de la cinética la altura de las plantas inoculadas con la cepa CIAT 899 fué intermedia entre las plantas inoculadas con las cepas CNPAF 512 y CE3 (Figura 3 B). La talla de las plantas en el día 8 fué de 7.8 cm y se presentó un ligero incremento hasta el día 18, sin mayores cambios en la etapa intermedia. Se presentó un incremento importante hasta el día 24, donde se obtuvo una altura promedio de 17 cm. Sin embargo, las hojas presentaron la misma área foliar (Figura 2 B). La cepa CE3 indujo plantas con las tallas más bajas (Figura 3 A) desde el día 8 (4.5 cm), con pequeños incrementos en los días 10-15 y manteniéndose las plantas con tallas de 10 cm hasta el día 24 mientras que el área foliar disminuyó en el mismo tiempo (Figura 2 A).

La altura de la parte aérea de las plantas no noduladas a diferencia del incremento en peso fresco y área foliar presentaron valores semejantes a los registrados para las plantas inoculadas con la cepa CNPAF 512 (Figura 3 D y C). Al día 8 se observó en promedio una altura de 5 cm en plantas no noduladas (50 % menor del valor obtenido el mismo día en las plantas inoculadas con la cepa CNPAF 512). En los días 15-24 se presentó el mismo valor de altura entre las plantas no noduladas y las inoculadas con ésta cepa de *Rhizobium*. La diferencia en altura de las

plantas no noduladas se presentó desde el día 8 con valores bajos y llegó a alcanzar al final de la cinética los valores más altos de altura y de área foliar (Figura 2 D).

Actividad de N_2 asa durante el desarrollo del nódulo

La actividad de la N_2 asa en los nódulos inducidos por la cepa CNPAF 512 se detectó desde el día 8 y se incrementó gradualmente hasta el día 18 con valores promedio de 270 nmol C_2H_4 /h/planta, hasta valores en el día 24 de 450 nmol C_2H_4 /h/planta. Se observó una inducción positiva en la actividad de la N_2 asa en dos etapas del desarrollo: en el día 10 y en el día 24 (Figura 4 C). Se observó un comportamiento similar de la actividad de N_2 asa en los nódulos inducidos por la cepa CIAT 899. En el día 8 se detectó actividad de N_2 asa que se incrementó en el día 18 y en el día 24 se presentaron niveles semejantes a las obtenidos en los nódulos inducidos por la cepa CNPAF 512 (Figura 4 B y C). En los nódulos inducidos con la cepa CE3 la actividad de N_2 asa se detectó hasta el día 15 (20 nmol C_2H_4 /h/planta). Se observó un ligero incremento en la actividad de esta enzima en los días 18 y 24 (Figura 4 A). La actividad de N_2 asa en los nódulos producidos por esta cepa fué tardía y lenta y fué significativamente menor comparada con los valores de actividad obtenidos en los nódulos inducidos por las cepas CNPAF 512 y CIAT 899 (Figura 4 A, B y C). No se detectó

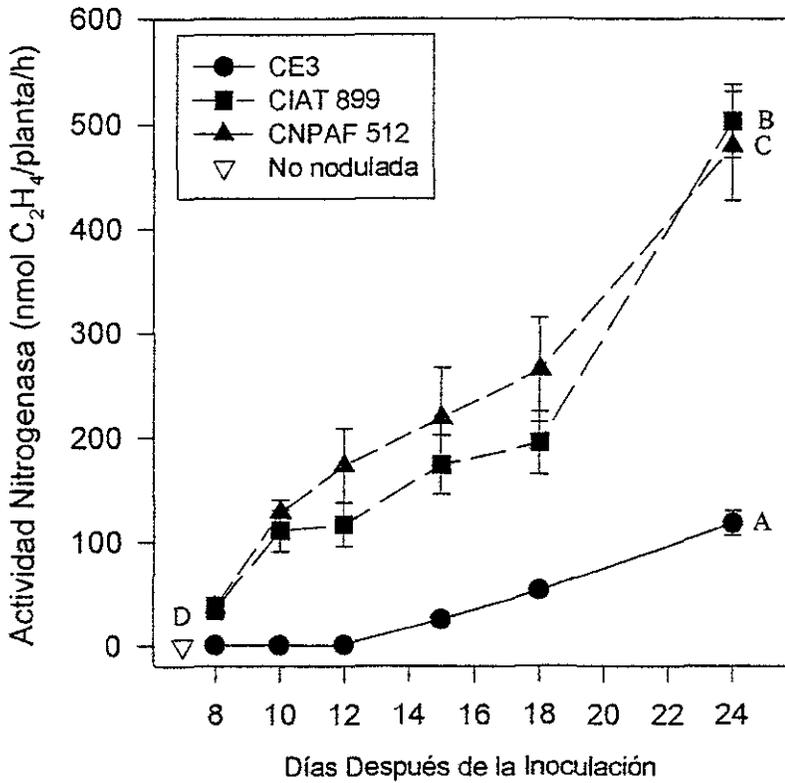


Figura 4. Actividad de Nitrogenasa en nódulos inducidos con las cepas: (A) *Rhizobium etli* CE3, (B) *R. tropici* CIAT 899 y (C) *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* CNPAF 512; y (D) raíces no inoculadas de 7 días. El experimento se llevó a cabo siguiendo una cinética de crecimiento de 24 días. Las barras corresponden al error estándar de tres experimentos.

Actividad de PEPC durante el desarrollo del nódulo.

La actividad específica de la PEPC se incrementó 5-veces en el día 8 en nódulos inducidos por la cepa CNPAF 512, en relación con la actividad en raíces de 7 días, no inoculadas (Figura 5 D). La actividad de la PEPC evidenció un temprano y rápido incremento durante el desarrollo de éstos nodulos (Figura 5 C), después la actividad de la PEPC permaneció constante (550 nmol/min/mg). En el día 24 se observó una ligera disminución en la actividad de la PEPC en forma lenta. En los nódulos inducidos por la cepa CIAT 899 (Figura 5 B) la actividad de la PEPC inició con valores 60 % menores en relación a la actividad en el mismo día en los nódulos inducidos con la cepa CNPAF 512. A partir del día 12 la actividad de la PEPC se incrementó en forma lenta pero significativa alcanzando la mayor actividad de fijación de CO₂ en el día 18, después disminuyó en forma rápida. La cepa CE3 promovió una actividad específica de la PEPC lenta y tardía en etapas tempranas del desarrollo del nódulo: día 8-12. En etapas intermedias (15 y 18 nódulos inducidos por la cepa CIAT 899 (390 nmol/min/mg) y en el día 24 bajó la actividad a 370 nmol/min/mg (Figura 5 A).

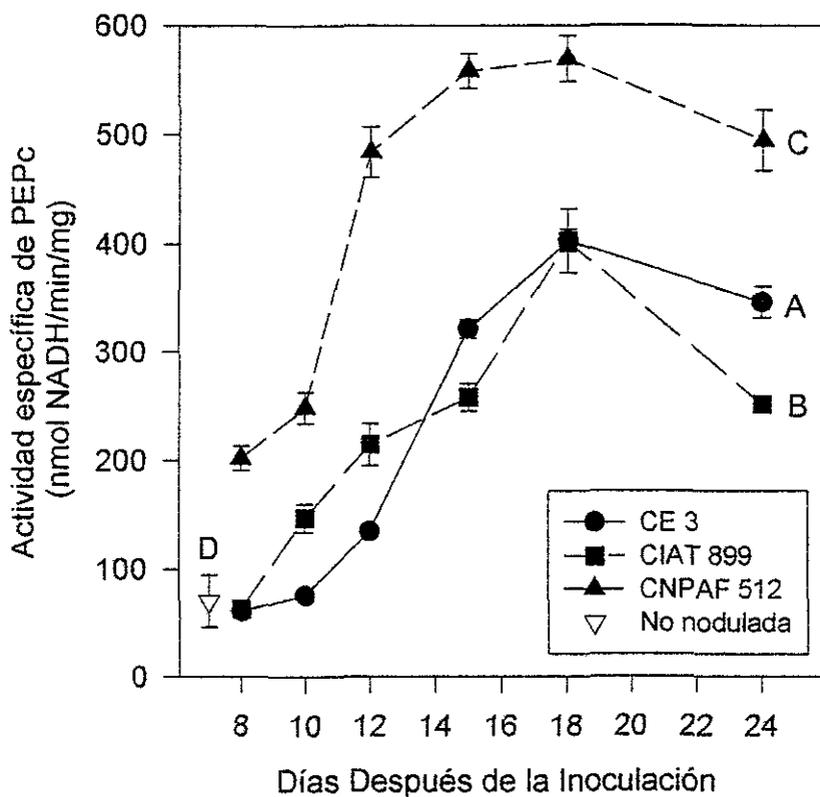


Figura 5. Actividad específica de la PEPC en raíces de plantas de frijol Negro Jamapa inoculadas con las cepas: (A) *Rhizobium etli* CE3, (B) *R. tropici* CIAT 899 y (C) *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* CNPAF 512, y (D) raíces no inoculadas. El experimento se llevó a cabo siguiendo una cinética de crecimiento de 24 días. Las barras corresponden al error estándar de tres experimentos.

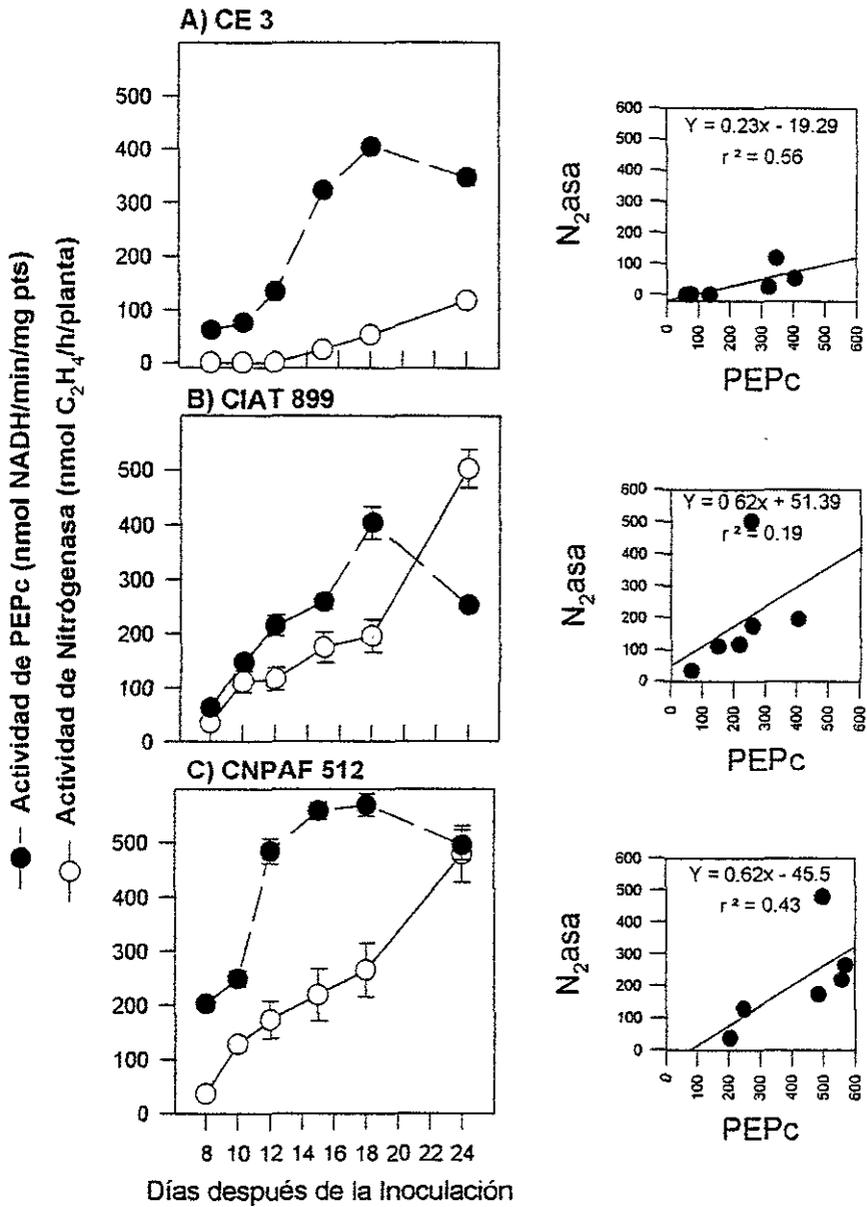


Figura 6. Actividades de PEPC y N₂asa y sus coeficientes de correlación durante el desarrollo de los nódulos inducidos en plantas de frijol por 24 días, inducidos con las cepas: (A) *Rhizobium etli* CE3, (B) *R. tropici* CIAT 899 y (C) *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* CNPAF 512. Las barras corresponden al error estándar de tres experimentos.

Transporte de Ureidos durante el desarrollo del nódulo

El transporte de ureidos en el xilema de las plantas inoculadas con la cepa CNPAF 512, inició en el día 10 y se incrementó tempranamente llegando a niveles de 130 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ xilema/planta/h en el día 18 después de la inoculación (Figura 7 C). En los nódulos producidos por la cepa CIAT 899 se observó un retraso en el transporte de ureidos en el xilema con respecto a los ureidos transportados en las plantas inoculadas con la cepa CNPAF 512. En el día 15 aumentaron significativamente los ureidos transportados. Para el día 18 se alcanzaron los mismos valores que las plantas inoculadas con la cepa CNPAF 512 (Figura 7 B y C). No se detectaron ureidos en el xilema de plantas inoculadas con la cepa CE3 en los días 8-12. En el día 15 se detectaron niveles de ureidos de 10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ xilema/planta/h. A partir de este día se observó un ligero incremento en el nivel de ureidos de estas plantas. En el día 18 el transporte de ureidos presentó sólo el 20 % de los ureidos transportados en las plantas que fueron inoculadas con las cepas CNPAF 512 y CIAT 899 (Figura 7 A). Se observó que el contenido de ureidos en el xilema se retrasó posiblemente debido a que la fijación de N_2 también se presentó en forma tardía (Figura 4 A).

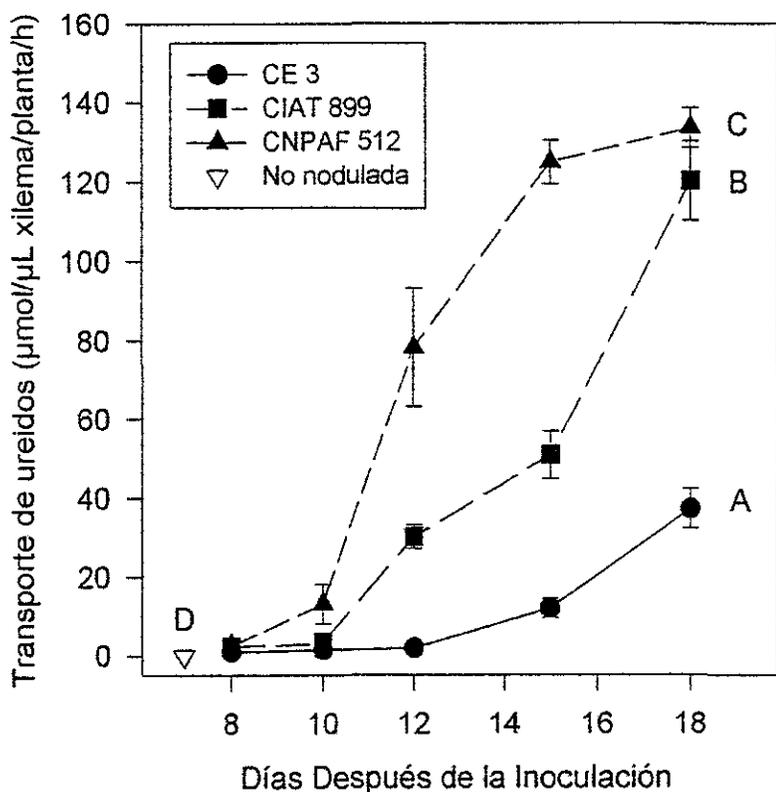


Figura 7. Transporte de ureidos en el xilema de plantas de frijol inoculadas con las cepas: (A) *Rhizobium etli* CE3, (B) *R. tropici* CIAT 899 y (C) *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* CNPAF 512. Las determinaciones se realizaron a las 12:00 P.M. El experimento se llevó a cabo siguiendo una cinética de crecimiento de 18 días. Las barras corresponden al error estándar de tres experimentos.

Polipéptido de la PEPC

PEPC en nódulos

La PEPC de nódulos de frijol por inmunodetección se presentó como una señal en el peso molecular aproximado de 106 kD (Figura 8). En el extracto de los nódulos inducidos por la cepa CNPAF 512, ésta banda se observó desde el día 8 y durante la cinética de desarrollo. La proteína en el día 8 fue menor y su concentración se incrementó durante el desarrollo del nódulo (período de 24 días, Materiales y Métodos) (Figura 8 II C). Se observó una correspondencia con la actividad de la PEPC que fué incrementándose a partir del día 8 hasta el día 15 y 18 (Figura 8 I C). La inmunodetección de la PEPC en extractos de nódulos inducidos por la cepa CIAT 899, reveló el mismo polipéptido que comigró con un peso de 106 kD, descrito para la cepa CNPAF 512. Sin embargo, la concentración de esta proteína permaneció constante, desde el día 8 hasta el día 24. Se observó una banda adicional al día 15 con un peso aproximado de 112 kD (Figura 8 II B). Esta banda se observó con menor intensidad que la de 106 kD, a partir del día 15 donde se observaron ambos componentes. En comparación la actividad de la PEPC se incrementó desde el día 8 hasta el día 18 (Figura 8 I B). El anticuerpo anti-PEPC reveló en extractos de nódulos producidos por la cepa CE3, la banda de 106 kD, la cual mostró un

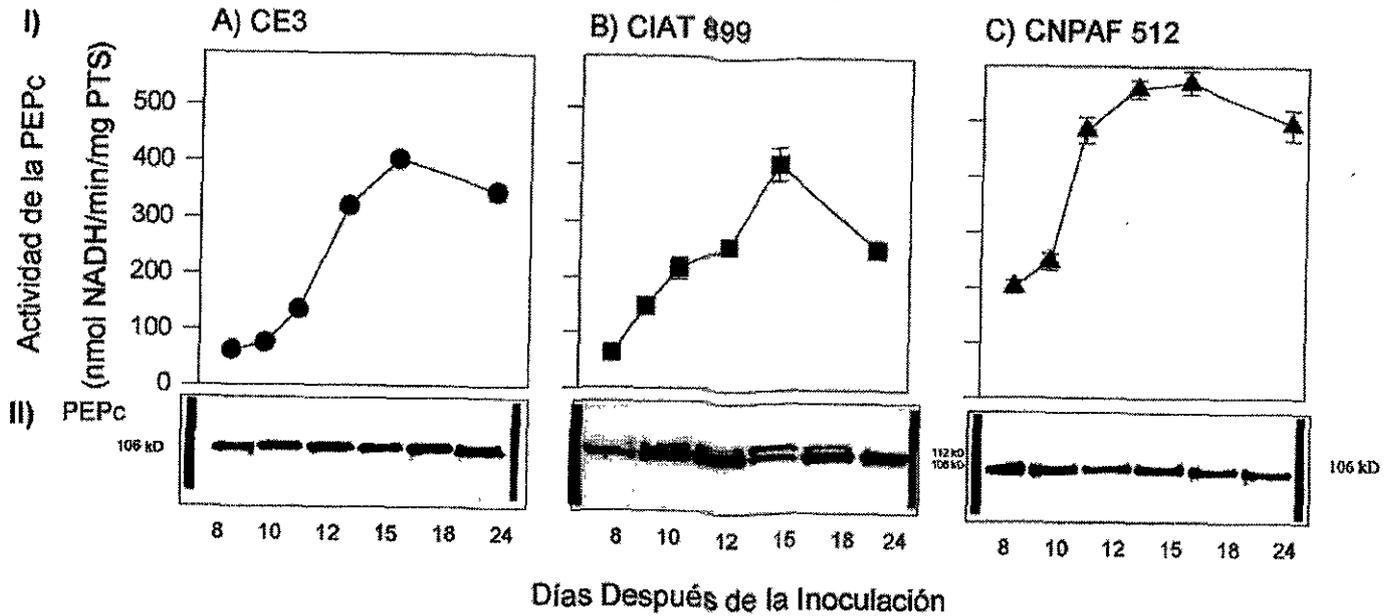


Figura 8. I). Determinación de la actividad de PEPc. II). Detección del polipéptido de la PEPc con anticuerpos policlonales mono-específicos anti-PEPc detectados en nódulos inducidos con las cepas: (A) *Rhizobium etli* CE3, (B) *R. tripci* CIAT 899 y (C) *R. leguminosarum* CNPAF 512. Cada carril se cargó con 25 µg de proteína total soluble (PTS). El experimento se llevó a cabo siguiendo una cinética de crecimiento de 24 días. Se muestran los estándares de peso molecular. Las barras corresponden al error estándar de tres experimentos.

incremento transitorio en su concentración. Al día 8 y 10 la proteína apenas fué visible pero se intensificó a los días 15 y 18, y permaneció con ésta intensidad hasta el día 24 (Figura 8 I A). La actividad fué incrementándose en forma rápida y en el día 15 alcanzó la mayor actividad durante la cinética de desarrollo.

PEPC en raíz

La actividad de la PEPC, fué 5 veces menor en raíz que en nódulos inducidos por la cepa CNPAF 512 (Figura 9 I). Extractos de raíz no inoculada, se utilizaron como referencia en el análisis del polipéptido de la PEPC en tejidos no fotosintéticos. La proteína de la PEPC en extractos crudos y dializados (por hidroxilapatita G-50) de raíz de 7 días, inmunoreaccionaron como dos polipéptidos con pesos de 106 y 112 kD en casi la misma proporción (Figura 9 II), los cuales también se detectaron para la PEPC en nódulos producidos por la cepa CIAT 899 (a partir del día 15). En contraste, la PEPC de nódulos producidos por la cepa CNPAF 512 produjo casi exclusivamente el polipéptido de 106 kD (Figura 9 II).

Inmunoprecipitación

Con el objeto de saber si la banda de 112 kD representaba una modificación por ubiquitinación del componente

de 106 kD, se analizó su reactividad contra anticuerpos anti-ubiquitina (Boehringer). Los extractos de raíz dializados y adicionados con 20 mL del anticuerpo anti-PEPC presentaron una disminución en la actividad de la PEPC en un 80 % de la actividad del extracto control (Figura 10 II). Se analizó la PEPC por el patrón de proteína siguiendo cada adición de concentración del anticuerpo y se observó como decrecía la actividad y la proteína de la PEPC (Figura 10 III). El inmunoprecipitado obtenido se cargó en un gel de poliacrilamida al 10 % y la proteína una vez transferida a la membrana se probó con los anticuerpos anti-PEPC y anti-ubiquitina. Los resultados mostraron que de las dos bandas detectadas con el anticuerpo anti-PEPC: 106 y 112 kD la banda de 112 kD, inmunoreaccionó aunque en forma ligera contra el anticuerpo anti-ubiquitina (Figura 10 IV).

Polipéptidos de reacción contra anticuerpos anti-ubiquitina en nódulos

En los extractos de los nódulos producidos con la cepa CE3 no se detectó inmunoreacción con el anticuerpo anti-ubiquitina durante el seguimiento de la simbiosis (Figura 11 A). Se analizaron extractos de nódulos inducidos por la cepa CIAT 899 y se observó que la banda de 112 kD que se presentó en el día 15 del desarrollo del nódulo, reaccionó con el anticuerpo anti-ubiquitina (Figura 11 B). Extractos de nódulos inducidos por

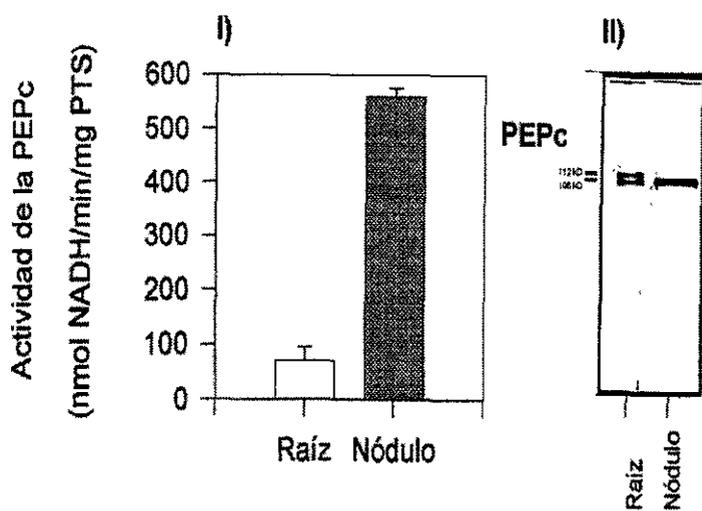


Figura 9. I). Actividad de la PEPC. II). Detección del polipéptido de la PEPC en extractos de raíces de 7 días no inoculadas y en nódulos de 15 días inducidos con la cepa *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* CNPAF 512. Se marcan los estándares de peso molecular. Las barras en actividad corresponden al error estándar de tres experimentos

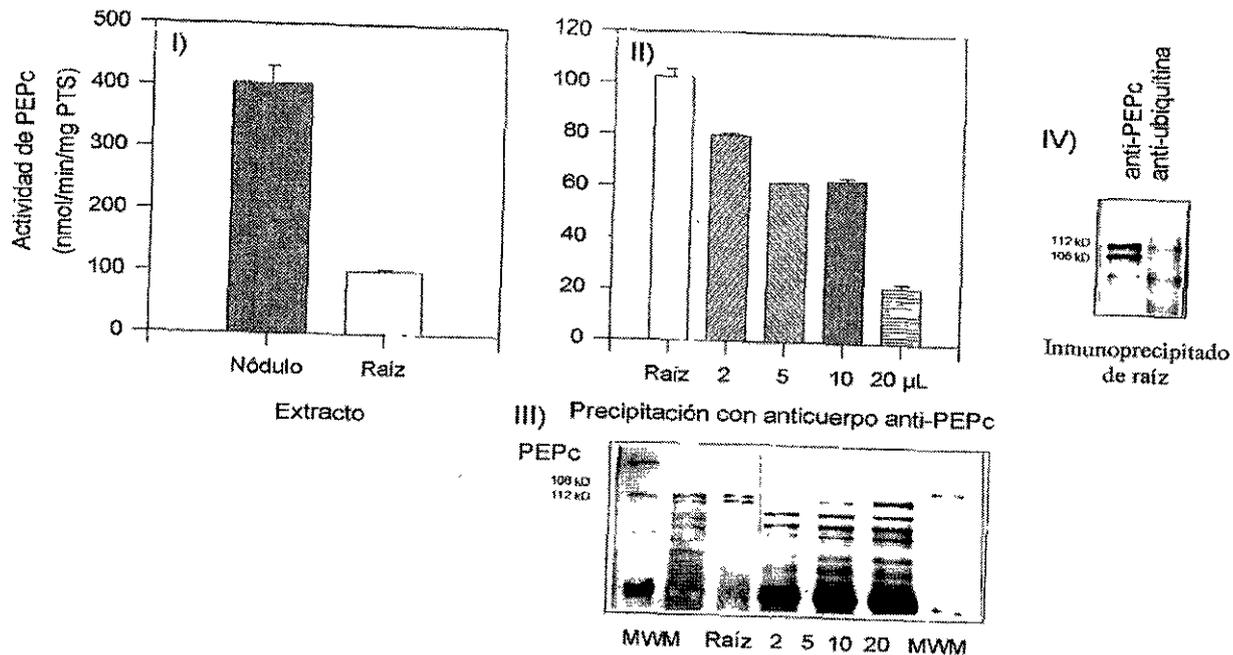


Figura 10. I) Actividad de la PEPc en extractos de raíz y de nódulos inducidos por la cepa *R. leguminosarum* CNPAF 512. II) Inmunoprecipitación de la actividad de la PEPc en extractos de raíz con 4 diferentes concentraciones del anticuerpo anti-PEPc (policlonal monoespecífico de la PEPc de nódulos de frijol). III) Proteína de la PEPc en extractos de raíz adicionando el anticuerpo anti-PEPc. IV) Proteína de la PEPc en extractos de raíz luego de la inmunoprecipitación, detectada con anticuerpo anti-PEPc y polipéptidos con reacción a anticuerpo anti-ubiquitina. Se marcan los marcadores de peso molecular (MWM).

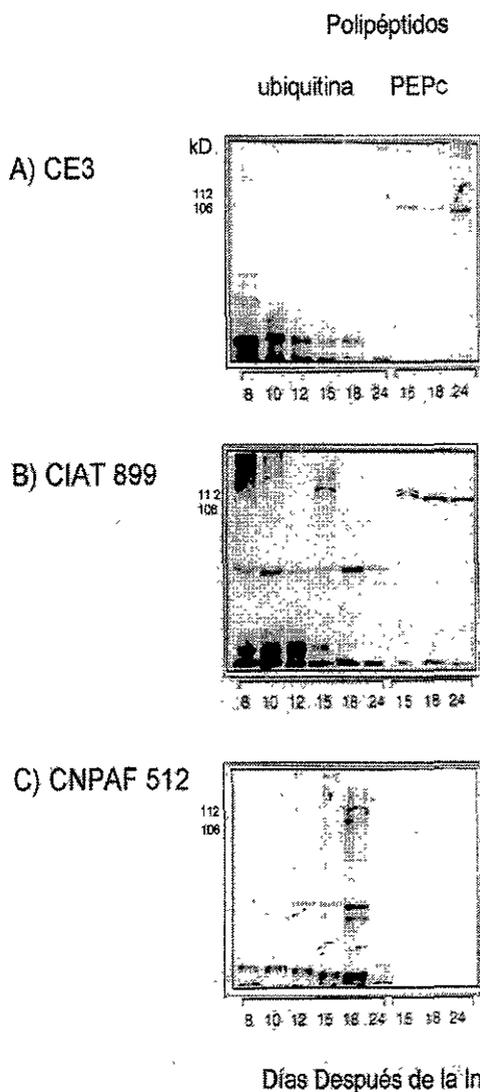


Figura 11. Inmuntodetección de polipéptidos de ubiquitina y PEPc en nódulos de plantas de frijol cv. Negro Jamapa inducidos con las cepas: (A) *Rhizobium etli* CE3, (B) *R. tropici* CIAT 899 y (C) *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* CNPAF 512. Las detecciones se realizaron durante el desarrollo del nódulo por 24 días para polipéptidos de ubiquitina. Para polipéptidos de PEPc sólo se marcan las últimas tres fechas de la cinética. Se marcan los estándares de peso molecular.

la cepa CNPAF 512 no se observó alguna banda de 112 kD que reaccionara con el anticuerpo anti-ubiquitina, durante el desarrollo de la simbiosis (Figura 11 C).

Actividad de GS y GOGAT durante el desarrollo del nódulo

En los nódulos inducidos por la cepa CE3, se observó un retraso en la actividad de la GS hasta el día 15, donde presentó un incremento importante alcanzando valores de 1.8 U. transferasa/min/mg en el día 15 y 18 (Figura 12 A). Estos nódulos presentaron los valores más bajos en actividad de GS presentados entre las tres cepas estudiadas. En los nódulos inducidos por la cepa CIAT 899 en la etapa inicial (día 8 después de la inoculación) se presentó valores bajos en actividad de la GS semejantes a los observados en los nódulos inducidos por la cepa CE3. Esta actividad se indujo en forma importante en el día 12 alcanzándose el mismo valor en actividad que los nódulos inducidos por la cepa CNPAF 512. La actividad de GS se mantuvo en estos valores hasta el día 18 (Figura 12 B). La actividad de la GS en los nódulos inducidos con la cepa CNPAF 512 inició temprana y rápidamente con incrementos graduales hasta el día 18 (Figura 12 C).

La actividad de GOGAT en nódulos se determinó durante 28 días (cepa CNPAF 512 y CE3) (Figura 13). La actividad de

GOGAT entre el día 8 al 15, fué semejante en los nódulos inducidos por las tres cepas: CNPAF 512, CIAT 899 y CE3 (Figura 13 A, B y C). En el día 18 iniciaron las diferencias en la actividad de ésta enzima entre las tres cepas. Los nódulos inducidos por la cepa CNPAF 512 presentaron dos etapas de inducción: en el día 15 y en el día 24. Se observaron valores de 23 nmol/min/mg PTS en el día 24 y llegaron a 30 nmol/min/mg en el día 28, fueron más altos que los valores obtenidos con los nódulos inducidos por la cepa CE3. La actividad de GOGAT más alta se reporta al día 18 en los nódulos inducidos por la cepa CIAT 899 (10 nmol/min/mg PTS) (Figura 13 B). La cepa CE3 presentó un retraso en la actividad de esta enzima en el día 24 se observaron valores de 10 nmol/min/mg PTS pero en el día 28 se detectaron actividades semejantes a las obtenidas con los nódulos inducidos por la cepa CNPAF 512 (Figura 13 A y C).

Proteína de la GS

El polipéptido de la GS se reveló como una banda de 40 kD en los nódulos inducidos por dos cepas de *Rhizobium*: CNPAF 512 y CIAT 899 (Figura 14). La detección se llevó a cabo durante el desarrollo de la nodulación. Se observó el mismo patrón de concentración del polipéptido de la GS a partir del día 10 al 24, en nódulos inducidos con las dos cepas CNPAF 512 y CIAT 899. Sin embargo, en el día 8 la actividad y la concentración

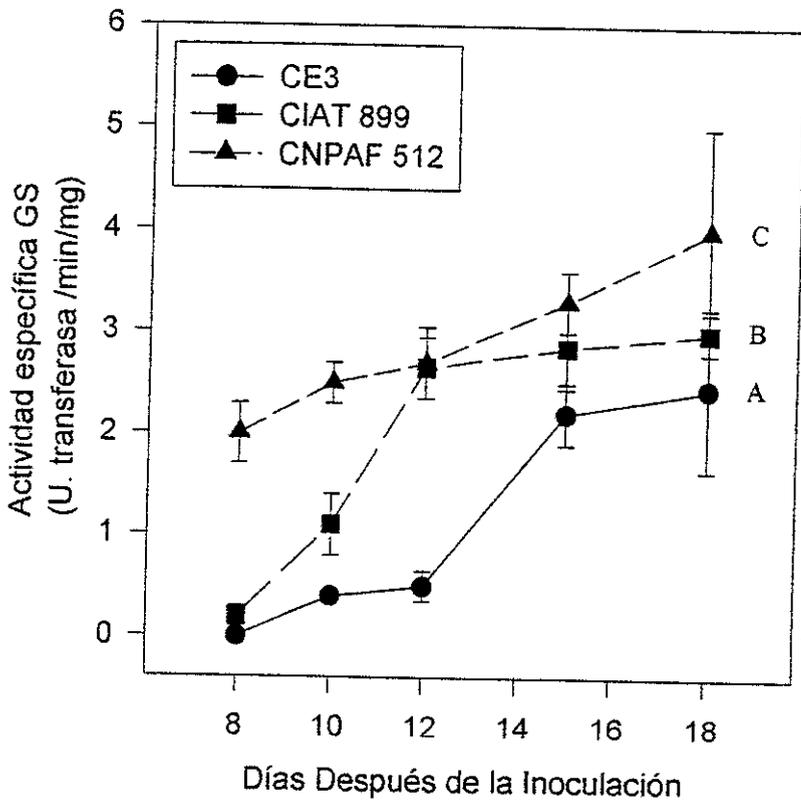


Figura 12. Actividad de GS en nódulos durante la cinética de su desarrollo por 18 días después de la inoculación de las raíces de plantas de frijol Negro Jamapa con las cepas: (A) *Rhizobium etli* CE3, (B) *R. tropici* CIAT 899 y (C) *R. leguminosarum* bv *phaseoli* CNPAF 512. Las barras corresponden al error estándar de tres experimentos.

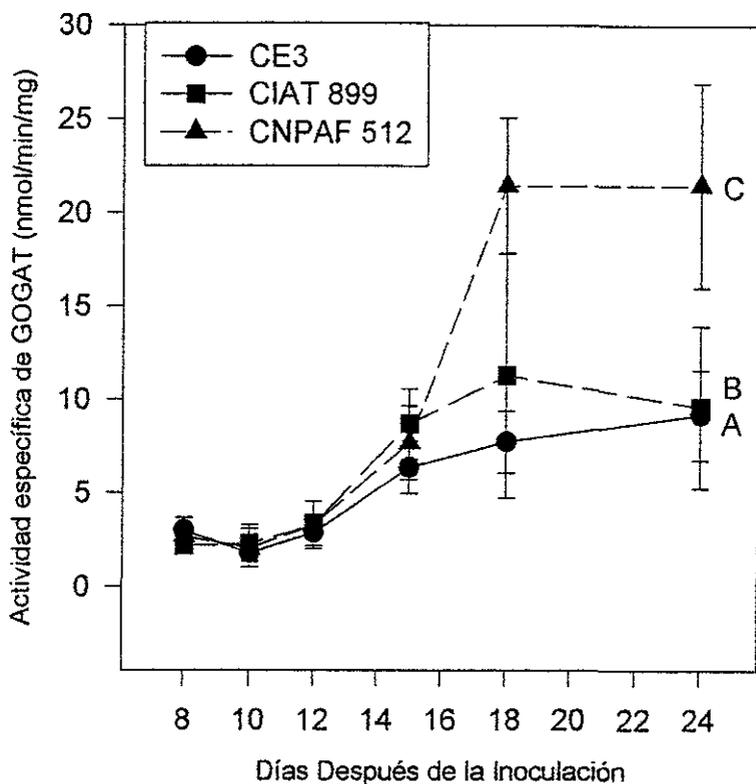


Figura 13. Actividad de GOGAT en nódulos de plantas de frijol Negro Jamapa inducidos por las cepas: (A) *Rhizobium etli* CE3, (B) *R. tropici* CIAT 899 y (C) *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* CNPAF 512. El experimento se llevó a cabo siguiendo una cinética de crecimiento de 24 días. Las barras corresponden al error estándar de tres experimentos.

de la proteína fué baja (Figura 14 A y B). En los días siguientes se observó la misma abundancia de proteína cargando 5 mg de proteína total soluble por carril.

Proteína de la GOGAT

El polipéptido detectado presentó un peso aproximado de 200 kD. Se observó que la proteína presentó una concentración mayor en los días donde se detectó la más alta actividad de la GOGAT (Figura 15 I y II). Este patrón se presentó para las tres cepas de *Rhizobium* estudiadas. Se observó poca proteína en el día 8, incrementándose en los días 10 al 18 y disminuyendo en el día 24 (Figura 15, II). En extractos de raíz no inoculada no se detectó el polipéptido de la GOGAT (dato no mostrado).

Concentración de proteína total soluble (PTS) en el nódulo

La proteína en extractos de nódulos inducidos por la cepa CNPAF 512 del día 8 al 18 permaneció constante con valores de 2.5 mg/mL; en el día 24 incrementó su cantidad hasta 6.3 mg/mL (se observó que en esta etapa algunas actividades enzimáticas declinaron, por lo que es pertinente considerar este cambio de cantidad de proteína). Los nódulos inducidos por la cepas CIAT 899 permanecieron prácticamente sin cambio, con un valor promedio de 2.3 mg/mL durante la cinética. Pero la cantidad de

proteína inducida por la cepas CE3 en los nódulos se indujo en forma importante a partir del día 10, alcanzando valores de 7 mg/mL en el día 18. A pesar a haber realizado una gran cantidad de extracciones la PTS alcanzó valores altos, con una alta variación. En cambio en los extractos de raíz no inoculada la cantidad PTS fué de 2.5 mg/mL (Figura 16).

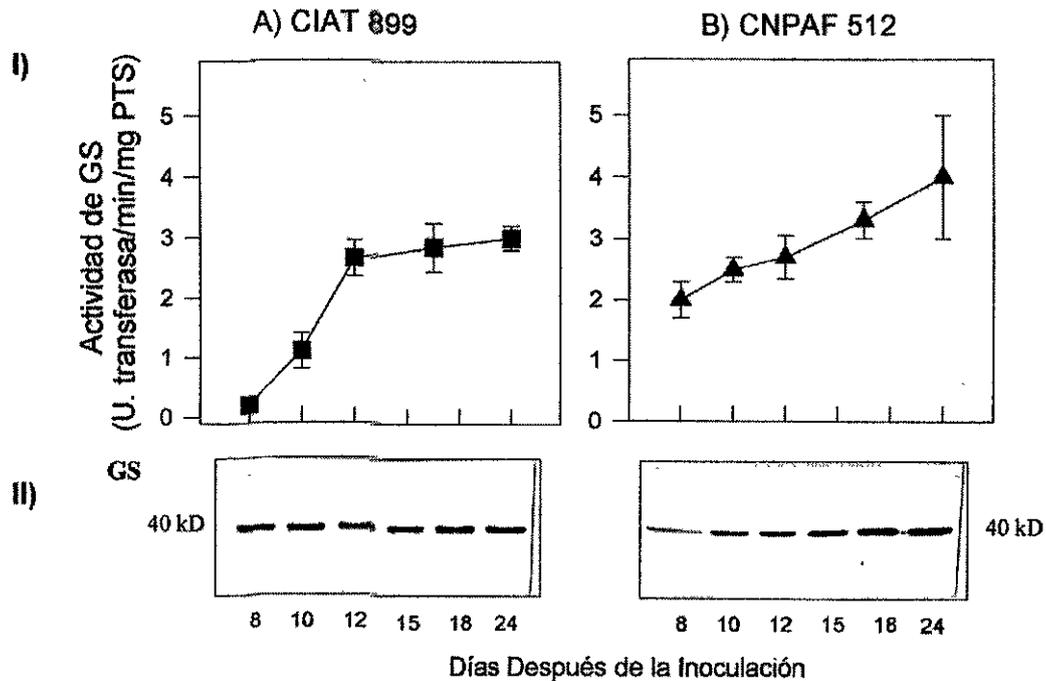


Figura 14. I) Actividad de la GS. y II). Detección del polipéptido de la GS con un anticuerpo policlonal mono específico de la GS de nódulos de frijol (Ortega, 1992), en nódulos inducidos con las cepas: (A) *Rhizobium tropici* CIAT 899 y (B) *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* CNPAF 512. El experimento se llevó a cabo siguiendo una cinética de crecimiento de 18 días. Las barras corresponden al error estándar de tres experimentos.

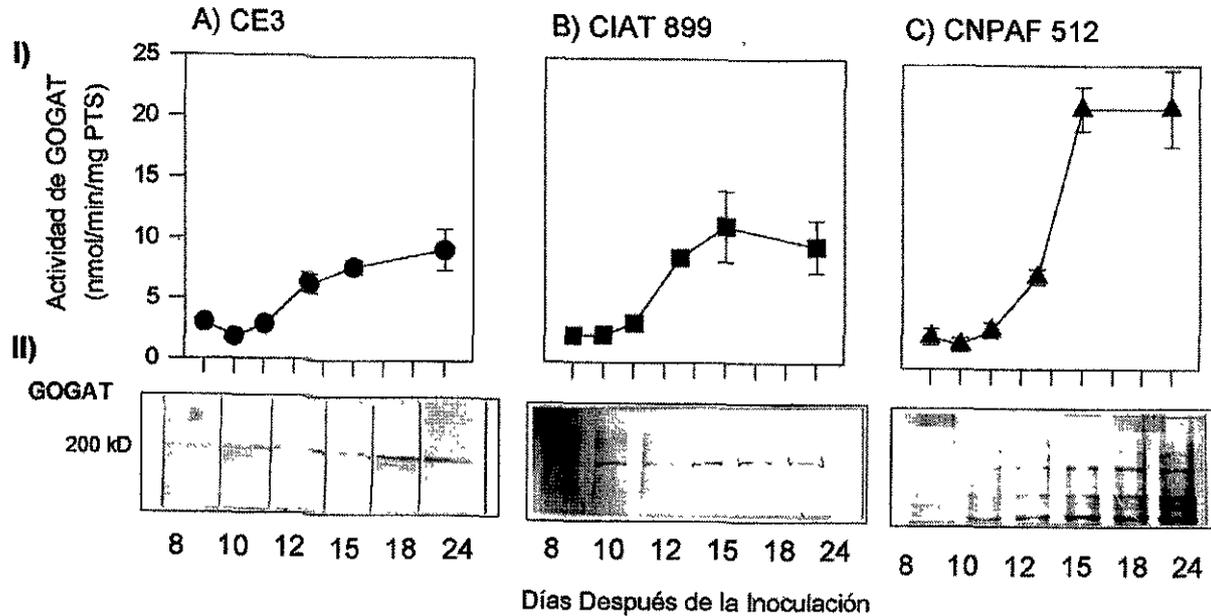


Figura 15. I) Actividad de la GOGAT. y II). Detección del polipéptido de la GOGAT con anticuerpos policlonales mono-específicos de la GOGAT de nódulos de alfalfa y haba en nódulos inducidos con las cepas: (A) *Rhizobium etli* CE3, (B) *R. tropici* CIAT 899 y (C) *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* CNPAF 512. El experimento se llevó a cabo siguiendo una cinética de crecimiento de 24 días. Las barras corresponden al error estándar de tres experimentos.

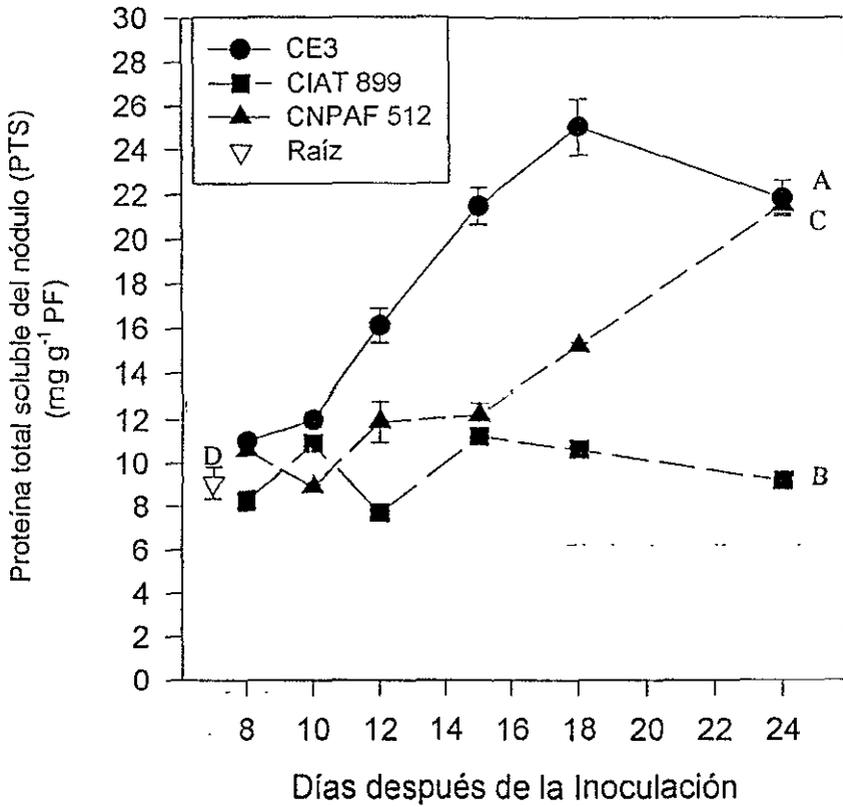


Figura 16. Concentración de proteína total soluble (PTS) por g de peso fresco de nódulos inducidos por las cepas: (A) *Rhizobium etli* CE3, (B) *R. tropici* CIAT 899 y (C) *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* CNPAF 512; y (D) raíces sin inocular. El experimento se llevó a cabo siguiendo una cinética de crecimiento de 24 días. Las barras corresponden al error estándar de tres experimentos.

DISCUSION

1) *Crecimiento de las plantas no noduladas vs. inoculadas*

El análisis de las plantas de frijol fertilizadas con N inorgánico y las desarrolladas con N proveniente de la fijación simbiótica nos permitió contrastar el crecimiento de las plantas crecidas a través de dos procesos diferentes de fertilización de N. Aunque es posible que el corto ciclo de crecimiento de las plantas de frijol limite la fijación simbiótica de N_2 (Hungria *et al.*, 1991).

Las plantas de frijol que se establecieron como control [fertilizadas con una fuente de N inorgánico: 10 mM KNO_3 + 2 mM de $(NH_4)_2 SO_4$ que representa una concentración 14.4 mM de N] presentaron mayor peso fresco y área foliar, que las plantas inoculadas con cualquiera de las tres cepas de *Rhizobium*, que al parecer fijan el equivalente a una concentración de 2 mM de N. El peso fresco al igual que la altura de la parte aérea de las plantas control alcanzaron los valores más altos en el día 24. El incremento en peso fresco de las plantas puede estar relacionado con el incremento en el área foliar más que con el contenido total de N en los diferentes tejidos de las plantas. Hungria *et al.* (1991), encontraron la misma acumulación de N en plantas de frijol nóduladas que en plantas cultivadas con una solución mineral de N. Sin embargo, la altura que se incrementó

en forma rápida presentó valores semejantes a los obtenidos con las plantas inoculadas con la cepa CNPAF 512.

El crecimiento de las plantas inoculadas varió de acuerdo a la cepa de *Rhizobium* estudiada (Anexo, Tabla 5). Las plantas de frijol inoculadas con la cepa CNPAF 512 presentaron mayor peso fresco, área foliar y altura que las plantas inoculadas con las cepas CIAT 899 y CE3. Resulta interesante que la cepa CNPAF 512 también indujo mayor nodulación que las otras dos cepas (Tabla 2). El patrón de peso fresco de las plantas fue similar al obtenido por Ortega (1992) para las tres cepas. Las plantas inoculadas con la cepa CIAT 899 mostraron valores de peso fresco y de altura intermedios entre los observados por las plantas inoculadas con las cepas CNPAF 512 y CE3. El área foliar en estas plantas no mostró ningún cambio. Las plantas que presentaron los valores de peso fresco y altura más bajos fueron las inoculadas con la cepa CE3. En cuanto al área foliar los valores fueron intermedios entre los obtenidos con las cepas CNPAF 512 y CIAT 899 (Anexo, Tabla 5).

Se ha reportado que la disponibilidad de C a través de la fotosíntesis sea un factor limitante para la fijación de N_2 . Sin embargo, se ha sugerido que durante el crecimiento temprano, el factor limitante puede ser el N y no el C (Hungria *et al.*, 1991). Es posible que cada cepa estudiada induzca una regulación diferente sobre el metabolismo de C y N en el nódulo y esto

influye el crecimiento de la planta (Hungria *et al.*, 1991) (Anexo, Figuras 4, 5 y 6).

El crecimiento en las plantas de frijol está relacionado con la cepa utilizada y se puede agrupar en: a) cepas que promovieron en las plantas un crecimiento temprano y rápido (CNPAF 512); y b) cepas que promovieron un crecimiento tardío y lento (CIAT 899 y CE3) (Anexo, Figuras 1, 2 y 3).

2) *Papel de la PEPC en el crecimiento de las plantas noduladas.*

Se detectó un incremento en la actividad de la PEPC anterior a cualquier cambio en el perfil de peso fresco y altura de las plantas inoculadas con las tres cepas de *Rhizobium*. Se presentó una correlación positiva entre la actividad de la PEPC y peso fresco (Anexo, Tabla 7). Los coeficientes de correlación fueron 0.89 para la cepa CNPAF 512, 0.87 para la cepa CIAT 899 y 0.7 para la cepa CE3. La cepa CNPAF 512 que presentó la actividad más alta de PEPC también presentó las mayores ganancias en peso fresco (Anexo, Tabla 5). Esto sugiere que el aporte de esqueletos de C (a través de la actividad de PEPC) para la fijación de N_2 , asimilación de NH_4^+ y el transporte de ureidos es importante para el crecimiento de plantas noduladas (Anexo, Figuras 1, 2 y 3).

Se ha reportado que la disponibilidad de fotosintatos es el mayor factor limitante en la fijación simbiótica de N_2 (Hardy and Havelka, 1977).

La actividad de la N_2 asa en los nódulos y el peso fresco de la parte aérea de la planta presentaron una correlación positiva para las cepas: CNPAF 512, CIAT 899 y CE3 (Anexo, Tabla 8). Los coeficientes fueron 0.81 para la cepa CNPAF 512, 0.84 para la cepa CIAT 899 y 0.89 para la cepa CE3. Se observó que las cepas CNPAF 512 y CIAT 899 indujeron las máximas actividades de N_2 asa y peso fresco de la parte aérea de las plantas (Anexo, Tabla 5). No se encontraron datos en la literatura sobre la correlación entre el crecimiento de las plantas noduladas con la actividad de N_2 asa.

La máxima actividad de la PEPC en nódulos de frijol inducidos con la cepa CNPAF 512 (Anexo, Tabla 5) es más alta que la reportada para nódulos de soya, lupinus y otras variedades de frijol aunque similar a la de nódulos de alfalfa (Vance *et al.*, 1983).

La inmunodetección de la proteína de la PEPC en el nódulo presentó una banda con un peso molecular de 106 kD. En los nódulos inducidos por las cepas CNPAF 512 y CE3 el polipéptido de PEPC presentó la misma intensidad durante el desarrollo de la simbiosis. Con la cepa CIAT 899 se detectó

además una banda adicional con un peso de 112 kD. Las dos bandas se detectaron en diferentes proporciones de acuerdo a la etapa de desarrollo del nódulo. La banda de 112 kD fue menos intensa que la de 106 kD. La intensidad de la banda de la PEPC dependió de la cepa utilizada como inoculante. Cuando se presentaron altas actividades de la PEPC no se observó cambio en la intensidad de la banda, lo cual indica que la regulación de la actividad puede ser por procesos post-traduccionales de la proteína (ej. fosforilación) (Jiao and Chollet, 1991; Schuller and Werner, 1993). Se observó que para la cepa CIAT 899 en el día 15 las actividades específicas de la PEPC y N_2 asa en el nódulo y el transporte de ureidos en el xilema presentaron una ligera segunda inducción.

En el análisis inmunológico, el polipéptido de la PEPC de nódulo se observó con mayor intensidad que en raíces. La inmunodetección de la PEPC en raíz mostró una banda doble en casi la misma proporción con pesos moleculares de 106 y 112 kD. El mismo patrón de bandas que se observó para la PEPC de nódulos inducidos con la cepa CIAT 899 (15 días). Existen reportes (Schulz *et al.*, 1993) donde se menciona que la PEPC puede marcarse para su posterior degradación a través de un proceso que involucra la ubiquitinación de la proteína. En extractos de raíz se presentó reacción de la banda de 112 kD con un anticuerpo anti-ubiquitina. Este proceso puede ser un nuevo mecanismo de regulación de la PEPC de nódulo bajo ciertas

ESTA TESIS NO DEBE
SER REPRODUCIDA

condiciones metabólicas en forma temporal. Es necesario realizar una inmunoprecipitación con anticuerpos anti-ubiquitina de extractos de nódulos de 15 días inducidos por la cepa CIAT 899 y de raíz.

No se observó reacción con el anticuerpo anti-ubiquitina de la banda de 112 kD con las otras dos cepas: CNPAF 512 y CE3.

3) *Papel de PEPC en el metabolismo de N.*

Papel de PEPC en la actividad de N₂asa en el nódulo.

La actividad de fijación de CO₂ (a través de la PEPC) y la actividad de fijación de N₂ en el nódulo de frijol estuvo relacionada con la cepa de *Rhizobium* y con la actividad de N₂asa. La actividad específica de PEPC en las cepas CNPAF 512, CIAT 899 y CE3 se indujo en etapas tempranas del desarrollo del nódulo, presentando la mayor actividad los nódulos inducidos con la cepa CNPAF 512 mientras las cepas CIAT 899 y CE3 promovieron actividades más bajas pero semejantes entre sí (Anexo, Tabla 5). En cambio, en nódulos de alfalfa la actividad de PEPC se indujo en etapas intermedias (día 17) (Vance *et al.*, 1989).

Las cepas CNPAF 512, CIAT 899 y CE3 promovieron un incremento en la actividad de PEPC que se presentó antes que cualquier incremento en la actividad de N_2 asa durante la cinética de desarrollo del nódulo (Anexo, Figuras 4, 5, y 6). Sin embargo, se ha observado que la inducción en la actividad de la PEPC fué posterior a la inducción en la actividad de N_2 asa en nódulos de alfalfa (Egli *et al.*, 1989; Vidal *et al.*, 1986). Mientras en nódulos de lupinus ambas actividades se inducen al mismo tiempo (Christeller *et al.*, 1977). Los resultados en la presente tesis sugieren que en frijol la actividad de la PEPC no requiere de la organogénesis del nódulo pero sí de algún factor asociado con la cepa de *Rhizobium*. Aunque en los nódulos inducidos con la cepa CIAT 899 la actividad de la PEPC fué más baja que en los nódulos inducidos con la cepa CNPAF 512 la actividad de la N_2 asa en ambas cepas fué similar. Los nódulos inducidos con la cepa CE3, con niveles semejantes en actividad de PEPC que la de nódulos inducidos con la cepa CIAT 899, presentaron los niveles más bajos de actividad de N_2 asa (Anexo, Figuras 4, 5, y 6). Nuestros resultados del tiempo donde se presentó el mayor incremento en actividad de N_2 asa es similar a la mayor actividad de reducción de acetileno (ARA) para nódulos de frijol inducidos con otras cepas de *Rhizobium* (Hungria *et al.*, 1991). A pesar de los bajos niveles en la actividad de N_2 asa se presentó actividad de PEPC, lo que sugiere que la presencia de la bacteria puede ser una señal para incrementar la actividad de PEPC. Se observó una correlación positiva entre la actividad específica de la PEPC

y la actividad de la N_2 asa en el nódulo para ésta especie que transporta ureidos (Anexo, Tabla 7). Los coeficientes de correlación fueron 0.43 para la cepa CNPAF 512, 0.19 para la cepa CIAT 899 y 0.56 para la cepa CE3. El cociente entre la actividad de PEPC/ N_2 asa fué de 1.16 para la cepa CNPAF 512 (Anexo, Tabla 6). La actividad de la PEPC inicialmente puede estar involucrada en proporcionar ácidos orgánicos para el establecimiento del nódulo y síntesis de aminoácidos. En estudios llevados a cabo sobre la fijación de $^{14}CO_2$ en nódulos aislados de haba (*Vicia faba*) se encontraron niveles inicialmente altos de radioactividad asociados con glutamato y aspartato y posteriormente con asparagina (Lawrie and Wheeler, 1975). Sin embargo, Coker and Schubert (1979), trabajando con raíces noduladas de soya expuestas a $^{14}CO_2$, observaron que la marca fué inicialmente incorporada en ácidos orgánicos con una subsecuente incorporación en aspartato y glutamato.

Se observó que la máxima actividad de la N_2 asa está asociada a una reducción en la actividad de la PEPC (Anexo, Figuras 4, 5 y 6). En nódulos de lupinus, manipulaciones que redujeron la actividad de fijación de N_2 causaron un concomitante decremento en la actividad de la PEPC (Laing *et al.*, 1979).

Durante el desarrollo del nódulo las enzimas de asimilación de N parecen estar más expresadas durante la organogénesis pero se inducen con la fijación de N. Se

presentaron correlaciones altas entre la actividad de la N_2 asa y la actividad específica de la GS de nódulo (Anexo, Tabla 8). Los coeficientes fueron 0.92 para la cepa CNPAF 512, 0.82 para la cepa CIAT 899 y 0.85 para la cepa CE3. La actividad de la GS se detectó en forma temprana y rápida (CNPAF 512, CIAT 899 y CE3) y antecedió a la detección de la actividad de N_2 asa. En los nódulos inducidos con la cepa CNPAF 512 se observó alta actividad de GS desde etapas tempranas. Se ha encontrado una alta actividad de GS en nódulos de soya, alfalfa, lupinus y otras variedades de frijol (Hungria *et al.*, 1991; Vance *et al.*, 1983). La actividad de la GS en los nódulos inducidos por las cepas CIAT 899 y CE3 se presentaron en forma tardía en paralelo a la actividad de la N_2 asa (Anexo, Figuras 4, 5 y 6). Se observó que con el inicio en la actividad de fijación de N_2 se indujo la actividad de la GS, lo que sugiere que la fijación de N es una señal para la actividad de la GS. La actividad de la GS en nódulos inducidos con la cepa CNPAF 512 fué detectada al inicio de la simbiosis. La actividad de la GS en nódulos inducidos en frijol fué baja en relación a la actividad presentada en nódulos efectivos de alfalfa (Vance *et al.*, 1983).

En los nódulos inducidos con la cepa CNPAF 512 la máxima actividad de GOGAT se presentó después de la máxima actividad de fijación de N_2 (Anexo, Tabla 5). Sin embargo, en los nódulos inducidos con las cepas CIAT 899 y CE3 la actividad de la GOGAT se indujo en la misma etapa que la actividad de la

N₂asa, se observó que con el inicio de la fijación de N₂ se indujo la actividad de ésta enzima. Se observaron correlaciones positivas entre la actividad específica de la GOGAT y la actividad de la N₂asa (Anexo, Tabla 8). Los coeficientes fueron los siguientes: 0.71 para la cepa CNPAF 512, 0.43 para la cepa CIAT 899 y 0.83 para la cepa CE3. El perfil en actividad de la GOGAT que obtuvimos para la cepa CNPAF 512 fué similar al obtenido por Hungria *et al.*, (1991). A través de altas actividades de N₂asa, GS y PEPC se producen moléculas de gln y α -ketoglutarato las cuales constituyen los sustratos para la actividad de la GOGAT (Anexo, Figuras 4, 5 y 6). La máxima actividad de la GOGAT en nódulos de frijol fué similar a la obtenida en nódulos efectivos de alfalfa (Vance *et al.*, 1983).

Papel de la actividad de PEPC en la actividad de GS y GOGAT en el nódulo

Las actividades de la PEPC y de la GS se incrementaron durante el desarrollo de la simbiosis en las tres cepas (Anexo, Figura 8). Se observó una correlación alta entre las actividades específicas de la PEPC y de la GS en el nódulo. Los coeficientes fueron 0.76 para la cepa CNPAF 512, 0.78 para la cepa CIAT 899 y 0.97 para la cepa CE3 (Anexo, Tabla 7). La máxima actividad de la GS se presentó más tarde que la máxima actividad de PEPC para las tres cepas.

En los nódulos inducidos con las cepas CNPAF 512 y CIAT 899 la actividad de la GS se incrementó en forma paralela a la intensidad del polipéptido durante la simbiosis, lo cual indica que su actividad puede estar regulada por procesos transcripcionales o traduccionales.

Las cepas CNPAF 512, CIAT 899 y CE3 presentaron las máximas actividades de GOGAT y de PEPC en la misma etapa de desarrollo de la simbiosis. Estas actividades fueron similares a las presentadas por nódulos efectivos de alfalfa. Se presentaron correlaciones positivas entre las actividades específicas de la GOGAT y de la PEPC en el nódulo (Anexo, Tabla 7). Los coeficientes de correlación fueron 0.42 para la cepa CNPAF 512, 0.93 para la cepa CIAT 899 y 0.82 para la cepa CE3. En plantas de alfalfa noduladas se presentan correlaciones positivas entre las actividades de la GOGAT y PEPC (Vance *et al.*, 1983). Estos resultados muestran una correlación positiva en actividad de la GOGAT y PEPC en una especie anual que transporta ureidos. A través de la actividad de la PEPC se puede estar proporcionando ácidos orgánicos al ciclo de Krebs para la producción de α -ketoglutarato.

Para las actividades específicas de la GS y de la GOGAT en el nódulo se observaron correlaciones positivas para las tres cepas. Los coeficientes de correlación fueron 0.82 para la cepa

CNPAF 512, 0.59 para la cepa CIAT 899 y 0.9 para la cepa CE3. La Gln producida puede dirigirse hacia la síntesis de ureidos.

La GOGAT se detectó como una sólo banda con un peso molecular aproximado de 200 kD. La banda presentó mayor intensidad en paralelo a la actividad específica de la GOGAT en el nódulo, lo que sugiere que la regulación puede ser a nivel transcripcional o traduccional. En las tres cepas antes mencionadas se presentó el mismo comportamiento en el patrón de la proteína durante el desarrollo de la simbiosis.

4) Papel de la PEPC en el transporte de ureidos

En general para las tres cepas estudiadas se presentó una inducción en el transporte de ureidos más temprana que la inducción en el crecimiento de las plantas (Anexo, Figuras 1, 2 y 3). Los niveles de ureidos en el xilema mostraron una correlación alta con el peso fresco de las plantas y se obtuvieron coeficientes de 0.88 para la cepa CNPAF 512, 0.7 para la cepa CIAT 899 y 0.97 para la cepa CE3 (Anexo, Tabla 8). El N₂ fijado simbióticamente y transportado puede ser utilizado por las plantas para su crecimiento (Anexo, Figuras 4, 5 y 6).

Los nódulos producidos por las tres cepas mostraron incrementos tempranos y rápidos en la actividad de PEPC anterior a los niveles de ureidos (Anexo, Figuras 4, 5 y 6). Se

presentó una correlación alta entre la actividad específica de la PEPC en el nódulo y el transporte de ureidos en el xilema. Los coeficientes fueron 0.97 para la cepa CNPAF 512, 0.93 para la cepa CIAT 899 y 0.82 para la cepa CE3. El cociente entre el transporte de PEPC/ureidos fué similar en las cepas CNPAF 512 y CIAT 899 (Anexo, Tabla 6). Esto sugiere que a través de la actividad de PEPC se pueden proporcionar ácidos orgánicos para la síntesis de aminoácidos precursores de la síntesis de ureidos. Se han reportado altos contenidos de ureidos para otras variedades de frijol inoculadas con cepas de *Rhizobium* tradicionales (Hungria *et al.*, 1991).

En nódulos de soya se reportó que la incorporación de $^{14}\text{CO}_2$ decrementó con el inicio de la fijación de N_2 pero no se demostró alguna relación entre la actividad de fijación de CO_2 y la biosíntesis de ureidos (Coker and Shubert, 1981). Sin embargo, Cookson *et al.* (1980), trabajando con una especie de frijol enana francesa, encontraron que los ureidos producidos se originaron a través de la actividad de PEPC mediante la incorporación de ^{14}C en oxalacetato .

Se detectó en forma temprana la actividad de N_2 asa anterior al transporte de ureidos en el xilema. Es probable que se afecte la actividad de la N_2 asa por la forma en la que el N se transporte. Se presentó una alta correlación entre la actividad de la N_2 asa y el transporte de ureidos. Los coeficientes fueron 0.88

para la cepa CNPAF 512, 0.7 para la cepa CIAT 899 y 0.97 para la cepa CE3. Las cepas estudiadas pueden proveer de N con diferente velocidad y transportarlo a través de ureidos en el xilema. Los cetoácidos pueden aumentar las pozas de aminoácidos como gln y y asparagina utilizados en la síntesis de ureidos.

La actividad de la GS y el transporte de ureidos se indujeron al mismo tiempo para las tres cepas de *Rhizobium*. Los valores más altos de ureidos se observaron en las cepas CNPAF 512 y CIAT 899 (Anexo, Tabla 5) (Anexo, Figuras 4, 5 y 6). Se presentaron correlaciones positivas entre la actividad específica de la GS en el nódulo y el transporte de ureidos en el xilema de las plantas. Los coeficientes fueron 0.85 para la cepa CNPAF 512, 0.59 para la cepa CIAT 899 y 0.73 para la cepa CE3.

Se presentó una correlación positiva entre el transporte de ureidos en el xilema y la actividad específica de la GOGAT en el nódulo (Anexo, Tabla 8). Los coeficientes de correlación fueron 0.57 para la cepa CNPAF 512, 0.87 para la cepa CIAT 899 y 0.8 para la cepa CE3. La gln parece ser el elemento común entre la asimilación de NH_4^+ y la vía de síntesis de los ureidos pero ésta distribución podría ser llevada a cabo mediante una regulación temporal y espacial.

En el Esquema 4 se presentan las vías metabólicas de C y N entre la planta y el bacteroide según datos de la literatura. En base a los resultados obtenidos en ésta tesis se presentan las siguientes propuestas:

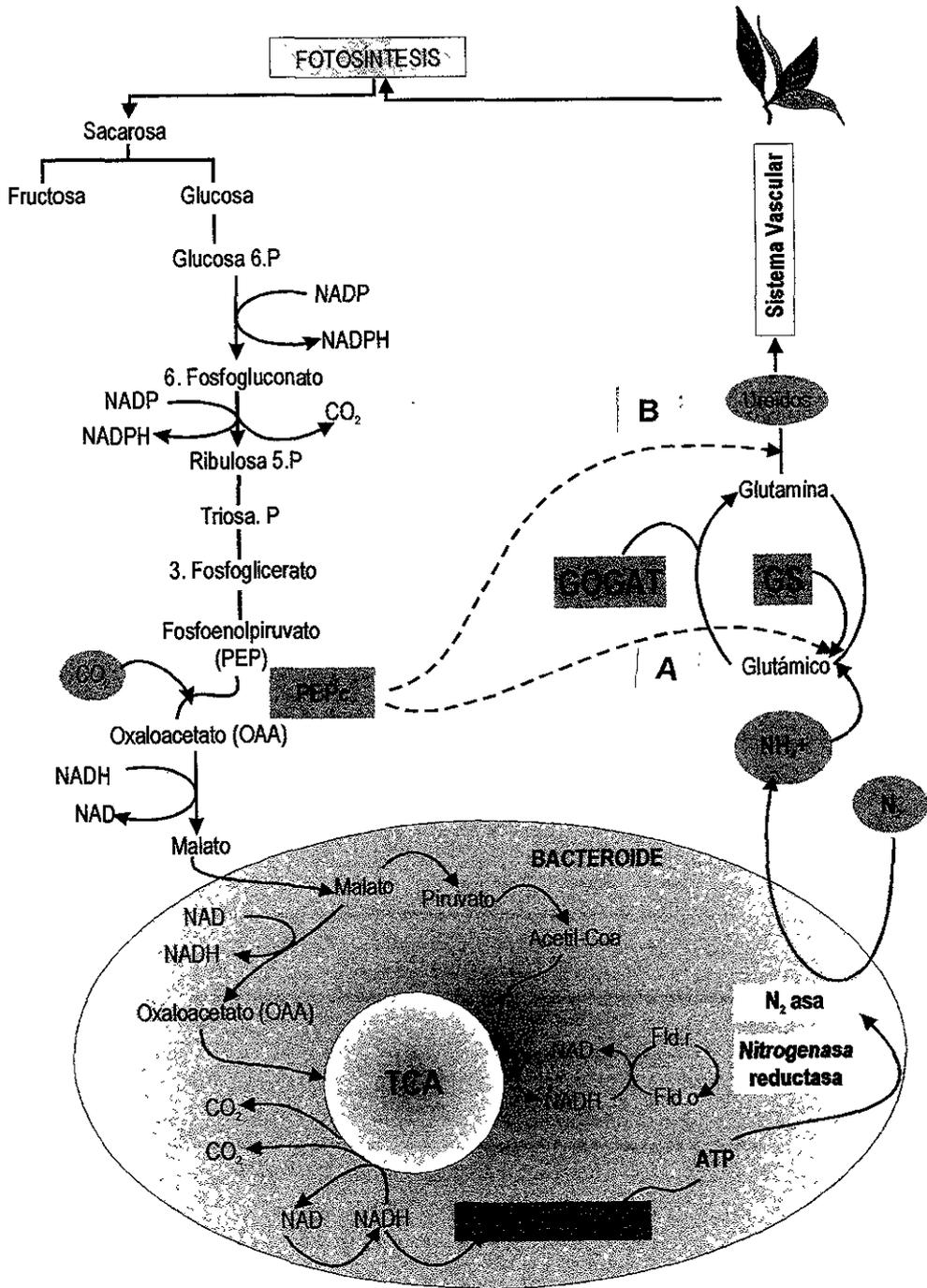
A) La actividad de PEPC en el nódulo tiene una relación directa con el crecimiento de las plantas noduladas. Las plantas inoculadas con la cepa CNPAF 512 presentaron la mayor cantidad y actividad específica de PEPC en el nódulo y también fueron las que presentaron mayor crecimiento. El análisis de coeficientes de correlación y los perfiles de actividad de PEPC y crecimiento, apoyan esta sugerencia.

B) La actividad de PEPC aumentó antes que la actividad de N_2 asa. Lo anterior aunado al hecho de que se encontraron *coeficientes de correlación relativamente bajos para las actividades de PEPC y N_2 asa*, se sugiere que PEPC podría aportar ácidos orgánicos durante la ontogenia de nódulo además de los necesarios para la posterior fijación simbiótica de N_2 . Datos del perfil enzimático de PEPC, N_2 asa, análisis del cociente N_2 asa/PEPC y coeficientes de correlación, apoyan ésta sugerencia.

C) Dado que se encontró una mayor correlación entre las actividades de PEPC con las actividades de GS/GOGAT que la encontrada entre la actividad de PEPC y N_2 asa, se sugiere que la

actividad de PEPC puede aportar directamente los ácidos orgánicos necesarios en la asimilación de NH_4^+ vía el ciclo GS/GOGAT (Esquema 5, línea punteada A). El análisis de coeficientes de correlación y los perfiles de actividades enzimáticas apoyan ésta sugerencia.

D) Se encontró una correlación alta entre la actividad específica de PEPC en el nódulo con el transporte de ureidos en el xilema. Lo anterior, aunado a que dicha correlación fué mayor a la encontrada entre las actividades del ciclo GS/GOGAT y el transporte de ureidos en el xilema, sugiere que la actividad de PEPC aporta directamente esqueletos de C requeridos en la síntesis de aminoácidos requeridos como precursores en la síntesis de ureidos (Esquema 5, línea B). El hecho de que los perfiles de actividad de PEPC y los de transporte de ureidos en el xielma fueron en todas las cepas similares apoyan ésta sugerencia.



Esquema 5. En línea punteada A: Papel propuesto de PEPC en el ciclo GS/GOGAT. En línea punteada B: Papel propuesto de PEPC en la síntesis de ureidos (ver discusión).

CONCLUSIONES

1) El crecimiento de las plantas se ve limitado por el aporte de N. Las plantas con un régimen de fertilización de N inorgánico (14 mM) presentaron mayor crecimiento que las plantas que obtuvieron N a través de la fijación simbiótica de N₂ que correspondería aproximadamente 2mM de N.

2) El crecimiento de las plantas inoculadas dependió de la cepa de *Rhizobium* utilizada. Se observaron correlaciones positivas altas entre el crecimiento de la parte aérea de las plantas con la capacidad de nodulación, actividades específicas de PEPC y N₂asa del nódulo y con el transporte de ureidos en el xilema. Las plantas que presentaron el mayor crecimiento fueron las inoculadas con la cepa CNPAF 512 que también presentaron la mayor nodulación y la mayor actividad de la PEPC.

3) La fijación de CO₂ en el nódulo a través de la actividad de la PEPC varió dependiendo de la cepa de *Rhizobium* utilizada como inoculante. La actividad específica de la PEPC en los nódulos inducidos por la cepa CNPAF 512 fué significativamente mayor que la de las otras dos cepas.

4) I) Durante el desarrollo del nódulo, la cepa CNPAF 512 presentó un aumento en la actividad de PEPC antes que en cualquier otra cepa. II) La actividad de PEPC aumentó antes que

la actividad de la N_2 asa independientemente de la cepa de *Rhizobium* utilizada. III) Se encontraron correlaciones positivas relativamente bajas entre la actividad específica de la PEPC de nódulo y la actividad de la N_2 asa en el nódulo. IV) Cuando la actividad de PEPC comenzó a disminuir se presentó el mayor incremento en la actividad de la N_2 asa independientemente de la cepa de *Rhizobium* utilizada. Las cepas CNPAF 512 y CIAT 899 presentaron las actividades de N_2 asa más altas.

5) Las correlaciones positivas intermedias observadas entre la actividad específica de la PEPC con la actividad específica de la GS y la actividad específica de la GOGAT, pueden resultar debido a que la PEPC puede aportar sustratos para la continua actividad del ciclo GS/GOGAT necesario para la asimilación de NH_4^+ .

6) Las altas correlaciones positivas entre el transporte de ureidos y la actividad específica de la PEPC pudieran resultar a través del aporte de ácidos orgánicos para la síntesis de aminoácidos y de ureidos.

7) A pesar de que la actividad de PEPC aumentó a lo largo del desarrollo del nódulo la intensidad de la banda de PEPC no presentó cambios. Sin embargo, las raíces de plantas no inoculadas presentaron un patrón de doble banda detectado con anticuerpos anti-PEPC que no se presentó en ninguno de los

nódulos excepto con los nódulos inducidos con la cepa CIAT 899. A diferencia del caso de PEPC, los incrementos en las actividades de GS y GOGAT coincidieron con un aumento en la intensidad de las bandas correspondientes, en todas las cepas estudiadas.

9) La banda adicional de 112 kD mostrada por raíces y por nódulos inducidos con la cepa CIAT 899, parece ser una modificación de la banda de 106 kD posiblemente asociada a una ubiquitinación. De ser así, éste podría representar un mecanismo de regulación de la PEPC antes no reportado en nódulo.

BIBLIOGRAFIA

- BAUR B, DIETZ KJ, WINTER K. 1992. Regulatory protein phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase in the facultative crassulacean acid metabolism plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. Eur. J. Biochem. 209: 95-1017
- BLEVINS DG. 1989. An overview of nitrogen metabolism in higher plants. In JE Poulton, JT Romeo, EE Conn, eds, Plant Nitrogen Metabolism, Plenum Publishing Corporation, New York, pp 1-41
- 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: 248-2587
- BREWIN NJ. 1991. Development of the legume root nodule. Ann. Rev. Cell Biol. 7: 191-226.
- CHAMPIGNY ML, FOYER C. 1992. Nitrate activation of cytosolic protein kinases diverts photosynthetic carbon from sucrose to amino acid biosynthesis. Plant Physiol. 100: 7-12
- CHOLLET R. 1996. Phosphoenolpyruvate carboxylase: A ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47: 273-298.
- COKER GT, SCHUBERT KR. 1981. Carbon dioxide fixation in soybean roots and nodules: characterization and

- comparison with N_2 fixation and composition of xylem exudate during early nodule development. *Plant Physiol.* 67: 691-696
- DEROCHE ME, CARRAYOL E. 1988. Nodule phosphoenolpyruvate carboxylase: a review. *Physiol. Plant.* 74: 775-782
- DEROCHE ME, CARRAYOL E, JOLIVET E. 1983. Phosphoenolpyruvate carboxylase in legume nodules. *Physiol. Vég.* 21: 1075-1081
- EGLI MA, GRIFFITH SM, MILLER SS, ANDERSON MA, VANCE CP. 1989. Nitrogen assimilating enzyme activities and enzyme protein during development and senescence of 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: 159-171
- HUNGRIA M, BARRADAS CAA, WALLSGROVE RM. 1991. Nitrogen fixation, assimilation and transport during the initial growth stage of *Phaseolus vulgaris* L. *J. Exp. Bot.* 42: 839-844
- JIAO J, CHOLLET R. 1991. Pottranslational regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in C4 and crassulacean acid metabolism plants. *Plant Physiol.* 95: 981-985

- KING BJ, LAYZELL DB, CANVIN DT. 1986. The role of dark carbon dioxide fixation in root nodules of soybean. *Plant Physiol.* 81: 200-205
- KOCH K. 1996. Carbohydrate-Modulated Gene Expression in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* 47: 509-540.
- LAEMMLI UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature.* 227: 680-685
- LARA M, PORTA H, PADILLA J, FOLCH J, SANCHEZ F. 1984. Heterogeneity of glutamine synthetase polypeptides in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* 76: 1019-1023
- MARTINEZ-ROMERO E, SEGOVIA L, MERCANTE FM, FRANCO AA, GRAHAM P, PARDO MA. 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp trees. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 41:417-426
- MAXWELL CA, VANCE CP, HEICHEL GH, STADE S. 1984. CO₂ fixation in alfalfa and birdsfoot trefoil root nodules and partitioning of ¹⁴C to the plant. *Crop Sci.* 24: 257-264
- MILLER SS, BOYLAN KLM, VANCE CP. 1987. Alfalfa root nodule carbon dioxide fixation. III Immunological studies of nodule phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* 84: 501-508
- NOEL KD, SANCHEZ A, FERNANDEZ L, LEEMANS J, CEVALLOS MA. 1984. *Rhizobium phaseoli* symbiotic

mutants with transposon Tn5 insertions. J. Bacteriol. 158:148-155

ORTEGA JL. 1992. Regulación de la Fosfoenolpiruvato Carboxilasa y Glutamina Sintetasa en nódulos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) .UNAM. UACPyP, CCH. Instituto de Biotecnología, Tesis Doctoral.

OUYANG LJ, WHELAN J, WEAVER CD, ROBERTS DM, DAY DA. 1991. Protein phosphorylation stimulates the rate of malate uptake across the peribacteroid membrane of soybean nodules. FEBS Lett. 293: 188-190

PATHIRANA SM, VANCE CP, MILLER SS, GANTT JS. 1992. Alfalfa root nodule phosphoenolpyruvate carboxylase: characterization of the cDNA and expression in effective and plant-controlled ineffective nodules. Plant Mol. Biol. 20: 437-450

ROSENDHAL L, VANCE CP, PEDERSEN WD. 1990. Products of dark CO₂ fixation in pea root nodules support bacteroid metabolism. Plant Physiol. 93: 12-19

SCHAFFNER A, SHEEN J. 1992. Maize C4 Photosynthesis involves differential regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase genes. Plant Journal. 2: 221-232.

SCHUBERT KR. 1986. Products of Biological Nitrogen Fixation In Higher Plants: Synthesis, Trasport and Metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol. 37: 359-374

SCHULLER KA, TURPIN DH, PLAXTON WC. 1990. Metabolite regulation of partially purified soybean nodule

- phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* 94: 1429-1435
- SCHULZ M, KLOCKENBRING T, HUNTE C, SCHNABL, H. 1993. Involvement of ubiquitin in phosphoenolpyruvate carboxylase degradation. *Bot. Acta* 143-145.
- TA TC, MACDOWELL FD, FARIS MA. 1987. Utilization of carbon from shoot photosynthesis and nodule CO₂ fixation in the fixation and assimilation of nitrogen by alfalfa root nodules. *Can. J. Bot.* 65: 2537-2541
- TOWBIN H., STAHELIN T., GORDON J. 1979. Electroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheet: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 4350-4354.
- VANCE CP, GANTT S. 1992. Control of nitrogen and carbon metabolism in root nodules. *Physiol Plantarum* 85: 266-274.
- VANCE CP, GRIFFITH SM. 1990. The molecular biology of N metabolism. In *Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Dennis DT and DH Turpin (eds), pp. 373-388. Logman Scientific and Technical, New York.
- VANCE CP, HEICHEL GH. 1991. Carbon in N₂ fixation: limitation or exquisite adaptation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 373-392
- VANCE CP, STADE S, MAXWELL CA. 1983. Alfalfa root nodule carbon dioxide fixation. I Association with nitrogen fixation

and incorporation into aminoacids. *Plant Physiol.* 72: 469-473.

VIDAL J, NGUYEN J, PERROT-RECHENMANN C, GADAL P. 1986. Phosphoenolpyruvate carboxylase in soybean root nodules: an immunochemical study. *Planta.* 169: 198-201

VOGEL GD, VAN DER DRIFT. 1970. Differential analyses of glyoxylate derivatives. *Anal. Biochem.* 33: 143-157

WAREMBOURG FR, ROUMET C. 1989. Why and how to estimate the cost of symbiotic N₂ fixation? A progressive approach based on the use of ¹⁴C and ¹⁵N isotopes. *Plant Soil.* 115: 167-177

WEAVER CD, CROMBIE B, STACEY G, ROBERT DM. 1991. Calcium-dependent phosphorylation of symbiosome membrane proteins from nitrogen-fixing soybean nodules. *Plant Physiol.* 95: 222-227

WEDDING RT, BLACK MK, MEYER CR. 1990. Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase by malate. *Plant Physiol.* 92: 456-461

ANEXO

Tabla 5. Máximas tasas de crecimiento, actividades enzimáticas y transporte de ureidos en plantas de frijol cv. Negro Jamapa inoculadas con tres cepas de *Rhizobium*: CNPAF 512, CIAT 899 y CE3.

Cepas de <i>Rhizobium</i>	Crecimiento		N ₂ asa (nmolC ₂ H ₄ /h/planta)	PEPC (nmol NADH/min /mg PTS)	Ureidos (μmol/μL xilema/h/p lanta)	GS (U. transfe rasa/ min/mg PTS)	GOGAT (nmol/min/ mg PTS)
	Peso fresco (g)	Area foliar (cm ²)					
CE3	2.1	9	115	400	41	2.3	28
CIAT 899	2.5	7.5	510	401	120	2.8	9
CNPAF 512	2.8	10	490	570	135	4	32

Tabla 6. Cociente entre la máxima actividades de PEPC, N₂asa, GS, GOGAT en el nódulo y transporte de ureidos en el xilema de plantas de frijol cv. Negro Jamapa inoculadas con tres cepas de *Rhizobium*: CNPAF 512, CIAT 899 y CE3.

Cepas de <i>Rhizobium</i>	PEPC/ N ₂ asa	PEPC/ Ureidos	PEPC/ GOGAT	GOGAT/GS
CE3	3.48	9.76	14.3	12.18
CIAT 899	0.79	3.34	44.55	3.21
CNPAF 512	1.16	4.22	17.81	8.0

Tabla 7. Coeficientes de correlación de crecimiento y actividad de PEPC con: actividades de N_2 asa, GS y GOGAT en nódulos y transporte de ureidos en el xilema de plantas de frijol cv. Negro Jamapa inoculadas con las cepas de *Rhizobium*: CE3, CIAT 899 y CNPAF 512.

Parámetros	Coeficientes de Correlación		
	Cepa CE3	Cepa CIAT899	Cepa CNPAF 512
Peso fresco y PEPC	0.7	0.87	0.89
Peso fresco y GS	0.67	0.45	0.9
Peso fresco y GOGAT	0.64	0.68	0.75
PEPC y altura	0.83	0.19	0.73
PEPC y N_2 asa	0.56	0.19	0.43
PEPC y ureidos	0.82	0.93	0.97
PEPC y GS	0.97	0.78	0.76
PEPC y GOGAT	0.88	0.77	0.42

Tabla 8. Coeficientes de correlación entre la actividad de N_2 asa y: peso fresco de las plantas, ureidos en el xilema, GS y GOGAT en los nódulos. Coeficientes de correlación entre ureidos y: peso fresco, GS y GOGAT en nódulos de plantas de frijol cv. Negro Jamapa inducidos con las cepas CE3, CIAT 899 y CNPAF 512.

Parámetros	Coeficientes de Correlación		
	Cepa CE3	Cepa CIAT 899	Cepa CNPAF 512
N_2 asa y peso fresco	0.89	0.84	0.81
N_2 asa y ureidos	0.97	0.7	0.88
N_2 asa y GS	0.85	0.82	0.92
N_2 asa y GOGAT	0.83	0.43	0.71
Ureidos y peso fresco	0.97	0.7	0.88
Ureidos y GS	0.73	0.59	0.85
Ureidos y GOGAT	0.8	0.87	0.57
GS y GOGAT	0.9	0.59	0.82

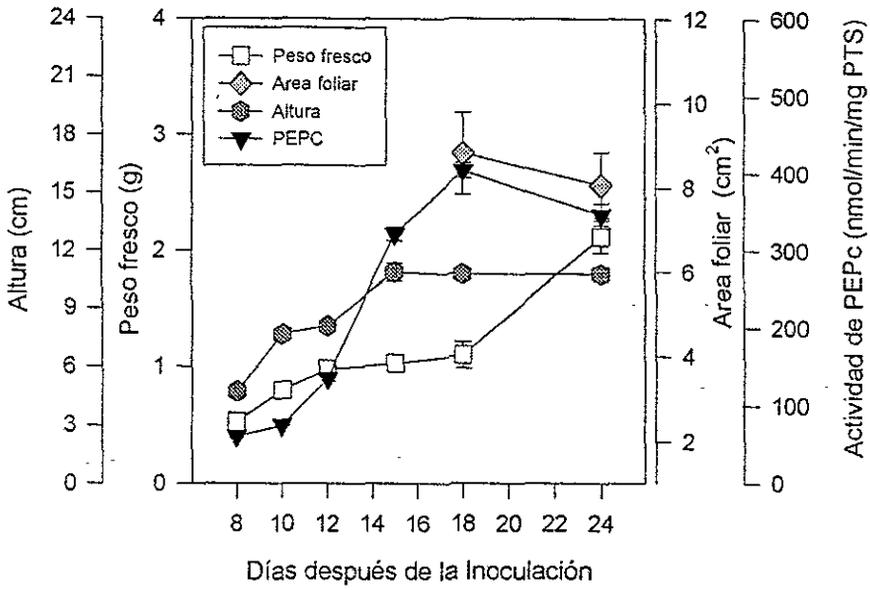


Figura 1. Crecimiento (peso fresco, área foliar y altura) de plantas de frijol Negro Jamapa y actividad de la PEPC en la nódulos inducidos por la cepa *Rhizobium etli* CE3. Las barras corresponden al error estándar de tres experimentos.

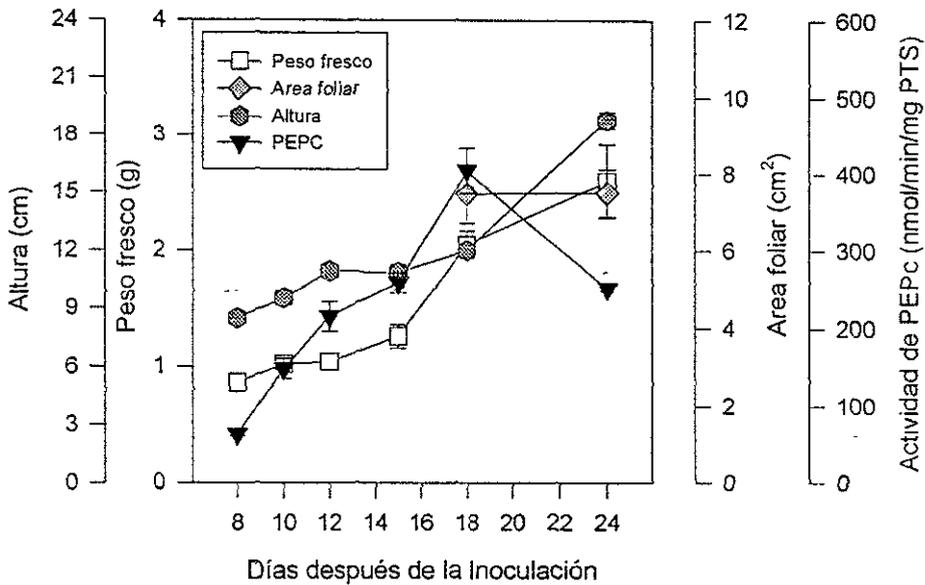


Figura 2. Crecimiento (peso fresco, área foliar y altura) de plantas de frijol Negro Jamapa y actividad de la PEPC en nódulos inducidos con la cepa *Rhizobium tropici* CIAT 899. Las barras corresponden al error estándar de tres experimentos.

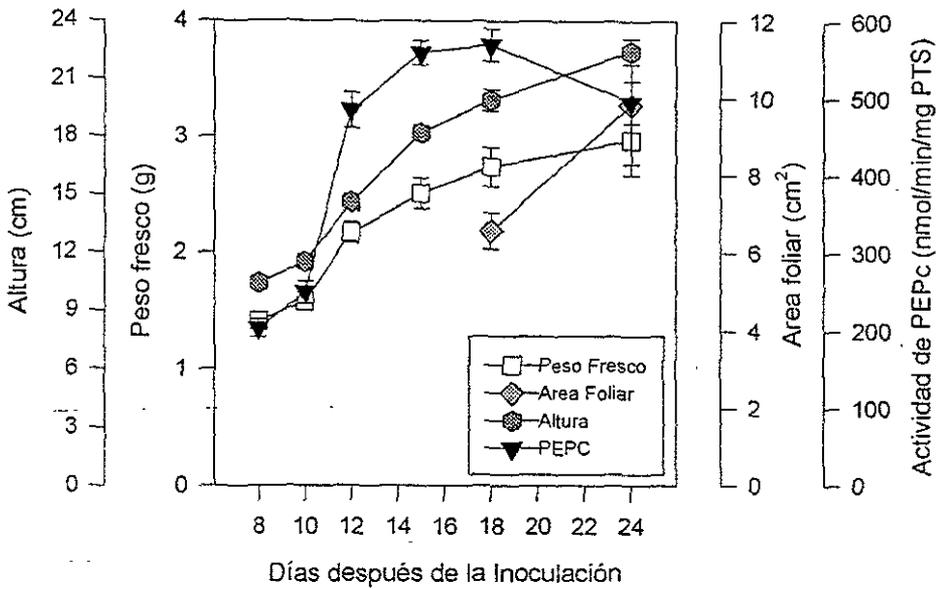


Figura 3. Crecimiento (peso fresco, área foliar y peso fresco) de plantas de frijol Negro Jamapa y actividad de PEPC en nódulos inducidos con la cepa *Rhizobium leguminosarum* CNPAF 512. Las barras son el error estándar de tres experimentos.

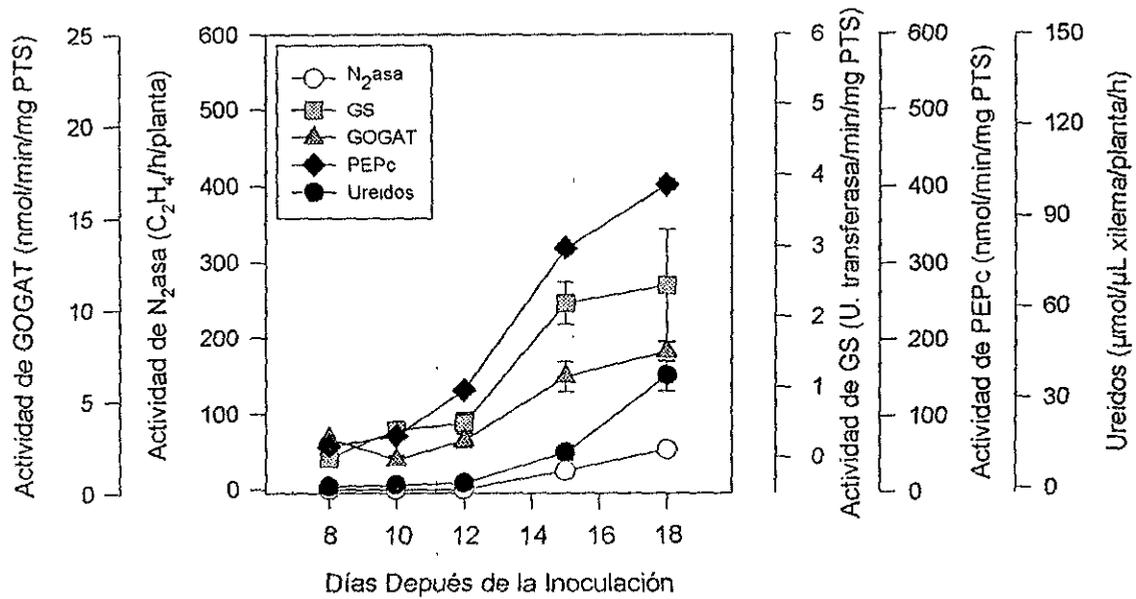


Figura 4. Actividades enzimáticas del metabolismo de C y N en nódulos de frijol inducidos por la cepa *Rhizobium etli* CE 3 y el transporte de ureidos. Las barras corresponden al error estándar de tres experimentos.

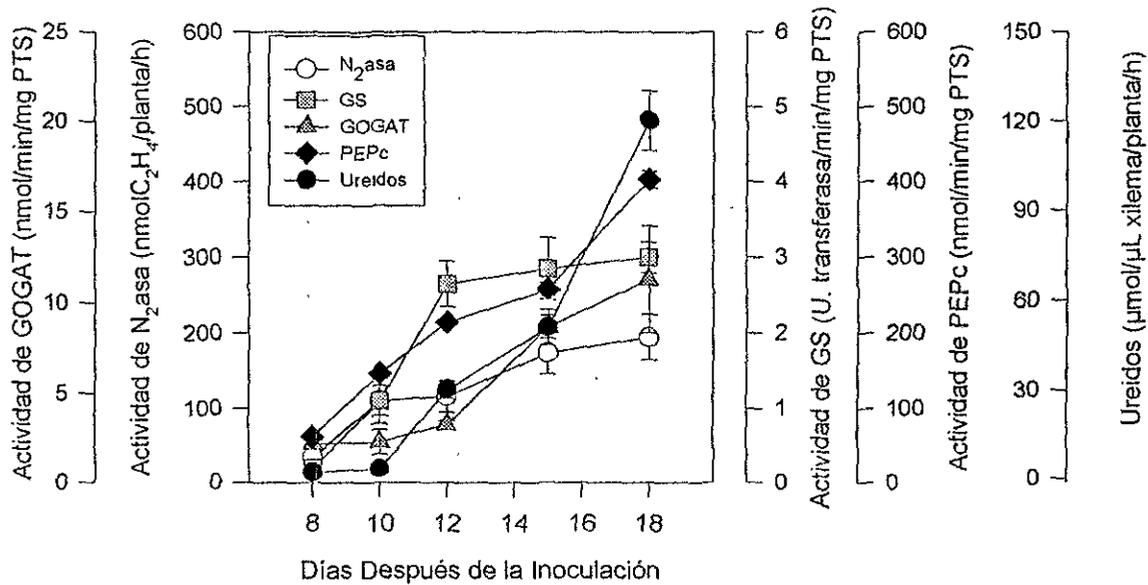


Figura 5. Actividades enzimáticas del metabolismo de C y N en nódulos de frijol inducidos por la cepa *Rhizobium tropici* CIAT 899 y el transporte de ureidos. Las barras corresponden al error estándar de tres experimentos.