

INDICE

CONFERENCIAS-----1

THE ROLE OF NOD FACTORS IN ROOT NODULE ORGANOGENESIS <i>Kondorosi A., Charon C., Frugier F., Foucher F., Balland M., Roudier F., Johansson C., Cebolla A., Sousa C., Jimenez-Zurdo J.I., Mergaert P., Staehelin C., Schultze M., Crespi M., Kondorosi E., Felle H.</i> -----	3
---	---

METABOLIC INTERACTIONS BETWEEN BACTEROID AND PLANT IN LEGUME NODULES <i>Day David A.</i> -----	11
---	----

REGULATION OF NITROGEN FIXATION IN LEGUMES <i>Minchin F.R.</i> -----	19
---	----

AGRONOMY AND ECOLOGY OF NITROGEN FIXATION <i>Vance Carroll P.</i> -----	27
--	----

SECCION 1: FISIOLÓGÍA Y BIOQUÍMICA-----36

PONENCIAS, SECCIÓN 1

1.A.LA FERREDOXINA NADP ⁺ REDUCTASA EN LOS HETEROCISTOS DE ANABAENA <i>Fillat M.F., Razquin P., Mógica P.A., Blasco L. y Peleato M.L.</i> -----	38
---	----

1.B.EN <i>RHODOBACTER CAPSULATUS</i> UN SISTEMA ESPECÍFICO DE TRANSPORTE DE ELECTRONES A LA NITROGENASA PARTICIPA EN LA BIODEGRADACIÓN DEL 2,4-DINITROFENOL <i>Blasco R., García P., Sáez L., Martínez-Luque M., Klipp W., Castillo F.</i> -----	42
---	----

1.C.LIPID BIOSYNTHESIS IN RHIZOBIA <i>López-Lara I.M., de Rudder K.E.E., Epple G., Röhrs V., and Geiger O.</i> -----	46
---	----

1.D.PLASTICIDAD FENOTÍPICA EN LA SIMBIOSIS <i>SESBANIA ROSTRATA-AZORHIZOBIUM CAULINODANS</i> ORS571 <i>Fernández-López M., Goormachtig S, Gao M., D’Haeze W., Van Montagu M. y Holsters M.</i> -----	50
---	----

1.E.FERRITINA Y DESARROLLO DEL NÓDULO DE LAS LEGUMINOSAS <i>Lucas M.M., Van de Sype G., Hernández M.J., Hérouart D., Puppo A. y de Felipe M.R.</i> -----	54
---	----

1.F.METABOLISMO CARBONADO Y RESPIRACIÓN BACTEROIDAL EN NÓDULOS DE LEGUMINOSAS SOMETIDAS A ESTRÉS SALINO <i>Ocaña A., Martínez E., Ferri A. y Lluch C.</i> -----	58
--	----

COMUNICACIONES, SECCIÓN 1

1.1.PAPEL DEL BORO EN EL DESARROLLO DE <i>FRANKIA</i> . INCIDENCIA SOBRE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO EN VIDA LIBRE <i>Redondo M., Orellana M., Wall L.G., Bolaños L. y Bonilla I.</i> -----	62
--	----

1.2.CARACTERIZACIÓN DE <i>ACETOBACTER DIAZOTROPHICUS</i> EN CONDICIONES DE ESTRÉS <i>Tejera N.A., Ortega E., Ocaña A. y Lluch C.</i> -----	64
---	----

1.3.PRODUCCIÓN DE INDOL-3-ACÉTICO A PARTIR DE INDOL-3-ACETONITRILLO: UNA NUEVA VÍA PARA LA SÍNTESIS DE AIA EN <i>BRADYRHIZOBIUM</i> <i>Vega Hernández M.C., León Barrios M., Jarabo Lorenzo A. y Pérez Galdona R.M.</i> -----	66
--	----

1.4. REVERSIBILIDAD DE LA TOXICIDAD DE IMAZETHAPYR SOBRE <i>RHIZOBIUM</i> <i>Hualde I. y Royuela M.</i> -----	68
1.5. RELACIÓN ENTRE ENZIMAS ANTIOXIDANTES, LIPOOXIGENASA Y ÁCIDO SALICÍLICO DURANTE LAS PRIMERAS ETAPAS DE LA INTERACCIÓN <i>RHIZOBIUM</i> -LEGUMINOSA <i>Bueno P., Herrera-Cervera J.A., Rodriguez-Rosales P., Sanjuán J., Olivares J.</i> <i>Donaire J.P.</i> -----	70
1.6. PAPEL DEL TRANSPORTE DE OLIGOPEPTIDOS EN LA SIMBIOSIS <i>RHIZOBIUM MELILOTI</i> -AFALFA <i>Nogales J., Muñoz S., Olivares J. y Sanjuán J.</i> -----	72
1.7. INTERACCIÓN B/CA EN EL MANTENIMIENTO DE LA INTEGRIDAD ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE NÓDULOS DE LEGUMINOSAS <i>Bolaños L. y Bonilla I.</i> -----	74
1.8. ¿EXISTE ATPASA EN LA MEMBRANA PERIBACTEROIDEA? <i>Santamaría M., Gutiérrez-Navarro A.M. y Corzo J^a</i> -----	76
1.9. DETERMINACIÓN ESPECÍFICA DEL TRIPÉPTIDO GLUTATIÓN EN NÓDULOS DE LEGUMINOSAS <i>Matamoros M.A., Iturbe-Ormaetxe I. y Becana M.</i> -----	78
1.10. SUPERÓXIDO DISMUTASAS EN NÓDULOS DE LEGUMINOSAS: DETERMINACIÓN PRECISA DE LA ACTIVIDAD Y COMPOSICIÓN ISOENZIMÁTICA EN PEQUEÑAS MUESTRAS (10-50 mg) DE TEJIDO <i>Rubio M.C. y Becana M.</i> -----	80
1.11. PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL PYRIDINE DISULFIDE OXIDOREDUCTASE ISOENZYME FROM SOYBEAN ROOT NODULES OVEREXPRESSED IN <i>ESCHERICHIA COLI</i> <i>Moran J.F., Sun Z., Sarath G., Becana M., and Klucas R.V.</i> -----	82
1.12. ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS NODULARES Y SU INFLUENCIA EN EL DESARROLLO DEL GUISANTE NODULADO CRECIDO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CO ₂ <i>Cabrerizo P.M., Arrese-Igor C., Aparicio-Tejo P.M.</i> -----	83
1.13. EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL EN NÓDULOS DE LUPINO BAJO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE OXÍGENO <i>Guasch L.M., Fernández-Pascual M., Pueyo J.J. y de Felipe M.R.</i> -----	85
1.14. FIJACIÓN SIMBIÓTICA Y ASIMILACIÓN DE AMONIO EN DOS CULTIVARES DE <i>CICER ARIETINUM</i> EN CONDICIONES DE SALINIDAD <i>Soussi M., Khadri M., Pliego L., Lluch C. y Ocaña A.</i> -----	87
1.15. RESPUESTA DEL METABOLISMO CARBONADO Y SOLUTOS INTRACELULARES EN NÓDULOS DE JUDÍA: EFECTO DEL CLORURO SÓDICO <i>Pliego L., Khadri M., Soussi M., Ocaña A. y Lluch C.</i> -----	89
1.16. CAMBIOS INDUCIDOS POR LA SALINIDAD EN LA ASIMILACIÓN DEL AMONIO Y METABOLISMO DE UREIDOS EN <i>PHASEOLUS VULGARIS</i> <i>Khadri M., Pliego L., Soussi M. y Lluch C.</i> -----	91

SECCION 2: GENÉTICA MOLECULAR-----93

PONENCIAS, SECCIÓN 2

- 2.A.CARACTERIZACIÓN Y REGULACIÓN DE GENES DE *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* IMPLICADOS EN LA DESNITRIFICACIÓN
Velasco L., Bedmar E. J. y Delgado M. J.-----95
- 2.B.REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE GALACTOGLUCANO EN *SINORRHIZOBIUM MELILOTI* EFB1
Lloret J., Martín M., Bonilla I. y Rivilla R.-----99
- 2.C.EFECTO PLEIOTRÓPICO DE UNA MUTACIÓN EN EL PLÁSMIDO SIMBIÓTICO DE *SINORRHIZOBIUM FREDII* HH103
Buendía-Clavería A.M., Moussaid A., Gil Serrano A.M., Moreno J., Ollero F. y Ruiz Sainz J.E.-----103
- 2.D.ESTUDIO GENÉTICO Y SIMBIÓTICO DE LOS GENES *NODH*, *NODP* Y *NODQ* DE *RHIZOBIUM TROPICI* CIAT899
Manyani H., Marroquí S., Folch J. L., Sousa C. y Megías M.-----107
- 2.E.LA ACTIVIDAD HIDROGENASA ES REGULADA POR GENES SIMBIÓTICOS EN *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* BV *VICIAE*
Rey L., Martínez M., Gutiérrez D., Brito B., Hernando Y., Cabrera E., Palacios J. M., Imperial J. y Ruíz-Argüeso T.-----111
- 2.F.ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *MSPG3* EN PLANTAS TRANSGÉNICAS MEDIANTE FUSIONES DEL PROMOTOR AL GEN DE LA β -GLUCURONIDASA
Rodríguez-Llorente I.D., Pérez-Hormaeche J., Coronado C., Ratet P., Kondorosi A., Caviedes M.A. y Palomares A.J.-----113

COMUNICACIONES, SECCIÓN 2

- 2.1.ASPECTOS MOLECULARES Y ECOLÓGICOS DEL PRIMER INTRÓN DEL GRUPO II DESCRITO EN *SINORRHIZOBIUM MELILOTI*
Martínez-Abarca F., Zekri S., Muñoz E. and Toro N.-----117
- 2.2.IDENTIFICACIÓN DE GENES *NAR* EN *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*
Mesa Banqueri M.S., Delgado M.J. y Bedmar E.J.-----119
- 2.3.IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN *NIRK* DE *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* USDA110
Velasco L., Delgado M.J. y Bedmar E.J.-----121
- 2.4.IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN GEN NECESARIO PARA LA ASIMILACIÓN DE NITRITO EN *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*
Xu C-A., Lorite M.J., Delgado M.J. y Bedmar E.J.-----123
- 2.5.IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES *COX* QUE CODIFICAN LA ENZIMA MONÓXIDO DE CARBONO DESHIDROGENASA DE *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*
Lorite M.J., Sanjuán J. y Bedmar E.J.-----125
- 2.6.IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA SÍNTESIS DE LIPOOLIGOSACÁRIDOS EN LA ESTIRPE HH103 DE *SINORRHIZOBIUM FREDII*
Lamrabet Y., Vinardell J.M., Ollero F.J., Ruíz-Sainz J.E. y Megías M.-----127

2.7. CARACTERIZACIÓN DE UN MUTANTE DE LA ESTIRPE HH103 DE <i>SINORHIZOBIUM FREDII</i> ALTERADO EN SU CAPACIDAD FIJADORA DE NITRÓGENO <i>Espuny M.R., Bellogín R.A., Cubo T., Lamrabet Y., Madinabeitia N., Ollero F.J., Ruiz-Sainz J.E. y Temprano F.</i> -----	129
2.8. ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN <i>EXOF</i> DE <i>RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM</i> BV. <i>TRIFOLII</i> . OBTENCIÓN DE UN MUTANTE MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE UN CASETE DE LUCIFERASA <i>Dary M. y Palomares A.J.</i> -----	131
2.9. VARIABILIDAD GENÉTICA DEL SISTEMA <i>HUP</i> EN <i>RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM</i> BV <i>VICIAE</i> <i>Fernández-Parra D., Toffanin A., Ruíz-Argüeso T. e Imperial J.</i> -----	133
2.10. INDUCCIÓN DE LOS GENES <i>RHI</i> EN <i>RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM</i> BV. <i>VICIAE</i> EN RESPUESTA A LA DENSIDAD CELULAR <i>Rodelas B., Lithgow J., Wilkinson A., Wisniewski-Dyé F. y Downie J.A.</i> -----	135
2.11. CONSTRUCCIÓN DE CEPAS DE <i>SINORHIZOBIUM MELILOTI</i> ALTAMENTE COMPETITIVAS POR LA NODULACIÓN DE ALFALFA (<i>MEDICAGO SATIVA</i>) <i>van Dillewijn P., Soto M.J., Villadas P. y Toro N.</i> -----	137
2.12. EL GEN <i>LEUA</i> DE <i>RHIZOBIUM MELILOTI</i> ES NECESARIO PARA LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LA NODULACIÓN <i>Sanjuan-Pinilla J.M., Olivares J. y Sanjuan J.</i> -----	139
2.13. PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-HYDROXY KINASE IN THE LEGUME- <i>RHIZOBIUM</i> INTERFACE <i>Hernández L.E., Escobar C., Drøbak B.K., Brewin N.J.</i> -----	141
2.14. ESTRATEGIAS PARA CLONAR <i>SYM 8</i> : UN GEN CLAVE EN LA INTERACCIÓN <i>RHIZOBIUM</i> - <i>LEGUMINOSAS</i> <i>González E.M., Koulikova O., Geurts R., Ellis N. y Bisseling T.</i> -----	143
2.15. SISTEMA PARA EL ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE NODULINAS EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE <i>LUPINUS ALBUS</i> <i>Peregrín Alvarez J.M. y Chamber Pérez M.A.</i> -----	145
SECCION 3: AGRONOMÍA Y ECOLOGÍA -----	147
<u>PONENCIAS, SECCIÓN 3</u>	
3.A. LA SIMBIOSIS <i>SINORHIZOBIUM MELILOTI</i> -ALFALFA EN CONDICIONES ÁCIDAS <i>Soto M.J., Segundo E., Martínez-Abarca F., van Dillewijn P. y Toro N.</i> -----	149
3.B. PERFILES DE RNA ESTABLES DE BAJO PESO MOLECULAR COMO MARCADORES MOLECULARES EN ESTUDIOS TAXONÓMICOS <i>Mateos González P., Velázquez Pérez E. y Martínez Molina E.</i> -----	153
3.C. INFLUENCIA DE RIZOBACTERIAS PERTENECIENTES AL GÉNERO <i>PSEUDOMONAS</i> EN EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE DOS VARIETADES COMERCIALES DE <i>VICIA VILLOSA</i> ROTH <i>Acero N., Probanza A., Lucas J.A., Ramos B., Barrientos M.L. y Gutiérrez Mañero F.J.</i> -----	157
3.D. LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO EN SOJA Y FRIJOL EN BRASIL <i>Hungria M., Vargas M.A.T., Andrade D.S. y Megías M.</i> -----	161
3.E. DOS DÉCADAS DE ESTUDIOS SOBRE LA RESPUESTA A LA INOCULACIÓN EN ANDALUCÍA <i>Rodríguez-Navarro D.N., Santamaría C., Camacho M., Daza A. y Temprano F.</i> -----	165

3.F. CONTRIBUCIÓN DE LA FIJACIÓN DE N₂ A LA FERTILIDAD DEL SUELO Y A LA PRODUCTIVIDAD DEL ARROZ	
<i>Fernández Valiente E., Ucha A., Quesada A., Leganés F. y Carreres R.</i> -----	169

COMUNICACIONES, SECCIÓN 3

3.1. TRANSFERENCIA GENÉTICA HORIZONTAL EN BACTERIAS DEL GÉNERO <i>RHIZOBIUM</i>	
<i>Herrera-Cervera J.A., Sanjuán-Pinilla J.M., Muñoz S., Olivares J. y Sanjuán J.</i> -----	173
3.2. UTILIZACIÓN DEL GEN DE LA TIMIDILATO SINTASA (<i>THYA</i>) COMO MARCADOR ALTERNATIVO A GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	
<i>Fernández-Alfonso C., Carnicero P., Báscones E., Ruiz-Argüeso T., y Palacios J. M.</i> -----	175
3.3. REGIONES MOB EN <i>RHIZOBIUM MELILOTI</i>	
<i>Herrera-Cervera J.A., Sanjuan-Pinilla J.M., Remisz E., Olivares J. y Sanjuan J.</i> -----	177
3.4. CARACTERIZACIÓN Y SELECCIÓN DE CEPAS AISLADAS A PARTIR DE NÓDULOS EFECTIVOS DE <i>LUPINUS ALBUS</i>	
<i>Gomis V., Velázquez E., Mateos P. y Martínez-Molina E.</i> -----	179
3.5. ELECTROFORESIS DE MOLÉCULAS SUPERFICIALES DE RIZOBIOS	
<i>Díaz Marrero A.R., Hernández Hernández M.J., Santamaría M., Gutiérrez-Navarro A.M. y Corzo J.</i> -----	181
3.6. CARACTERIZACIÓN Y SELECCIÓN DE CEPAS AISLADAS A PARTIR DE NÓDULOS EFECTIVOS DE <i>CICER ARIETINUM</i>	
<i>Rivas A., Velázquez E., Mateos P. y Martínez-Molina E.</i> -----	183
3.7. AISLAMIENTO Y EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD FIJADORA DE NITROGENO DE <i>RHIZOBIUM FREDII</i> PROCEDENTE DE SUELOS DE LA PROVINCIA CHINA DE HUBEI	
<i>Temprano F., Santamaría C., Rodríguez-Navarro D.N., Camacho M., Daza A. y Ruíz-Sainz J.E.</i> -----	185
3.8. MERCURY AND ZINC TOLERANCE OF <i>RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM</i> BV. <i>TRIFOLII</i> ISOLATES FROM HEAVY METAL CONTAMINATED SOIL	
<i>Castro I.V., Ferreira E. and McGrath S.P.</i> -----	187
3.9. ESTUDIO DEL POTENCIAL BIORREMEDIADOR DE <i>SINORHIZOBIUM MELILOTI</i>	
<i>Sánchez Contreras M., Villacieros M., Fernández-Piñas F., Lloret J., Martín M., Bonilla I. y Rivilla R.</i> -----	189
3.10. MICROBIAL ACTIVITIES IN A SEWAGE SLUDGE AMENDED SOIL	
<i>Oliveira A., Pampulha M.E., Ferreira E.M. & Castro I.</i> -----	191
3.11. COINOCULACIONES DE PLANTAS DE SOJA CON BACTERIAS DE LOS GÉNEROS <i>BRADYRHIZOBIUM</i>, <i>SINORHIZOBIUM</i>, <i>AZOSPIRILLUM</i> Y <i>BACILLUS</i>	
<i>Casas M. A., de Felipe M. R., Roldós J., Rubio C., Guasch L.M. y Fernández-Pascual M.</i> -----	193
3.12. EFECTOS DE LA COINOCULACIÓN DE ALFALFA CON <i>SINORHIZOBIUM MELILOTI</i> EFB1 Y <i>PSEUDOMONAS FLUORESCENS</i> F113	
<i>Villacieros M., Sánchez Contreras M., Lloret J., Fernández-Piñas F., Bonilla I. y Rivilla R.</i> -----	195
3.13. PRODUCCIÓN DE HOMOPOLIMEROS (3HB) Y COPOLIMEROS (3HB-HV) POR <i>AZOTOBACTER CHROOCOCCUM</i> H23 EN EFLUENTES ORIGINADOS EN LA OBTENCIÓN DE ACEITE DE OLIVA	
<i>Martínez-Toledo M.V., Pozo C., Juárez B., Salmerón V. y González-López J.</i> -----	197

3.14. ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD DE LAS POBLACIONES DE <i>RHIZOBIUM FREDII</i> EN SUELOS PROCEDENTES DE CHINA <i>Camacho M., Santamaría C., Daza A., Rodríguez-Navarro D.N., Buendía A., Espuny R., Bellogin R., López C., Ollero J. y Temprano F.</i> -----	199
3.15. UTILIZACIÓN DE LA PERLITA COMO SOPORTE PARA INOCULANTES BACTERIANOS <i>Daza A., Santamaría C., Rodríguez-Navarro D. N., Camacho M., Orive R. y Temprano F.</i> -----	201
3.16. BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS <i>VERSUS</i> HONGOS MICORRÍZAS ARBUSCULARES: DOBLE INOCULACIÓN EN <i>BRACHIARIA DECUMBENS</i> <i>Lyra de M.C.C.P., Souza E., Lira Jr. M.A., Burity H.A.</i> -----	203
3.17. INTERACCIÓN ENTRE EL AUMENTO DE CO ₂ ATMOSFERICO Y EL DÉFICIT DE PRESIÓN DE VAPOR EN EL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE ALFALFA FIJADORAS DE NITRÓGENO <i>De Luis Munárriz I., Irigoyen J.J. y Sánchez-Díaz M.</i> -----	205
3.18. NUTRICIÓN NITROGENADA EN EL RENDIMIENTO DE GUISANTE <i>SNAP-PEA</i> <i>Estomba O. y Arrese-Igor C.</i> -----	207
3.19. INFLUENCIA DE LA ROTACIÓN CON LEGUMINOSAS EN EL RENDIMIENTO DE TRIGO BLANDO (<i>TRITICUM AESTIVUM L.</i>) <i>Lafarga A., Azanza R. y Arrese-Igor C.</i> -----	209
3.20. THE USE OF SEWAGE SLUDGE AS A FERTILIZER IN PASTURES: EFFECTS ON BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, USING THE ¹⁵ N ISOTOPE DILUTION METHOD <i>Ferreira E.M., Castro I.V. and Carranca C.</i> -----	211
Indice de autores -----	213

CONFERENCIAS

THE ROLE OF NOD FACTORS IN ROOT NODULE ORGANOGENESIS

Kondorosi A., Charon C., Frugier F., Foucher F., Balland M., Roudier F., Johansson C., Cebolla A., Sousa C., Jimenez-Zurdo J.I., Mergaert P., Staehelin C., Schultze M., Crespi M., Kondorosi E., Felle H.*

Institut des Sciences Végétales CNRS, 91198 Gif-sur-Yvette, France

e-mail: Adam.Kondorosi@isv.cnrs-gif.fr

*Botanisches Institut, Universität Giessen, D-35390 Giessen, Germany

1. Introduction

Under nitrogen-limiting conditions rhizobia can induce the formation of nitrogen-fixing nodules on the roots and (in some cases also on the stems) of their leguminous host plants. In the nodule, molecular N₂ is reduced to NH₄⁺, rendering the plant independent of soil nitrogen.

The molecular basis of root nodule development has been the subject of many years of research which showed that the initiation of nodule organogenesis is controlled by a signal exchange between the two partners (reviewed by Dénarié et al., 1996; Schultze and Kondorosi, 1998). In this molecular dialogue, first specific flavonoids exuded by the plant roots induce the expression of the rhizobial nodulation (*nod*, *nol*, *noe*) genes, in conjunction with the regulatory NodD proteins in the partner bacterium, constituting the first level where host specificity is determined. The nodulation gene products are involved in the biosynthesis and excretion of lipochitoooligosaccharides, the Nod factors. The Nod factors are sufficient to elicit many host responses induced upon inoculation with rhizobia. The basic lipochitoooligosaccharide structure is determined by the common *nodABC* genes, while many other genes are involved in various chemical modifications determining host-specificity. The *R. meliloti* Nod factors are β-1,4 linked N-acetyl-D-glucosamine penta-, tetra- or trisaccharides that carry a sulfate group on the reducing sugar residue and a C15:2 or C16:3 acyl chain on the non-reducing end and this sugar can be modified also by O-acetylation (Lerouge et al., 1991; Schultze et al., 1992). They act as mitogenic signals, triggering the reactivation of cortical cells in the root cortex of the plant host leading to nodule organogenesis.

In our laboratory, we have been studying the molecular basis of nodule organogenesis in *Medicago* induced by the microsymbiont *Rhizobium* (recently called as *Sinorhizobium*) *meliloti*. Here we report on the role of Nod signals in nodule induction.

2. Fine control of *nod* gene expression assures optimal Nod factor concentration and quality

In *R. meliloti*, the *nod* genes involved in Nod factor synthesis and export are organized in six flavonoid inducible transcriptional units, each of them are preceded by *nod* box sequences which provide common sites for NodD binding and coordinated expression of the *nod* genes, thus forming the *nod* regulon (Kondorosi, 1991). This species harbours three copies of the positive regulator *nodD* gene and the products of each have differing flavonoid specificities, which together determine the

host specificity of *nod* gene induction. Negative regulation of *nod* gene expression is provided by a single chromosomal gene *nolR*. The NolR protein downregulates Nod factor production and influences Nod factor quality by repressing the expression of a subset of *nod* genes (Cren et al., 1995). Recently, we showed that NolR is present in a number of *Rhizobium* species (Kiss et al., 1998). The production of high level of Nod factors is deleterious for nodulation, due to the elicitation of defence-like reactions in the plant cells (Savouré et al., 1997). Thus, Nod factors can evoke different plant responses depending on its concentration.

3. Nod signal perception and induced ion fluxes

Despite of numerous efforts in various laboratories, identification of a Nod factor receptor has not been reported yet. It is likely that Nod factors are first sensed by the growing root hairs. In order to study the first events in Nod signal transduction, we have developed a collaboration with Dr. Hubert Felle (Giessen) to analyze intra- and extracellular ion fluxes (Ca^{2+} , K^+ , H^+ and Cl^-) in root hairs and the root hair zone of *Medicago sativa* (alfalfa) using ion-selective microelectrodes. In a first series of experiments changes in intra-cellular pH, in parallel with measuring changes in the plasma membrane potential of root hair cells were observed. Concomitant with a transient plasma membrane depolarization, reaction of the root hairs with an intracellular alkalinization was detected (Felle et al., 1995, 1996). The ability of different factors to induce depolarization and alkalinization correlated well with the symbiotic activity (root hair curling or formation of nodule primordia). Whereas a refractory state for pairs of different types of sulfated Nod factors was observed, the non-sulfated Nod factors did not affect the responsiveness of sulfated molecules and *vice versa*. These data suggest the existence of at least two different perception systems for Nod factors (Felle et al., 1996). The existence of several different Nod factor perception systems has been proposed also by other studies (Ardourel et al., 1994; Minami et al., 1996).

By measuring different ion fluxes in the root hair zone, it was shown that the first event, a Ca^{2+} influx, occurs a few seconds after Nod factor addition. This is required for triggering the subsequent Cl^- efflux which causes membrane depolarization. It is then counterbalanced by an efflux of K^+ ions. A Ca^{2+} ionophore (A23187) was shown to mimick the Nod factor response, while a Ca^{2+} antagonist (nifepidine) inhibited this response, suggesting that Ca^{2+} plays a primary role in Nod signal transduction (Felle et al., 1998).

4. Cell cycle activation in the root cortex

The Nod factors are mitogenic signals that trigger cortical cell division in the leguminous host plant root grown under nitrogen-limiting conditions. Nodule organogenesis is restricted to the emerging root hair zone where cortical cells located opposite the protoxylem poles are transiently competent for Nod factor-activated cell division. This positional information is determined by gradients of various endogenous plant hormones (auxin, cytokinin, ethylene) and/or other growth stimulating factors (uridine), some of them may be provided by photosynthesis (rev. by Schultze and Kondorosi, 1998). A carbon to nitrate imbalance may lead to sucrose translocation to the cortical cells which may serve as carbon sink. In line with this, amyloplast accumulation was detected in roots rapidly after inoculation with *Rhizobium* and in nodule primordia (Ardourel et al., 1994; Bauer et al., 1996; Coba de la Pena et al., 1997).

In eukaryotes, the cell division cycle is controlled by cyclin-dependent kinases (Cdks) and their regulatory subunits, the cyclins. In plant cells, auxin and cytokinin play essential roles in cell cycle regulation. Auxin induces the expression of *cdk* genes and it is required during the whole cell cycle, whereas cytokinin controls G2-M transition by activating the mitotic Cdks (Zhang et al., 1996). Nod factors act on the G0-

arrested cells (Savouré et al., 1994; Yang et al., 1994), however only the inner cortical cells undergo cell division, while the outer cortical cells are arrested in G2 (Yang et al., 1994). Interestingly, when plants are grown in nitrogen-limiting conditions exogenously supplied cytokinin (benzylaminopurine) can also induce cell divisions, expression of the early nodulin gene *enod12A* and several other nodulin genes in the inner cortex and in some cases pseudonodules are formed (Cooper and Long, 1994; Bauer et al., 1996; Coba de la Pena et al., 1997). Cytokinins induce extensive amyloplast deposition, whereas the biologically active sulfated Nod factor induces a more localized accumulation, mainly in the dividing cortical cells, similarly to the initial events triggered by *R. meliloti*. The Nod factor-inducible early nodulin genes tested (*Msgbl*, *Mscal*, *Msenod40*) were induced also by cytokinins (Crespi et al., 1997; Fang and Hirsch, 1998). Thus, cytokinins and Nod factors may coordinate the control of cell division in the root cortex with the requirement for increased carbon metabolism of these cells. These findings suggest the convergence of Nod factor- and cytokining-signalling pathways or at least some of their elements.

Recently we showed that the expression of two G1 type cyclins, *cycMs3* and *cycMs4* (Meskiene et al., 1995; Dahl et al., 1995) could be enhanced in the emerging root hair zone of nitrogen-starved *Medicago* roots not only by treatment with auxin and cytokinin but also upon inoculation with a Nod⁻ mutant of *R. meliloti*. The expression of *cycMs3* was stimulated within 1 hour after treatment of the roots, while the effect on *cycMs4* expression could be detected only a few hours later. The expression of *cdc2MsA* acting during the whole cell cycle (Magyar et al., 1997) however was not altered. These results suggest that the level of *cycMs3* transcript might be involved in starting the cell cycle in the root cortex.

The observation that the stimulation of *cycMs3* expression precedes that of the *cycMs4*, suggests that CycMs3 may act as an upstream activator of CycMs4 which is a root-specific D-type cyclin in *Medicago* and it is expressed predominantly in the root meristem in a cell cycle phase-dependent manner (Dahl et al., 1995). We isolated two types of genomic clones of *cycMs4* and characterized their promoter regions and their expression. For this, they were fused to the *uidA* reporter gene and *Medicago truncatula* transgenic plants were constructed. One of the fusions was expressed exclusively in the nodules: in the meristem and in the invasion zone. The other type of fusion was expressed predominantly in the nodule vascular tissue. These transgenic plants may allow us to study the role of *cycMs3* in the activation of the *cycMs4* gene during nodule induction.

5. Under nitrogen-limiting conditions the *enod40* gene induces cortical cell division

The *enod40* gene is expressed early at the onset of *Medicago* root nodule organogenesis and, as mentioned above, it is induced by Nod factors and cytokinins and the level of its expression in the nodule primordia is high. It codes for an unusually small peptide (12 or 13 amino acids) (van de Sande et al., 1996) and contains a conserved long 3' untranslated region that is able to form stable secondary structures (Crespi et al., 1994). Interestingly, the amounts of oligopeptides detectable in cells containing high levels of the *enod40* transcript are extremely low (van de Sande et al., 1996). To study the possible role of this peculiar gene during nodule development, we set out to construct transgenic *Medicago* plants overexpressing *enod40* from the 35S promoter. Our efforts with *M. sativa* to obtain *enod40*-overexpressing lines were unsuccessful, probably due to the regeneration conditions used where the development of somatic embryos was affected by the altered levels of *enod40* transcripts (Crespi et al., 1994). For the diploid autogamous *Medicago truncatula*, chosen as a model plant for legumes, we have recently developed efficient regeneration and transformation protocols (Hoffmann et al., 1997; Trinh et al., 1998), allowing us to obtain transgenic lines overexpressing the *Mtenod40* gene at a

relatively high level (Charon et al., 1997). Under nitrogen-limiting conditions, the roots of plants overexpressing *enod40* exhibited a significant increase in the amount of cortical cell divisions compared to the control transgenic plants not overexpressing *enod40*. Analysing a series of primary transgenic plants and their descendants, direct correlation was found between the *enod40* transcript levels and the number of cell divisions.

To provide further evidence for the induction of cortical cell division by *enod40* a transient assay was developed (Charon et al., 1997) by using alfalfa plants carrying a fusion of the *Msenod12A* promoter to the *uidA* reporter gene (Bauer et al., 1996). Delivery of the *enod40* expression cassettes under the control of the constitutively expressing 35S promoter to the roots grown in nitrogen-limiting conditions has led to a significant increase in the division of the inner cortical cells. These results indicate again that *enod40* is one of the elements involved in the control of nodule initiation. It is likely that it is a component of the Nod signalling pathway leading to cortical cell division (Fig.1). The observations that the increase of cortical cell division was detectable only in roots under the physiological conditions permitting nodulation and only in the inner cortical cells, do indicate that the observed cortical cell division induced by *enod40* is controlled by a number of plant factors acting on these cells independently from *enod40*. The *enod40* is the first nodulin gene which has been shown so far to act as a regulator of nodule organogenesis.

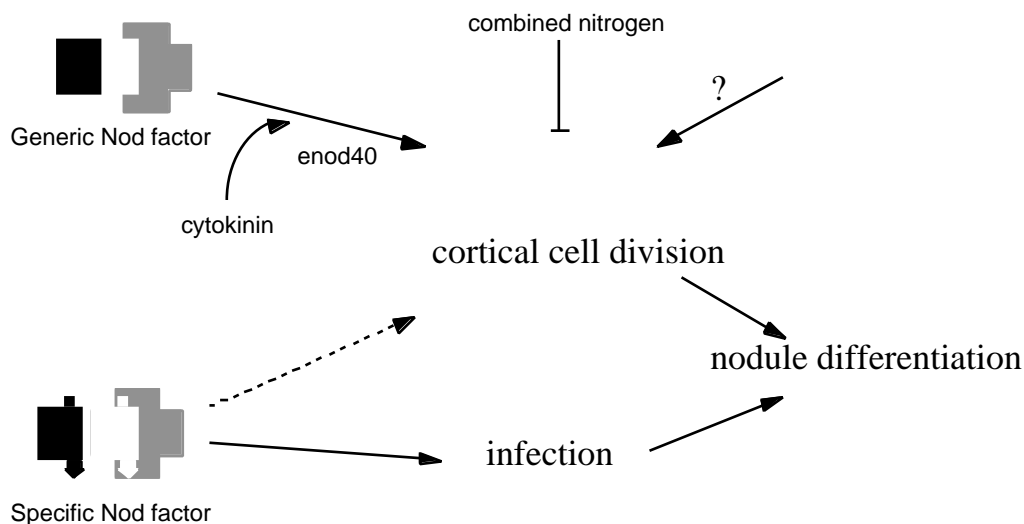


Fig.1. Control of nodule induction by Nod factors. This model incorporates the suggestions by Ardourel et al. (1994), Felle et al. (1996) and Minami et al. (1996) for the existence of two Nod factor perception systems involving two Nod factor receptors, interacting with a generic and a specific Nod factor, respectively. Under nitrogen-limiting conditions signalling by the generic Nod factor is proposed to induce cortical cell division, while the specific Nod factor is required for the infection by *Rhizobium*. Auxin and cytokinin are required for cortical cell division and the *enod40* gene is a downstream element of the Nod factor signalling pathway where this pathway may converge with that of cytokinin. The required auxin may be provided for the cortical cells by the physiological conditions required for nodulation (p. ex. nitrogen limitation) and/or by another Nod factor signalling pathway.

6. Nod signal inactivation

As discussed above, Nod factors are potent mitogens on the roots of leguminous plants and high concentrations of Nod factors may induce plant defence reactions. Thus, their inactivation in the rhizosphere by plant enzymes may be required for

maintaining an effective symbiotic interaction, p. ex. by limiting the mitogenic activity of Nod factors and/or the activation of plant defence reactions.

Nod factors may be substrates for plant chitinases (Staehelin et al., 1994a, Staehelin et al., 1994b) which can cleave a chitin or chitin oligomer backbone. It was shown earlier that structural modifications in the Nod factors influence their stability against hydrolysis by purified chitinases of various plant species (Staehelin et al., 1994b) and when they were applied to intact roots of the host plant, the Nod factors were rapidly degraded and inactivated (Staehelin et al., 1994b; Heidstra et al., 1994). We found however that the biologically active Nod factor of *R. meliloti*, the sulfated and O-acetylated tetramer was not hydrolyzed by any of the purified plant chitinases tested.

Recently, we purified a specific plant hydrolase from *M. sativa* which could cleave also this latter Nod factor, releasing exclusively lipodisaccharides. Therefore, it was named dimer-forming enzyme (DFE). This Nod factor hydrolase was stimulated up to 6-fold by pre-treatment of alfalfa roots with the biologically active Nod factor (Staehelin et al., 1995). The DFE activity was demonstrated to act specifically on Nod factors, while it was much less active on chitin oligomers and inactive on chitin. The enzyme was purified to homogeneity, peptide sequences were obtained and cDNA and genomic clones were isolated. Homology searches in data bases revealed homologies to a class of glycosyl hydrolases, at the same time no similarity to chitinases was detected. The *dfe* gene exhibited the highest level of expression in nodules and roots, while in other tissues it was almost undetectable. Treatment of roots with the biologically active Nod factor did not increase the level of *dfe* transcripts, suggesting that the increase of DFE activity mentioned above may occur at posttranscriptional level. Southern analysis revealed that the *dfe* gene is present in several alleles in *M. sativa* and *M. truncatula*. Moreover, several *dfe*-related sequences were detected in nonlegumes, including *Arabidopsis thaliana*.

It is possible that the DFE plays a role in controlling the Nod factor concentration in the plant cells. As discussed above in Section 2, high level of Nod factors may be deleterious for the establishment for nitrogen-fixing symbiosis and negative control of *nod* gene expression by the repressor NodR modulates the amount of the Nod factors produced. Another way of control may be achieved by the plant hydrolytic enzymes, particularly by the DFE enzymes. Construction of transgenic *Medicago* plants overexpressing the *dfe* gene in sense and antisense orientations are in progress which could help us in the elucidation of the possible role of the DFE in *Rhizobium*-plant interaction (or, based on the presence of homologous sequences in *Arabidopsis*, perhaps in plant development).

7. Control of nodule differentiation

By using various techniques (cold plaque screening, differential screening, differential display RT-PCR) we have isolated numerous *Medicago* genes which are expressed during nodule organogenesis. Several of them exhibit homology to animal, yeast or plant regulatory genes (Frugier et al., 1998; MacKhann et al., 1997 and unpublished work of the laboratory). For instance, an interesting gene appears to be a regulator of the cell cycle involved in cell cycle arrest setting conditions for differentiation. We have been constructing transgenic plants expressing these genes in sense and antisense orientations and then test their phenotypes in symbiosis. This approach may help us identify those genes which play important roles in nodule development.

8. Conclusions

Despite the considerable progress achieved in several laboratories (including ours) on the elucidation, role and mode of action of Nod factors in root nodule organogenesis, our knowledge is still rather scanty. The hormonal control (by auxin, cytokinin, ethylene) of nodulation or the importance of specific physiological conditions

(limiting combined nitrogen, efficient photosynthesis) in nodulation have been known since many years or decades but the molecular basis is still not understood. A major limiting factor of these studies is the lack of some powerful molecular genetic methods, such as reversed genetics for plants, or tagged mutant libraries for leguminous plants which could facilitate the isolation of a large set of tagged symbiotic mutants. This latter approach has recently started in our and several other laboratories.

Nevertheless, the recent progress presented above shows that the perception and transduction of the Nod signals as well as nodule organogenesis are complex processes. It is likely, that several Nod signal perception systems may exist, the Nod signal transduction pathway may have crosstalks with other signalling pathways, as we suggested the existence of common elements with cytokinin signalling in roots. We have showed that *enod40* is involved in the control of nodule initiation and possibly in the near future further similar functions will be assigned to other early nodulin genes as well. Ongoing molecular and cell biological studies combined with genetic approaches are likely to result in important breakthroughs in the near future.

9. References

Ardourel M., Demont N., Debellé F.D., Maillet F., de Billy F, Promé J.C., Dénarié J., Truchet G. 1994. *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide nodulation factors: different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic developmental responses. *Plant Cell* 6: 1357-1374.

Bauer P., Ratet P., Crespi M.D., Schultze M., Kondorosi A. 1996. Nod factors and cytokinins induce similar cortical cell division, amyloplast deposition and *MsEnod12A* expression patterns in alfalfa roots. *Plant J.* 10: 91-105.

Charon C., Johansson C., Kondorosi E., Kondorosi A., Crespi M. 1997. *enod40* induces dedifferentiation and division of root cortical cells in legumes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 8901-8906.

Coba De la Pena T., Frugier F., McKhann H.I., Bauer P., Brown S., Kondorosi A., Crespi M. 1997. A carbonic anhydrase gene is induced in the nodule primordium and its cell-specific expression is controlled by the presence of *Rhizobium* during development. *Plant J.* 11: 407-420.

Cooper J.B., Long S.R. 1994. Morphogenetic rescue of *Rhizobium meliloti* nodulation mutants by trans-zeatin secretion. *Plant Cell* 6: 215-225.

Cren M., Kondorosi A., Kondorosi E. 1995. NodR controls expression of the *Rhizobium meliloti* nodulation genes involved in the core Nod factor synthesis. *Mol. Microbiol.* 15: 733-747.

Crespi M.D., Jurkevitch E., Poiret M. D'Aubenton-Carafa Y., Petrovics G., Kondorosi E., Kondorosi A. 1994. *enod40*, a gene expressed during nodule organogenesis, codes for a non-translatable RNA involved in plant growth. *EMBO J.* 13: 5099-5112.

Crespi M., Johansson C., Frugier F., Poirier S., Sousa C., Kondorosi A. 1997. Classical and novel growth regulators acting during nodule initiation. In Nitrogen Fixation for the 21st Century, eds. Elmerich C., Kondorosi A., Newton W. E., pp.221-222, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht.

Dahl M., Meskiene I., Bogre L., Cam Ha D.T., Swoboda I., Hubmann R., Hirt H, Heberle-Bors E. 1995. The D-type alfalfa cyclin gene *Ms4* complements G1 cyclin deficient yeast and is induced in the G1 phase of the cell cycle. *Plant Cell* 7: 1847-1857.

- Dénarié J., Debelle F., Promé J.C. 1996. *Rhizobium* lipo-oligosaccharide nodulation factors: Signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 503-535.
- Fang Y.W., Hirsch A.M. 1997. Studying early nodulin gene *ENOD40* expression and induction by nodulation factor and cytokinin in transgenic alfalfa. *Plant Physiol.* 116: 53-68.
- Felle H.H., Kondorosi E., Kondorosi A., Schultze M. 1995. Nod signal-induced plasma membrane potential changes in alfalfa root hairs are differentially sensitive to structural modifications of the lipochitooligosaccharide. *Plant J.* 7, 939-947.
- Felle H.H., Kondorosi E., Kondorosi A., Schultze M. 1996. Rapid alkalization in alfalfa root hairs in response to rhizobial lipochitooligosaccharide signals. *Plant J.* 10: 295-301.
- Felle H.H., Kondorosi E., Kondorosi A., Schultze M. 1998. The role of ion fluxes in Nod factor signalling in *Medicago sativa*. *Plant J.* 13: 455-463.
- Frugier F., Kondorosi A., Crespi M. 1998. Identification of novel putative regulatory genes induced during alfalfa nodule development with a cold-plaque screening procedure. *Mol. Plant-Microbe Interact.* in press.
- Heidstra R., Geurts R., Franssen H., Spaijk H.P., Van Kammen A., Bisseling T. 1994. Root hair deformation activity of nodulation factors and their fate on *Vicia sativa*. *Plant Physiol.* 105: 787-797.
- Hoffmann B., Trinh T.H., Leung J., Kondorosi A., Kondorosi E. 1997. A new *Medicago truncatula* line with superior in vitro regeneration, transformation, and symbiotic properties isolated through cell culture selection. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10: 307-315.
- Kiss E., Mergaert P., Oláh B., Kereszt A., Staehelin C., Downie A.J., Davis A., Kondorosi A., Kondorosi E. 1998. Negative regulation of nodulation genes by *nolR* in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strain TOM. *Mol. Plant-Microbe Interact.* under revision.
- Kondorosi A. 1991. Regulation of nodulation genes in rhizobia. In *Molecular Signals in Plant-Microbe Interactions*, ed. Verma D.P.S., pp. 325-340, CRC Press, Boca Raton.
- Lerouge P., Roche P., Faucher C., Maillet F., Truchet G., Promé J.C., Dénarié J. 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 344: 781-784.
- Magyar Z, Meszaros T., Miskolczi P., Deak M., Feher A., Brown S., Kondorosi E., Athanasiadis A., Pongor S., Bilgin M., Bako L., Koncz C., Dudits D. 1997. Cell cycle phase specificity of novel cyclin-dependent kinase variants in synchronised alfalfa cells. *Plant Cell* 9: 223-235.
- Meskiene I., Bogre L., Dahl M., Pirck M., Cam Ha D.T., Swoboda I., Heberle-Bors E., Ammerer G., Hirt H. 1995. *cycMs3*, a novel B-tupe alfalfa cyclin gene, is induced in the G0-toG-1 transition of the cell cycle. *Plant Cell* 7: 759-771.
- McKhann H.I., Frugier F., Petrovics G., De la Pena T.C., Jurkevitch E., Brown S., Kondorosi E., Kondorosi A., Crespi M. 1997. Cloning of a WD-repeat-containing gene from alfalfa (*Medicago sativa*): a role in hormone-mediated cell division? *Plant Mol. Biol.* 34: 771-780.
- Minami E., Kouchi H., Carlson R.W., Cohn J.R., Kolli V.K. Day R.B., Ogawa T., Stacey G. 1996. Cooperative action of lipo-chitin nodulation signals on the induction

of the early nodulin, ENOD2, in soybean roots. *Mol. Plant-Microbe Interact*; 9: 574-583.

Savouré A., Magyar Z., Pierre M., Brown S., Schultze M., Dudits D., Kondorosi A., Kondorosi E. 1994. Activation of the cell cycle machinery and the isoflavonoid biosynthesis pathway by active *Rhizobium meliloti* Nod signal molecules in *Medicago* microcallus suspensions. *EMBO J.* 13: 1093-1102.

Schlaman H.R.M., Phillips D.A., Kondorosi E. 1998. Genetic organization and transcriptional regulation of rhizobial nodulation genes. In *Rhizobiaceae*, eds., Spaink H.P., Kondorosi A., Hooykaas P., Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, in press.

Schultze M., Kondorosi A. 1998. Regulation of symbiotic nodule development. *Annu. Rev. Genet.* in press.

Schultze M., Quiclet-Sire B., Kondorosi E., Virelizier H., Glushka J.N., Endre G., Gero S.D., Kondorosi A. 1992. *Rhizobium meliloti* produces a family of sulfated lipo-oligosaccharides exhibiting different degrees of plant host specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 89: 192-196.

Stahelin C., Granado J., Müller J., Wiemken A., Mellor R.B., Felix .G., Regenass M., Brogton W.J., Boller T. 1994a. Perception of *Rhizobium* nodulation factors by tomato cells and inactivation by root chitinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2196-2200.

Stahelin C., Schultze M., Kondorosi E., Mellor R.B., Boller T., Kondorosi A. 1994b. Structural modification in *Rhizobium meliloti* Nod factors influence their stability against hydrolysis by root chitinases. *Plant J.* 5: 319-330.

Stahelin C., Schultze M., Kondorosi E., Kondorosi A. 1995. Lipochitooligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium meliloti* induce their rapid degradation by the host plant alfalfa. *Plant Physiol.* 108: 1607-1614.

Trinh T.H., Ratet P., Kondorosi E., Durand P., Kamaté K., Bauer P., Kondorosi A. 1998. Rapid and efficient transformation of diploid *Medicago truncatula* and *Medicago sativa* ssp. *falcata* lines improved in somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 17: 345-355.

Van de Sande K., Pawlowski K., Czaja I., Wieneke U., Schell J., Schmidt J., Walden R., Matvienko M., Wellnik J., van Kammen A., Franssen H., Bisseling T. 1996. Modification of phytohormone response by a peptide encoded by *ENOD40* of legumes and a nonlegume. *Science* 273: 370-373.

Walden R., Matvienko M., Wellnik J., van Kammen A., Franssen H., Bisseling T. 1996. Modification of phytohormone response by a peptide encoded by *ENOD40* of legumes and a nonlegume. *Science* 273: 370-373.

Yang W.C., De Blank C., Meskiene I., Hirt H., Bakker J., van Kammen A., Franssen H., Bisseling T. 1994. *Rhizobium* Nod factors reactivate the cell cycle during infection and nodule primordium formation, but the cycle is only completed in primordium formation. *Plant Cell* 6: 1415-1426.

Zhang K., Letham D.S., John P.C.L. 1996. Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34cdc2-like H1 histone kinase. *Planta* 200: 2-12.

METABOLIC INTERACTIONS BETWEEN BACTEROID AND PLANT IN LEGUME NODULES

Day David A.

Division of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Science, Australian National University, Canberra ACT, 0200, Australia. David.Day@anu.edu.au

Maintenance of nitrogen-fixing symbioses requires a coordinated exchange of nutrients between the plant and the bacteroid. The major metabolic exchange is reduced carbon from the plant for fixed nitrogen from the bacteroid, but many other compounds must also be supplied to the bacteroid which is completely dependent on the plant for nutrients other than nitrogen. The physical interface between the symbiotic partners in legume nodules is the peribacteroid membrane (PBM) which envelopes the bacteroids and effectively excludes them from the plant cytosol. This paper reviews our current knowledge of the transport properties of this membrane, drawing heavily on studies with soybean.

Symbiosome formation

The term symbiosome refers to the organelle-like structure comprised of the PBM, the peribacteroid space which it encloses and the bacteroids within that space (see Fig. 1).

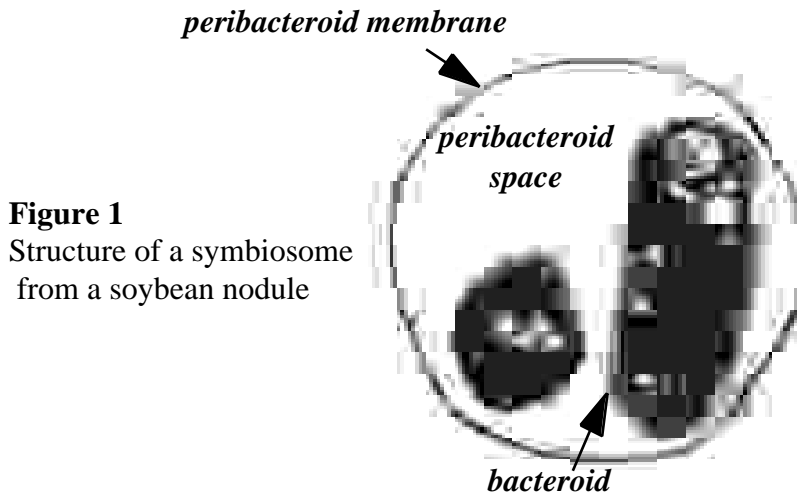


Figure 1
Structure of a symbiosome from a soybean nodule

Symbiosomes are formed when rhizobia are released from the infection thread into the infected cells of the root cortex. This occurs by endocytosis of the infection thread membrane and results in encapsulation of the bacteria in a plant membrane (Fig. 1). Only a few bacteria infect any one cortical cell and after endocytosis the rhizobia proliferate resulting in the cytoplasm of mature infected cells being packed with symbiosomes. The packed symbiosomes are intercalated with a honeycomb-like network of actin filaments, which may play a role in the organisation of the symbiosomes and metabolite movement between them (Whitehead et al., 1998). In the nodules of temperate legumes such as pea all symbiosomes contain only a single bacterium. In tropical associations, such as soybean, the symbiosomes become multi-bacteroid as small symbiosomes fuse to form larger ones. Fusion of symbiosomes in soybean is preceded by the formation of PBM extensions which subsequently merge (E. Fedorova and D.A. Day, unpublished results). Once the

bacteria have stopped dividing they undergo differentiation into their symbiotic form, known as bacteroids.

Transport of carbon into symbiosomes

A continuous supply of reduced carbon to the bacteroid is required to provide reductant and ATP for the nitrogenase reaction. Symbiosomes isolated from various legumes are able to take up a range of reduced carbon substrates, such as glucose in french bean (Herrada et al., 1989), oxalate in *Vicia* (Trinchant et al., 1994) and glutamate in lupin (Radyukina et al., 1992). However, symbiosomes isolated from all legumes studied to date are able to accumulate dicarboxylates and a specific dicarboxylate transporter on the PBM has been identified in french bean, soybean and pea (Herrada et al., 1989; Udvardi et al., 1988; Rosendahl et al., 1992). Kinetic and inhibitor studies with soybean symbiosomes have shown that the PBM possesses a carrier with a preference for malate and succinate which appears to act as a uniport for the monovalent dicarboxylate anion (Udvardi et al., 1988). This is essentially a passive transport mechanism with malate uptake into the symbiosomes being driven by the electrical potential () across the PBM (see below) and subsequent uptake and metabolism by the enclosed bacteroids. The properties of the soybean PBM transporter show that it is quite distinct from its counterparts on other cell membranes (Day et al., 1990). On the basis of substrate specificity, inhibitor sensitivity and pH optimum, the dicarboxylate transporter on the PBM is also distinct from the DctA protein of the bacteroid. The maximum velocity of the PBM dicarboxylate transport system is less than that of the bacteroid Dct system, perhaps indicating that the PBM transporter will rate limit when substrate is plentiful. Nonetheless, measured rates of malate transport across the PBM appear more than adequate to support rates of nitrogen fixation estimated from measurements with isolated bacteroids (Day et al., 1989). The rate of sugar and amino acid transport in soybean symbiosomes, on the other hand, is too slow to support estimated nitrogen fixation rates.

The PBM protein nodulin 26 has recently been shown to have channel activity when isolated and inserted into a lipid bilayer, transporting malate amongst other anions (Weaver et al., 1994). Nodulin 26 is phosphorylated by a PBM protein kinase and in isolation this renders the channel sensitive to the voltage across the membrane (Lee et al., 1995). Phosphorylation/dephosphorylation of PBM proteins is correlated with stimulation/inhibition of malate uptake by isolated soybean symbiosomes (Ou Yang et al., 1991). Since nodulin 26 is the major PBM protein phosphorylated in soybeans it is possible that it is the dicarboxylate transporter. However, the channel activity of isolated nodulin 26 is rather non-specific and it also demonstrates aquaporin activity. It is possible that nodulin 26 is a bifunctional transport protein but more work is needed to confirm it as the malate transporter.

Transport of nitrogen out of symbiosomes

Amino acid transport

Several models which integrate carbon and nitrogen exchange across the PBM via the movement of amino acids have been proposed (Kohl et al., 1988; Kim et al., 1990; Kahn et al., 1985). However, transport studies with isolated symbiosomes from a number of different legumes have failed to identify the amino acid transporters on the PBM which are needed to coordinate the proposed schemes (Udvardi and Day, 1997). The study of amino acid transport into isolated symbiosomes demonstrate the importance of the PBM in determining the flow of metabolites between plant and bacteroid.

Efflux of amino acids from the bacteroid does not necessarily require operation of a coordinated exchange with other metabolites as in the schemes mentioned above. For example, it has been reported that both aspartate and, especially, alanine, which can be readily formed in the bacteroid from malate, efflux rapidly from isolated soybean

bacteroids (Kouchi et al., 1991) and pea symbiosomes (Rosendahl et al., 1992) in the presence of malate. Bacteroids isolated from various legumes have a number of active transport mechanisms for the transport of amino acids, especially aspartate and glutamate, as mentioned above. When free bacteroids are loaded with ^{14}C -aspartate or glutamate, the amino acid can exchange for external cold aspartate, glutamate and malate (Whitehead et al., 1998). If these amino acids are synthesised in the bacteroid when malate is metabolised by isolated symbiosomes, then they could exchange for malate in the peribacteroid space. The exchanged amino acid may then diffuse from the symbiosome down a concentration gradient (which will be large when isolated symbiosomes are suspended in a relatively large volume of reaction buffer). Such efflux is, however, very slow (Whitehead et al., 1998). Most of these studies have been performed with symbiosomes from mature nodules. In developing nodules, before the bacteroids begin to fix atmospheric nitrogen, it is likely that nitrogen is transported from the plant to the differentiating rhizobia. It is possible, therefore, that the permeability of the PBM to amino acids changes during development. It is also possible that amino acids other than those examined to date are transported across the PBM, or that amino acid transporters are regulated in such a manner that they are inactive in isolated symbiosomes

Ammonium transport across the peribacteroid membrane

More recently, attention has returned to the transport of ammonium across the PBM. Ammonium assimilatory enzymes in the bacteroid are repressed in the symbiotic state and consequently NH_3 is likely to diffuse rapidly into the PBS, driven by its concentration gradient and the expected pH across the bacteroid IM (see below). The acidic pH in the PBS, the result of proton pumping by both the PBM ATPase and the bacteroid respiratory chain, will ensure that the bulk of NH_3 is converted to NH_4^+ . Repression of the bacteroid ammonium carrier (Tate et al., 1998), prevents re-uptake of NH_4^+ which is, therefore, available to the plant. However, a transporter is required on the PBM for the rapid movement of this ion.

Initial studies, using the ammonium analogue methylammonium, failed to find any evidence for such a carrier (Udvardi and Day, 1990), but this technique has limitations in intact symbiosomes when measuring efflux rather than uptake. More recently, the movement of NH_4^+ in isolated symbiosomes has been reinvestigated using the patch clamp technique and a novel voltage-gated monovalent cation channel capable of transporting NH_4^+ across the PBM has been identified (Tyerman et al, 1995). A similar channel has been identified in peas nodules, using ^{14}C -methylammonium and inside-out PBM vesicles (Mouritzen et al., 1997). This channel opens to allow NH_4^+ efflux from the symbiosome when a membrane potential is generated across the PBM, as will occur in vivo by the action of the H^+ -ATPase on the PBM (see below). In PBM patches, NH_4^+ currents were rectified so that the movement of NH_4^+ was unidirectional - effectively out of the peribacteroid space (Tyerman et al, 1995). Subsequent experiments have indicated that this rectification depends on the concentration of calcium and magnesium on either face of the PBM; both cations inhibit ion flow (L. Whitehead, S. Tyerman and D.A. Day, unpublished results). Since magnesium concentrations in the plant cytosol are expected to be in the mM range, it is probable that the channel will be outwardly rectified (from the PBS) in vivo, preventing backflow of NH_4^+ into the symbiosome. The role of calcium in regulating the channel is less clear: calcium concentrations in the plant cytosol are usually very low, but we (L. Whitehead, A.H. Millar and D.A. Day, unpublished results) have found substantial quantities of calcium in the PBS of soybean nodules. Whether this is free or bound is not known. The PBM channel is selective for small monovalent cations, with K^+ and NH_4^+ being the most active, but does not transport divalent cations, larger cations such as choline, or anions (Tyerman et al, 1995). However, at physiological concentrations (10-20 mM), the channel shows a preference for ammonium over potassium.

The channel described above has properties that one would expect of a transporter delivering NH_4^+ to the plant, and the magnitude of the ammonium currents across the patch, extrapolated to the whole symbiosome, are quite adequate to account for estimates of nitrogen fixation rates in symbiosomes *in vivo* (Tyerman et al, 1995). However, identification of the channel does not rule out the possibility that some diffusion of NH_3 occurs across the PBM (*in vivo*, this will depend on the pH of the peribacteroid space; Szafran and Haaker, 1995; Udvardi and Day, 1990).

We have attempted to isolate a cDNA encoding the PBM ammonium channel using functional complementation of yeast (Kaiser et al unpublished). Several different transformations of the mutant with a cDNA library from six week old soybean plants, yielded a single cDNA which we have termed *GmSAT1* (*Glycine max* symbiotic ammonium transport). Transcripts of the *GmSAT1* gene are readily detected in N_2 -fixing nodules but not in other tissues of soybean, indicating that GmSAT1 is a nodulin. ^{14}C -methylammonium uptake studies with yeast expressing *GmSAT1*, combined with patch-clamp analysis of protoplasts from these cells, demonstrated that GmSAT1 acts at the yeast plasma membrane and displays biochemical and electrophysiological characteristics similar to the soybean PBM monovalent cation channel described above. Longer term studies with $^{15}\text{NH}_4^+$ demonstrated that GmSAT1 transport ammonium as well as methylammonium. An antibody raised against GmSAT1 expressed in *E. coli* reacts with a 39 kD protein in the PBM but not in the nodule soluble fraction (B. Kaiser unpublished results). The deduced amino acid sequence of GmSAT1 shows no homology to proteins in the data banks, in accord with the unique properties of the PBM channel. Hydropathy analysis suggests that GmSAT1 has a single membrane spanning helix with an amino acid arrangement consistent with channel formation as an oligomer (similar to some viral cation channel proteins).

The role of the PBM H^+ -ATPase in regulating ion transport in symbiosomes

Several laboratories have reported ATPase activity associated with the PBM from a number of legumes (see Udvardi and Day, 1997, for a review). This ATPase pumps protons into the PBS and generates a ΔpH which in the presence of permeant anions is readily converted to a $\Delta\psi$ across the PBM. In addition, the bacteroid respiratory electron transport chain pumps protons out of the bacteroid and into the PBS. The end result is acidification of the PBS. The precise pH of the PBS will be determined by the relative activities of the proton pumps and counter ion movements, but could be up to two pH units more acidic than the plant cytosol (Udvardi et al., 1991). Thus *in vivo*, the PBM and bacteroid inner membrane delineate three compartments of contrasting pH: a slightly alkaline plant cytosol, an acidic PBS, and an alkaline bacteroid interior. Further, the PBM and bacteroid membrane have opposite electrical polarities. These relationships are illustrated in Figure 2 and will determine in part the nature of transport systems involved in the exchange of metabolites between plant and bacteroid.

The dicarboxylate and ammonium transport mechanisms described above seem ideally suited to take advantage of the symbiosome membrane gradients (Fig. 2). The PBM dicarboxylate transporter is probably a uniport mechanism which allows electrophoresis of the malate anion down its electrical and concentration gradients, into the PBS. The Dct system of the bacteroid, on the other hand, catalyses H^+ /malate⁻ cotransport and is driven by the ΔpH across the bacteroid inner membrane. An acidic PBS ensures that any NH_3 present is protonated to form NH_4^+ , acting as a trap and driving further diffusion of NH_3 out of the bacteroid. The NH_4^+ channel on the PBM is voltage gated and opens to allow NH_4^+ movement into the plant cytosol upon PBM energisation; again, this is a passive process per se, but

the high glutamine synthase activity of the plant cytosol ensures rapid assimilation and maintenance of a strong concentration gradient out of the symbiosome.

Thus the proton pumps of the PBM and bacteroid serve to coordinate and facilitate the exchange of malate for ammonium between plant and bacteroid. Conversely, the exchange of malate and ammonium across the PBM and bacteroid membranes helps to maintain pH balance in the PBS. This may be important for the stability of the symbiosis since excessive acidification of the PBS may inhibit nitrogen fixation and/or lead to early senescence of infected cells (Brewin, 1991). In this context, it is interesting to note that Szafran and Haaker (1995) found that acidification of the PBS upon adding ATP to isolated pea symbiosomes inhibited nitrogenase activity - but in this case nitrogenase activity was assayed by acetylene reduction and ammonia was not formed. If these experiments were repeated using N_2 instead of acetylene, and malate as a source of reductant for the symbiosomes, then ATP may well stimulate nitrogen fixation.

The nature of the ATPase on the PBM has been the subject of some contention. Most biochemical studies indicate that the enzyme falls into the P-type class such as found on the plasma membrane. A cDNA encoding such an enzyme was isolated from *Phaseolus* nodules, but Northern analysis suggested that it was localised only in the uninfected cells (Campos et al., 1996). We (E. Fedorova, R. Thomson and D.A. Day, unpublished) have used antibodies against a P-type ATPase from tobacco to show that soybean nodules contain such an ATPase in both infected and uninfected cells, on both the plasma membrane and the PBM. The PBM protein is a slightly different molecular weight than that seen on the plasma membrane, suggesting that it is a distinct isoform. We are currently attempted to clone the cDNA encoding the PBM protein.

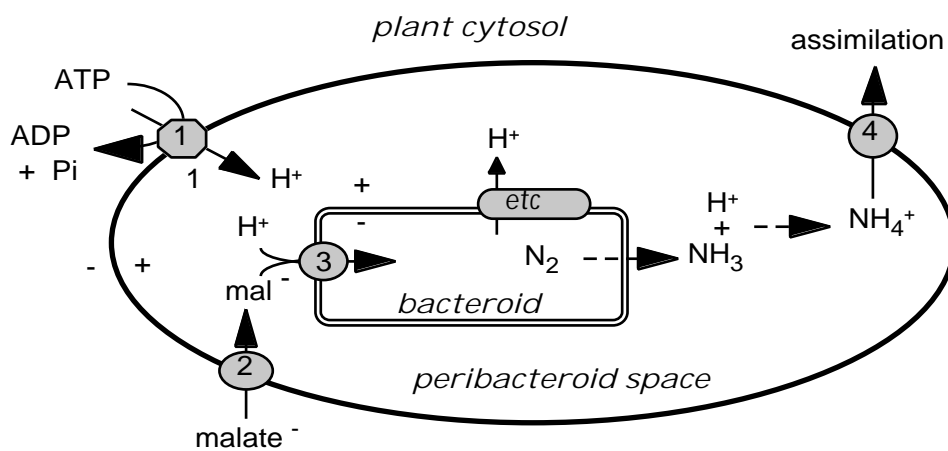


Figure 2: Schematic summary of ion transport across the PBM of soybean nodules. 1 = H^+ -ATPase; 2 = PBM dicarboxylate carrier; 3 = bacteroid (Dct) H^+ /malate symporter; 4 = PBM ammonium channel.

Transport of inorganic ions across the PBM

A range of inorganic nutrients are required by the bacteroids both during nodule development and during steady-state nitrogen fixation. Our knowledge of how these are acquired in planta is very poor. Inorganic cations required include vanadium, iron, molybdenum, nickel and cobalt (Rosendahl, 1991). In addition, Na and K transport is likely to be important for ion and osmotic balance across the PBM and bacteroid IM. There are indications that the symbiosome contains significant concentrations of Ca which is required, amongst other things, for cell wall structure in rhizobia, implying a transporter for this ion on the PBM. Pi is also required by the bacteroid but nothing is known about movement of this ion across the PBM. The

rapidity with which some inorganic anions, such as nitrate and chloride, collapse the across the PBM (Udvardi and Day 1989) implies that at least one anion channel exists on the PBM, and it may be that Pi shares this. A nodule-enhanced cDNA, *GMAK170*, isolated by Kouchi and Hata (1993) has amino acid sequence homology with a family of sulphate transporters from other systems (Sandal and Marcker, 1994), but its function has yet to be determined.

One important inorganic nutrient whose transport in nodules and rhizobia has been studied in a little more detail, is iron.

Iron transport

There is a large demand for iron in the bacteroid for synthesis of iron-containing proteins necessary for nitrogen fixation, such as nitrogenase itself and the cytochromes of the respiratory chain. Recently, two reports on the acquisition of iron by isolated soybean symbiosomes have appeared (LeVier et al. 1996, Moreau et al. 1995) and together they show that ferric citrate is transported across the PBM. Bacteroids can also take up ferric citrate but do so less readily than do intact symbiosomes and most of the Fe taken up as ferric citrate by isolated symbiosomes remains in the PBS. In a separate study, Wittenberg et al. (1996) found that the PBS of isolated soybean symbiosomes contains large quantities of non-heme iron. This iron is bound to low molecular-mass compounds in the PBS, whose spectra resemble those of known bacterial siderophores. Taken together the results suggest that ferric citrate can be transported across the PBM into the PBS where high-affinity binding compounds, released by the bacteroids, sequester the Fe. The precise identity of the compounds which bind Fe in the PBS is not known, although they clearly differ from the siderophores produced and excreted by free-living rhizobia (Guerinot and Yi 1994).

The Wittenberg et al. (1996) study suggests that the PBS may be a major storage compartment for Fe in the nodule. If and how the Fe is released from these compounds is not known, but it is possible that an NADH-ferric chelate reductase identified in the PBM (LeVier et al. 1996) could be involved. If the reductase functions as it does in the plasma membrane, oxidising NADH on the plant cytosolic side and Fe³⁺ on the PBS side, then it could reduce the ferric chelates in the PBS and allow the release of ferrous ions either for transport back into the plant cytosol or for transport into the bacteroids. In this context, it has been shown recently that the PBM of soybean possess a ferrous iron transporter as well as the ferric citrate uptake system (S. Moreau, A. Puppo and D.A. Day, unpublished results). The relationship between these iron transport and storage pools remains to be elucidated.

Concluding Remarks

Several different transport proteins that are likely to be involved in nutrient exchange between the plant and bacteroid have been identified and partially characterised on the PBM of legume nodules. However, we still have much to learn about the regulation of these transporters and many others which remain to be identified. The production of transgenic plants in which the expression of these transporters is altered may allow us to place them in a physiological context.

References

- Brewin, N. J. 1991. *Rev. Cell Biol.* 7: 191-226
- Campos F., Perezcastineira J.R., Villalba J.M., Culianezmarcia F.A., Sanchez F., Serrano R. 1996 *Plant Mol.Biol.*,32, 1043-1053, 1996
- Day, D.A., G.D. Price & M.I. Udvardi. 1989. *Aust. J. Plant Physiol.* 16. 69-84
- Day, D. A., Ou Yang, L.-J. & Udvardi, M. K. 1990. In, *Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives* (P. M. Gresshoff, G. Stacey and W. E. Newton, eds), pp. 219-226. Chapman and Hall, New York, NY.
- Guerinot, M. L. & Yi, Y. 1994. *Plant Physiol.* 104: 815-820.
- Herrada, G., Puppo, A. & Rigaud, J. 1989. *J. Gen. Microbiol.* 135: 3165-3177.

- Kahn, M. L., Kraus, J. & Sommerville, J. E. 1985. In, Nitrogen Fixation Research Progress (H. J. Evans, P. J. Bottomley and W. E. Newton, eds), pp. 193-199. Martinus Nijhoff, Dordrecht. ISBN 90-247-3255-7.
- Kohl, D. H., Schubert, K. R., Carter, M. B., Hagedorn, C. H. & Shearer, G. 1988. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2036-2040.
- Kouchi, H. & Hata, S. 1993. Mol. Gen. Genet. 238: 106-119.
- Lee, J.W., Zhang, Y., Weaver, C.D., Shomer, N.H., Louis, C.F., & Roberts, D.M. 1995. J. Biol. Chem. 270: 27051-57.
- LeVier, K., Day, D. A. & Gueriot, M. L. 1996. Plant Physiol. 111: 613-618.
- Moreau, S., Meyer, J. M. & Puppo, A. 1995. FEBS Lett. 361: 225-228.
- Mouritzen, P. and Rosendahl, L. 1997 Plant Physiol 115: 519-526.
- Ou Yang, L.-J., Whelan, J., Weaver, C. D., Roberts, D. M. & Day, D. A. 1991. FEBS Lett. 293: 188-190.
- Radyukina, N. L., Brusikova, R. K. & Izmailov, S. F. 1992. Dok. Bot. Sci. 323: 603-606.
- Rosendahl, L., Dilworth, M. J. & Glenn, A. R. 1992. J. Plant Physiol. 139: 635-638.
- Rosendahl, L., Glenn, A. R. & Dilworth, M. J. 1991 In, Biology and Biochemistry of Nitrogen Fixation. (Dilworth, M.J. & Glenn, A.R., eds) pp259-293. Elsevier, Amstredam.
- Sandal, N. N. & Marcker, K. A. 1994. Trends Bichem. Sci. 19: 19.
- Szafran, M. M. & Haaker, H. 1995. Plant Physiol. 108: 1227-1232.
- Tate, R., Riccio, A. Merrick, M & Patriarca, E.J. 1998. MPMI 11, 188-198.
- Trinchant, J.-C., Guerin, V. & Rigaud, J. 1994. Plant Physiol. 105: 555-561.
- Tyerman, S. D., Whitehead, L. F. & Day, D. A. 1995. Nature 378: 629-632.
- Udvardi, M. K. & Day, D. A. 1989. Plant Physiol. 90: 982-987.
- Udvardi, M. K., Price, G. D., Gresshoff, P. M. & Day, D. A. 1988. FEBS Lett. 231: 36-40. MPMI 3: 334-340.
- Udvardi, M. K., Lister, D. L. & Day, D. A. 1991. Arch. Microbiol. 156: 362-366.
- Udvardi, M.K. and Day, D.A. 1997. Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol. 48: 493-523.
- Weaver, C. D., Crombie, B., Stacey, G. & Roberts, D. M. 1991. Plant Physiol. 95: 222-227.
- Weaver, C. D., Shomer, N. H., Louis, C. F. & Roberts, D. M. 1994. J. Biol. Chem. 269: 1858-17862.
- Whitehead, L. and Day, D.A. 1997. Physiol. Plantarum 100: 30-44.
- Whitehead, L. F., D. A. Day and A. R. Hardham. 1998a Protoplasma, *in press*
- Whitehead, L. F., S. Young and D.A. Day 1998b. Soil Biology and Biochemistry *in press*
- Wittenberg, J. B., Wittenberg, B. A., Day, D. A., Udvardi, M. K. & Appleby, C. A. 1996. Plant Soil 178: 161-169.

REGULATION OF NITROGEN FIXATION IN LEGUMES

Minchin F.R.

Institute of Grassland and Environmental Research, Plas Gogerddan, Aberystwyth, Ceredigion SY23 3EB, UK. frank.minchin@bbsrc.ac.uk

Introduction

Johnson et al. (1997), in a consideration of plant-mycorrhizal associations, proposed a continuum of interactions ranging from mutually beneficial to both partners (mutualism) to mutually detrimental (competition). For the legume-rhizobia association, most people would assume it to be mutualistic or symbiotic. However, there are several reasons to consider that the relationship actually began with rhizobia as a parasite of legumes and has evolved into a system where the plant exercises strong control over the rhizobia. This idea was originally proposed on the basis of a consideration of rhizobial genes (Djordjevic et al., 1987) and was supported by a consideration of the evolution of legume nodules (Sprent et al., 1993). These authors noted that in nodules of primitive legume species the rhizobia are sometimes retained within thick-walled infection threads and N_2 fixation activity is often low and/or sporadic. Sprent et al. (1993) also suggested that in the nodules of advanced legume species the plant could be considered to exploit the rhizobia, which gains little-or-no advantage in terms of species continuity. Indeed, it has yet to be established whether the increase in rhizobial numbers following nodule senescence and release of viable bacteroids and vegetative cells is significantly greater than would occur through rhizobial multiplication in the rhizosphere. These authors further suggested that in the modern "symbiosis" the bacteroids may be required to have high rates of N_2 fixation through being housed in a symbiosome which acts as an acid lytic compartment (Brewin et al., 1990) and receives a continuous supply of dicarboxylic acids. The bacteroids then have to use these acids in an energy expensive process with an alkali product; the overproduction of ammonia through N_2 fixation. Under the scheme of Johnson et al. (1997) this situation could be considered as plant commensalism or even, in extreme situations, plant parasitism.

To date this view of the plant-rhizobia association as a "controlled parasitism" has been considered in terms of rhizobial genetics (Djordjevic et al., 1987) and nodule evolution (Sprent et al., 1993), and a recent review has also pointed out the similarities in plant responses to invasion by pathogens and invasion by rhizobia (Baron and Zambryski, 1995). What I propose to do is consider the implications of a controlled parasitism in terms of the physiology of nodules and legume plants.

Consequences of a controlled parasitism

The first consequence of the plant exercising tight control over the rhizobia is that they would need to be housed in separate organelles (the nodules) whose sink

strength could be regulated and which could, if necessary, be shed from the roots. Nodules are often described as organelles which provide an "ideal environment" for N_2 fixation, but it is seldom recognized that they also provide an appropriate site for controlling the rate of N_2 fixation. Indeed, it has yet to be established that the provision of the appropriate conditions for fixation actually requires a separate organelle.

The second consequence of the controlled parasitism hypothesis is that nodules would have to be very complex organelles. This is because the generation time of rhizobia is much shorter than that of legumes, hence their potential for genotypic adaptation is much greater. Therefore, the nodules would have to maintain a number of different control processes in order to outmanoeuvre any genetic modifications by the rhizobia which are intended to reduce plant control and allow a return to a more parasitic life-style. This may explain the observed complexity of the nodule; where there are complex controls over (a) the nodulation process (eg. Lugtenberg et al., 1995; Pawlowski and Bisseling, 1995), (b) carbon metabolism (eg. Minchin et al., 1996), (c) oxygen diffusion (eg. Minchin, 1997) and (d) transport across the symbiosome membrane (eg. Udvardi and Day, 1997). To this list may also be added control of solute fluxes through plasmodesmata (Lucas, 1997), which are known to show anatomical complexity in legume nodules (Brown et al., 1995).

The third consequence of tight control over rhizobial activity is that overall regulation of nodule production and function must operate through the host plant. Such overall control is likely to involve the main forms of organic exchange between the host plant and nodules, that is carbohydrates and nitrogen compounds. Indeed, as the plant's carbohydrate status will determine its growth rate, and hence its nitrogen requirements from the nodules, it seems reasonable to hypothesise that overall control of nodule activity will operate through the nitrogen status of the host plant (see Hartwig and Nosberger, 1994). Strong circumstantial evidence for such control through plant nitrogen status has been provided by experiments involving argon/oxygen feeding to produce a low plant N status (Heim et al., 1993), the reduction of N_2 fixation activity through feeding of asparagine or glutamine to the host plant (Oti-Boateng and Silsbury, 1993), the reduction of N_2 fixation through debudding which increased soluble nitrogen levels in the plants (Oti-Boateng et al., 1994), and comparisons between the effects of different degrees of defoliation on plant nitrogen demand and N_2 fixation rates (Hartwig et al., 1994). It is also generally assumed that a control of nodule activity based on the plant nitrogen status would involve nitrogen compounds being transported to the nodules via the phloem (e.g. Parsons et al., 1993) and elegant confirmation of this hypothesis was recently provided by Neo and Layzell (1997). They foliar fed ammonia to shoots of lupin and soybean, at a concentration which did not affect either photosynthesis activity or phloem carbohydrate levels, and found a substantial increase in levels of both glutamine and asparagine. These increases induced a decrease in N_2 fixation within 4 hours. Furthermore, the decrease was fully reversible by increasing the external O_2 concentration, showing that it was operating through a decrease in the O_2 supply to the bacteroids.

Consequences of control through plant nitrogen status

One consequence of having overall control of nodule activity based on the plant's nitrogen status is that many environmental effects on N_2 fixation rate will operate indirectly through the plant. For example, CO_2 enrichment will increase plant growth and nitrogen demand and this will lead to an increase in N_2 fixation activity (eg. Sousanna and Hartwig, 1996). However, other stress conditions such as low soil temperature and drought may directly affect the nodules more than the host plant (Kuzma and Layzell, 1994; Diaz del Castillo et al., 1994). Fixation will also be reduced if the plant nitrogen status is increased by nitrate feeding (e.g. Arrese-Igor et al., 1997). Indeed, given that nitrate feeding is the only specific stress for nodules (i.e. it affects the nodules much more than the host plant) this may be the key to understanding plant control of nodule activity.

It has long been hypothesised that nitrate has a direct effect on nodule activity through the production of nitrite (eg. Streeter, 1982). However, reports of high levels of nitrite within legume nodules appears to be the result of inappropriate extraction procedures and it seems unlikely that it is involved in the initial stages of the nitrate - induced decline in N_2 fixation (Arrese-Igor et al., 1998). An alternative hypothesis for a direct effect of nitrate involves an impairment of dicarboxylic transport across the peribacteroid membrane as a consequence of membrane potential dissipation (Udvardi and Day, 1989; Vassileva and Ignatov, 1996). Nevertheless, most recent studies suggest the involvement of a direct or indirect effect on either O_2 supply to the bacteroids or carbohydrate supply/metabolism (e.g. Vessey and Waterer, 1992). An interesting addition to this story is the observation that nitrate is one of a number of stress factors which reduce sucrose synthase activity and gene transcription in legume nodules (Gordon et al., 1997). Time-course studies of nitrate effects on soybean nodules show nitrogenase activity (H_2 production) decreasing within 18 hours and sucrose synthase mRNA levels virtually disappearing within 24 hours, however, sucrose synthase activity does not start to decrease until 3 days (Gordon, Skøt and Minchin, unpublished data).

It would, therefore, appear that nitrate feeding produces a host plant-to-nodule signal which affects both the O_2 diffusion barrier and the expression of the sucrose synthase gene. What could this signal be and how does it operate? The work of Neo and Layzell (1997) would suggest glutamine and/or asparagine as the signal (see above) but suggested mechanisms of signal operation are, as yet, purely speculative. Nevertheless, the involvement of ammonia is an attractive idea as it is apparently associated with the operation of the O_2 diffusion barrier, as evidenced by the acetylene-induced and argon-induced declines in nitrogenase activity (Minchin et al., 1983) and is also believed to affect gene expression (eg. Vance et al., 1995; Temple et al., 1996).

Some possible features of a shoot nitrate-induced signal

One possible feature of a nitrate-induced signal coming from the shoot is that its strength may depend on nitrate levels within the shoot. In time-course experiments involving nitrate feeding to split root systems (Minchin and Gordon, unpublished data) it was found that feeding 10 mM nitrate to both root systems decreased

nitrogenase activity within 20 hours whilst feeding to one root system only delayed the onset of the decrease to 46 hours. It was hypothesised that this reflected the dilution of nitrate within the shoot by N-free nutrients being fed to the other root system, and when the nitrate concentration given to the fed root system was increased to 20 mM this returned the time to the onset of the nitrogenase activity decrease to 20 hours.

Another likely feature of a shoot nitrate signal is that it would depend on the rates of nitrate uptake or utilisation by the plant. This is supported by data of Serraj et al (1992) which showed that cultivars of soybean which have higher rates of nitrate reductase activity also have greater nitrate-induced decreases in nitrogenase activity. It is also supported by the work of Walsh and Carroll (1992) on a low nitrate reductase mutant of pea. They found that this mutant only showed a 20% reduction in nitrogenase activity after 2 days of nitrate feeding, compared to a 60% reduction in the wild-type parent cultivar. More recently, an inbred clover line has been produced which shows a 50% reduction in nitrate uptake when fed 20 μ M nitrate in a flowing-nutrient system (Minchin et al., 1998). This low nitrate uptake line showed a 24% reduction in nitrogenase activity over a 21 day period, compared to a 75% reduction with the normal line.

The third possible feature of a nitrate-induced shoot signal is that it would be able to provide the ultimate control over N_2 fixation activity by inducing nodules senescence. Such nitrate-induced nodule senescence has been reported for several legume species (Becana and Sprent, 1987), although it may not occur in soybean (Arrese-Igor et al., 1997) and it only occurs in white clover if nitrate feeding is accompanied by a second stress such as drought or defoliation (Minchin and Mytton, unpublished data). Recent studies with pea suggest that nitrate-induced nodule senescence involves the production of activated oxygen species (Escuredo et al., 1996), including \cdot OH radicals produced by the Fenton reaction between catalytic Fe and H_2O_2 .

This latter observation raises further questions about the apparent symbiotic nature of the plant-rhizobia association. If nodule senescence involves large-scale production of activated oxygen species within the infected region what are the survival prospects for bacteroids or vegetative rhizobia? Or to put the question in a more anthropocentric manner; is this any way to treat a friend? Another aspect is that the main source of catalytic Fe is likely to be the breakdown of leghaemoglobin. This reinforces the question posed by Sprent et al. (1993) as to whether it is an advantage or a disadvantage for rhizobia to form ineffective nodules. Given the potential danger of the senescence process in normal, leghaemoglobin-containing nodules it would appear to be an advantage for rhizobia to form ineffective nodules, and part of the complex signalling between plants and rhizobia during the nodulation process may be designed to minimise this. Indeed, ineffective nodules could be regarded as an expression of rhizobial parasitism in advanced legume species.

Consequences for the host plant

The hypothesis that I have developed so far is that overall nodule activity is regulated by the plant, through a control process which is determined by the level of

soluble nitrogen within the plant and operated by a signal sent to the nodules via the phloem. This signal affects both the O₂ diffusion barrier and gene expression within the nodule, although it is not yet known if this is limited to the expression of the sucrose synthase gene. Alterations in the O₂ diffusion barrier can also lead to nodule senescence via the production of activated oxygen species.

If correct, these ideas will also have important consequences for the nitrogen balance of the host plant. Given that regulation of N₂ fixation activity through shoot nitrogen levels can also lead to nodule senescence it would be a prudent activity on the part of the plant to minimise soluble nitrogen levels through sequestration into proteins. This could explain why nitrogen fixing legumes are normally high nitrogen plants. It then follows that, under conditions where the potential for nitrogen acquisition is more limited than the potential for growth, the nodulated legume would not remobilise protein nitrogen to "top-up" the reduced rates of nitrogen coming from fixation. Unless the protein mobilisation was very closely matched to growth requirements, the soluble nitrogen released into the shoot could be translocated to the nodules, leading to a further reduction in N₂ fixation, and possible nodule senescence.

Such a block on protein mobilisation is probably of little importance for annual grain legumes which are programmed to release nitrogen from leaf proteins for seed production during monocarpic senescence (e.g. Warembourg and Fernandez, 1985). However, it could have detrimental consequences for perennial pasture legumes growing in mixed swards with grasses. For example, white clover under pasture conditions will invariably have shoot nitrogen levels of 3 to 4.5% regardless of plant growth rate and can be observed to cease growth under conditions of limited nitrogen acquisition (L.R. Mytton, pers. comm.). In contrast, the companion grass will have nitrogen levels ranging from 1 to 4% and will readily mobilise protein nitrogen to maintain growth under nitrogen limiting conditions. This can contribute towards out-competition of clover by the grass.

Comparisons of growth and nitrogen level responses of nodulated white clover with non-nodulated or ineffectively nodulated plants show that the restricted %N range is only shown by effectively nodulated plants (Minchin and Mytton, unpublished data). Non-nodulated plants, or those with ineffective nodules, have nitrogen levels from 1 to 4%, with optimal growth occurring at levels of 2 to 2.5%. This suggests that the development of pasture legumes with lower nitrogen levels may be advantageous for overall dry matter production. It could also be useful for obtaining better nitrogen use efficiency within the rumen of grazing animals. However, such a development may well require a greater understanding of nodule activity regulation by the host plant.

Consequences for future research priorities

As I have argued elsewhere (Minchin, 1998) the overall objective of N₂ fixation research should be to obtain greater control over nodule activity. This will require a better understanding of both the nodule system and its integration into the whole plant control processes. A greater understanding of nodule functioning will also be a necessary prerequisite to obtaining any significant improvements in N₂ fixation

performance. However, as I have previously suggested (Minchin, 1998) the prospects for the production of such an improvement may not be very good. At the same time, the amount of research effort being devoted to understanding plant regulation of nodule activity is very small, especially as this may be the key to improving the usefulness of legume N₂ fixation within agricultural systems.

Of course, the strong focus of research at the nodule level could be justified by arguing that the level of integration within legumes is such that any substantial improvement in control at the nodule level would automatically induce an improvement in plant control and this alleviates the need to consider the whole plant. This may be true for legumes, but it will not help in the future development of novel N₂ fixing systems. As argued by Sprent et al. (1993) the exploitation of such novel systems may require a full understanding, identification and transfer of the legume "control" genome. Without such control any future symbiotic association could revert to parasitism by the microsymbiont whilst any system involving direct expression of nitrogenase genes within plants could prove lethal as the unregulated nitrogenase activity either uses up all the carbon reserves or fills the plant with toxic levels of ammonia.

References

- Arrese-Igor C, Minchin FR, Gordon AJ, Nath AK. 1997. Possible causes of the physiological decline in soybean nitrogen fixation in the presence of nitrate. *Journal of Experimental Botany* 48, 905-13.
- Arrese-Igor C, Gordon AJ, Minchin FR, Denison RF. 1998. Nitrate entry and nitrite formation in the infected region of soybean nodules. *Journal of Experimental Botany* 49, 41-48.
- Baron C, Zambryski PC. 1995. The plant response in pathogenesis, symbiosis and wounding: variations on a common theme? *Annual Review of Genetics* 29, 107-29.
- Becana M, Sprent JI. 1987. Nitrogen fixation and nitrate reduction in the root nodules of legumes. *Physiologia Plantarum* 70, 757-65.
- Brewin NJ, Rae AL, Perotto S, Knox JP, Roberts K, LeGal MF, Sindhu SS, Wood EA, Kannenberg EL. 1990. Immunological dissection of the plant-microbe interface in pea nodules. In: Gresshoff PM, Roth LE, Stacey G, Newton WE, eds. *Nitrogen fixation: achievements and objectives*. New York: Chapman and Hall, 227-34.
- Brown SM, Oparka KJ, Sprent JI, Walsh KB. 1995. Symplastic transport in soybean root nodules. *Soil Biology and Biochemistry* 27, 387-99.
- Diaz del Castillo L, Hunt S, Layzell DB. 1994. The role of oxygen in the regulation of nitrogenase activity in drought-stressed soybean nodules. *Plant Physiology* 106, 949-55.
- Djordjevic MA, Gabriel DW, Rolfe BG. 1987. *Rhizobium* - the refined parasite of legumes. *Annual Review of Phytopathology* 25, 145-68.
- Escuredo PR, Minchin FR, Gogorcena Y, Iturbe-Ormaetxe I, Klucas RV, Becana M. 1996. Involvement of activated oxygen in nitrate-induced senescence of pea root nodules. *Plant Physiology* 110, 1187-95.
- Gordon AJ, Minchin FR, Skøt L, James CL. 1997. Stress-induced declines in soybean N₂ fixation are related to nodule sucrose synthase activity. *Plant Physiology* 114, 937-46.

- Hartwig UA, Heim I, Luscher A, Nosberger J. 1994. The nitrogen-sink is involved in the regulation of nitrogenase activity in white clover after defoliation. *Physiologia Plantarum* 92, 375-82.
- Hartwig UA, Nosberger J. 1994. What triggers the regulation of nitrogenase activity in forage legume nodules after defoliation? *Plant and Soil* 161, 109-14.
- Heim I, Hartwig UA, Nosberger J. 1993. Current nitrogen fixation is involved in the regulation of nitrogenase activity in white clover (*Trifolium repens* L.). *Plant Physiology* 103, 1009-14.
- Johnson NC, Graham JH, Smith FA. 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist* 135, 575-85.
- Kuzma MM, Layzell DB. 1994. Acclimation of soybean nodules to changes in temperature. *Plant Physiology* 106, 263-70.
- Lucas WJ. 1997. Application of microinjection techniques to plant nutrition. *Plant and Soil* 196, 175-89.
- Lugtenberg BJ, Bloemberg GV, Van Brussel AAN, Kijne JW, Thomas-Oates JE, Spaank HP. 1995. Signals involved in nodulation and nitrogen fixation. In: Tikhonovich IA, Provorov NA, Romanov VI, Newton WE, eds. *Nitrogen fixation: fundamentals and applications*. Dordrecht: Kluwer Academic, 37-48.
- Minchin FR. 1997. Regulation of oxygen diffusion in legume nodules. *Soil Biology and Biochemistry* 29, 881-88.
- Minchin FR. 1998. Factors controlling nitrogen fixation in legume nodules: time for a rethink? In: Elmerich C, Kondorosi A, Newton WE, eds. *Biological nitrogen fixation for the 21st century*. Dordrecht: Kluwer Academic, 427-28.
- Minchin FR, Gordon AJ, Witty JF. 1996. The physiology and biochemistry of nodule functioning. In: Younie D, ed. *Legumes in sustainable farming systems*. Reading: Rexam Digital Imaging, 16-25.
- Minchin FR, Macduff JH, Michealson-Yeates TPT, Abberton MT. 1998. Reduced nitrate sensitivity in white clover. In: Elmerich C, Kondorosi A, Newton WE, eds. *Biological nitrogen fixation for the 21st century*. Dordrecht: Kluwer Academic, 649.
- Minchin FR, Witty JF, Sheehy JE, Muller M. 1983. A major error in the acetylene reduction assay: decreases in nodular nitrogenase activity under assay conditions. *Journal of Experimental Botany* 34, 641-49.
- Neo HH, Layzell DB. 1997. Phloem glutamine and the regulation of O₂ diffusion in legume nodules. *Plant Physiology* 113, 259-67.
- Oti-Boateng C, Silsby JH. 1993. The effects of exogenous amino acid on acetylene reduction activity of *Vicia faba* L. cv. Fiord. *Annals of Botany* 71, 71-74.
- Oti-Boateng C, Wallace W, Silsby JH. 1994. The effect of the accumulation of carbohydrate and organic nitrogen on nitrogen fixation (acetylene reduction) of faba bean cv. Fiord. *Annals of Botany* 73, 143-49.
- Parsons R, Stanforth A, Raven JA, Sprent JI. 1993. Nodule growth and activity may be regulated by a feedback mechanism involving phloem nitrogen. *Plant, Cell and Environment* 16, 125-36.
- Pawlowski GC, Bisseling T. 1995. Nodulation in legumes and actinorhizal plants In: Tikhonovich IA, Provorov NA, Romanov VI, Newton WE, eds. *Nitrogen fixation: fundamentals and applications*. Dordrecht: Kluwer Academic, 49-59.
- Serraj R, Drevon JJ, Obaton M, Vidal A. 1992. Variation in nitrate tolerance of nitrogen fixation in soybean (*Glycine max*) - *Bradyrhizobium* symbiosis. *Journal of Plant Physiology* 140, 366-71.

- Sprent JI, Minchin FR, Parsons R. 1993. Evolution since Knoxville: were nitrogen-fixing organisms wise to inhabit land plants? In: Palacios R, Mora J, Newton WE, eds. New horizons in nitrogen fixation. Dordrecht: Kluwer Academic, 65-76.
- Sousanna JF, Hartwig UA. 1996. The effects of elevated CO₂ on symbiotic N₂ fixation: a link between the carbon and nitrogen cycles in grassland ecosystems. *Plant and Soil* 187, 321-32.
- Streeter JG. 1982. Synthesis and accumulation of nitrite in soybean nodules supplied with nitrate. *Plant Physiology* 69, 1429-34.
- Temple SJ, Kunjibettu S, Roche D, Senguptagopalan C. 1996. Total glutamine-synthetase activity during soybean nodule development is controlled at the level of transcription and holoprotein turnover. *Plant Physiology* 112, 1723-33.
- Udvardi MK, Day DA. 1989. Electrogenic ATPase activity on the peribacteroid membrane of soybean (*Glycine max* L.) root nodules. *Plant Physiology* 90, 982-87.
- Udvardi MK, Day DA. 1997. Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology* 48, 493-523.
- Vassileva V, Ignatov G. 1996. Effect of high nitrate concentrations on dicarboxylate transport across the peribacteroid membrane of soybean root nodules. *Journal of Plant Physiology* 149, 222-24.
- Vessey JK, Waterer J. 1992. In search of the mechanism of nitrate inhibition of nitrogenase activity in legume nodules: recent developments. *Physiologia Plantarum* 84, 171-76.
- Vance CP, Miller SS, Gregerson RG, Samac DA, Robinson DL, Gantt JS. 1995. Alfalfa NADH-dependent glutamate synthetase - structure of the gene and importance in symbiotic N₂ fixation. *The Plant Journal* 8, 345-58.
- Walsh KB, Carroll BJ. 1992. A reappraisal of nitrate inhibition of nitrogenase in A317, a nitrate reductase-deficient mutant of pea (*Pisum sativum*). *Physiologia Plantarum* 84, 283-91.
- Warembourg FR, Fernandez MP. 1985. Distribution and remobilization of symbiotically fixed nitrogen in soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum* 65, 281-86.

AGRONOMY AND ECOLOGY OF NITROGEN FIXATION

Vance Carroll P.

United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Plant Science Research Unit, Department of Agronomy and Plant Genetics, University of Minnesota, St. Paul, MN, 55108, USA. E-mail: vance004@maroon.tc.umn.edu

1. Importance of Legume Symbiotic N₂ Fixation

The Earth's population, increasing exponentially, is expected to reach 10 billion, nearly double its present status, by 2035 (2). Of this projected population, 90% is expected to reside in tropical and subtropical regions of the developing countries in Asia, Africa, and Latin America (43). Plant sources currently provide 80% of the caloric and dietary protein needs for tropical countries, and this is not expected to change in the near future. In 1910 human beings used about 10% of the total carbon fixed through photosynthesis (12). Currently humans use 40% of that carbon, and it is estimated that by 2030 humans will require 80%. Individual protein and caloric consumption of the Earth's current 5.7 million people averages 70 g_{protein_d⁻¹} and 2,400 calories_{d⁻¹}, respectively (43). The range of protein consumption varies from 38 to 125 g_{protein_d⁻¹}, while the range of caloric intake varies from 1,800 to 3,500_{d⁻¹}, with the low range values associated with developing countries (4). The anticipated doubling of Earth's population will exacerbate the current inequalities in nutritional intake. Clearly, to maintain the current level of protein and caloric intake over the next 40 years will necessitate unprecedented increases in crop production. This enhanced production will need to be achieved despite a significant deterioration of much prime agricultural land and will require the utilization of large areas now considered marginal.

Nitrogen is the major limiting nutrient for most crop species. Acquisition and assimilation of N is second in importance only to photosynthesis for plant growth and development (27). Production of high-quality, protein-rich food is extremely dependent upon the availability of necessary N. The striking rise in cereal grain yields in developed countries between 1950 and 1990 is directly attributable to a 10-fold increase in N fertilizer use. The "Green Revolution" has been spurred by the development of cereal crops that respond favorably to high N fertilization rates. A typical cereal yield of 7T_{ha⁻¹} requires the uptake of 200 to 300 kg N_{ha⁻¹} (2, 43). Concomitant with high application of N fertilizer in developed countries are volatilization of N oxides (greenhouse gases) into the atmosphere, depletion of nonrenewable resources, an imbalance in the global N cycle, and leaching of NO₃⁻ into groundwater (21). By contrast, in developing countries the high cost of N fertilizer, the energy requirements for production, and the suboptimal transportation capabilities limit its use, especially for small farms.

Sustainable agriculture is broadly defined as agriculture that is managed toward greater resource efficiency and conservation while maintaining an environment favorable for evolution of all species (3, 12). More simply, it is meeting the needs of the present without compromising the needs of the future. One of the driving forces behind agricultural sustainability is effective management of N in the environment. Moreover, judicious management of N inputs into cropping systems is a prerequisite for land stewardship. Successful manipulation of N inputs through the use of biologically fixed N results in farming practices that are economically viable and

environmentally prudent (3, 40). For example, use of N_2 -fixing species in cropping systems reduces the need for N fertilizers and increases soil tilth. Additionally, biologically fixed N is bound in soil organic matter and thus is much less susceptible to soil chemical transformations and physical factors that lead to volatilization and leaching. Although many diverse associations contribute to biological N_2 fixation (BNF) (36), in most agricultural settings the primary source (80%) of biologically fixed N is through the soil bacteria *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, and *Azorhizobium*-legume symbiosis (39). Legumes provide 25-35% of the worldwide protein intake. Approximately 250 million hectares of legumes are grown world wide and they fix about 90 Tg N_{yr}^{-1} (21). The amount of N fixed by legumes is quite amazing since the total amount of nitrogenase in the world amounts to only a few kilograms (7). To replace the N_2 fixed by legumes with anhydrous ammonia produced by the Haber-Bosch process would require 288 Tg of fuel and cost approximately \$30 billion annually. Obviously, important goals for agriculture are enhancing the use of and improving the management of legume biologically fixed N_2 for both humanitarian and economic reasons.

2. Methods for Measuring of N_2 Fixation

Field grown legumes obtain variable amounts of N from both the soil solution as NO_3^- or NH_4^+ and the soil as N_2 . The N derived from any of these sources is a function of soil inorganic N availability, efficiency of symbiosis, environmental constraints, and genetic variability (14). Thus, when simple Kjeldahl N is measured, the proportion of plant total N derived from symbiosis versus that derived from inorganic soil N is unknown. Three methods: (i) acetylene reduction; (ii) N-difference; (iii) ^{15}N isotope dilution and natural abundance, have been developed to measure/estimate the quantity of N derived from symbiotic N_2 fixation (14, 17, 18, 28). Compositional analysis of xylem sap N content has also been advocated as a method for assessing N_2 fixation in beans (18).

The acetylene reduction assay (ARA) is based on the principle that N_2 fixing enzyme nitrogenase not only reduces N_2 to NH_3 , but also reduces acetylene (C_2H_2) to ethylene (C_2H_4) (15). Thus, nodulated roots can be incubated in C_2H_2 and the C_2H_4 quantitated by gas chromatography. The technique is extremely sensitive, rapid, simple, and relatively inexpensive to perform.

The C_2H_2 reduction assay, however, has numerous shortcomings (20, 35). It is so highly variable that significant differences between treatments are very difficult to detect unless they are quite large. The theoretical stoichiometry of the reaction 3 moles of C_2H_2 to one mole N_2 reduced is far from accurate in biological systems and varies with rhizobial strain, plant genotype, and plant development (42). Acetylene reduction is a stopped time assay and is generally made once or twice a week over the growing season. Therefore, integration of seasonal N_2 fixation values with plant performance is frequently inaccurate. Lastly, exposure of nodules to C_2H_2 has detrimental effects on nodule physiology, particularly O_2 diffusion (20, 26, 35). However, if one is cautious, useful data may still be obtained with this assay. Evaluation of intact plants with an open flow-through system for short periods (5-10 min) allows C_2H_4 analysis without inhibition of the nitrogenase enzyme (26, 42). The C_2H_2 reduction assay is also quite useful for simply measuring for the presence of nitrogenase activity.

The N-difference method is based on determining the difference in the amount of reduced N between a N_2 fixing crop and an appropriate non- N_2 fixing crop (14, 17, 18). The only parameters that need to be measured are plant N by Kjeldahl analysis and total plant dry matter. The method is accurate, simple, and requires no expensive equipment. It integrates N_2 fixation and plant growth over the season.

Difficulties with the N-difference method primarily involve obtaining an appropriate control. Non- N_2 -fixing genotypes are available for *Medicago*, *Glycine*, *Cicer*, *Trifolium*, *Pisum*, and *Vicia* (39). For the numerous other species of legumes, either uninoculated controls or controls inoculated with ineffective rhizobia must be

maintained contamination free. Contamination free plants are difficult to achieve since most soils are readily infested with both effective and ineffective rhizobia. An alternative control may be an annual or perennial grass with a growth habit similar to the legume. However, differences in N uptake and other physiological parameters between the legume and grass open this choice of control to considerable criticism.

The ^{15}N isotope dilution methods involves labeling the soil N pool with the stable isotope $^{15}\text{NO}_3^-$ and/or $^{15}\text{NH}_4^+$ and determine the ratio of plant N occurring as ^{15}N versus that occurring as ^{14}N (the form most predominant in nature 99.65%) (14, 17, 18). A legume fixing N_2 will accumulate most of its N as ^{14}N from the atmosphere, thus diluting the ^{15}N that may come from the soil. The greater the fixation, the more the dilution. Conversely, in plants deriving more N from soil the ^{15}N pool will be less diluted. This method is accurate and integrates N_2 fixation and plant growth over the season. The isotope dilution method is effective for determining partitioning patterns. It can also be used to measure the contribution of legumes to the N budget of a companion crop and/or a subsequent crop grown in rotation (18, 29).

The primary criticisms of the isotope dilution techniques are the high cost of the stable isotopes and the expensive instrumentation required to measure ^{15}N . This procedure also requires a non- N_2 -fixing control and thus encounters problems similar to those described for the N-difference method.

3. Quantities of N_2 Fixed

The amount of N fixed symbiotically and the % N derived from symbiosis is a function of numerous genetic and environmental effectors and thus, can vary substantially within and across species. An exhaustive listing of quantities of N_2 fixed and % N derived from symbiosis can be found in Ladha and Peoples (22). Median values of N fixed per season and % N derived from symbiosis calculated from several sources are given in Tables 1 and 2. A noticeable feature of these tables is that irrespective of the method of assessment perennial forage legumes tend to fix more N symbiotically than do annual pulse legumes. The limited data available for N_2 fixing trees suggest that they also fix substantially more N than pulse legumes. The fact that several harvests of forage legume herbage are taken in a single season and that trees have substantially more biomass than annual legumes contribute to these differences in N_2 fixation. Another feature that may also contribute to increased fixation by forage and tree legumes is that these species have indeterminate nodules that can function for long periods (39).

The typical pattern for N_2 fixation and shoot regrowth after herbage harvests in the perennial forage legume alfalfa shows that N_2 fixation declines immediately after herbage harvest, remains low for 10 to 14 days, and then recovers rapidly. Studies with *Lotus* and *Trifolium* show similar patterns (8, 16). Depending upon the species and location this pattern repeats from two to eight times a year for as long as the crop remains in the field, resulting in large quantities of N_2 being fixed. Indeterminate nodules formed in one herbage regrowth cycle may function through several subsequent cycles (41).

By comparison, the dry matter accumulation and N_2 fixation data for soybean and adzuki bean (*Vigna angularis* L.) typifies the seasonal profile for pulse legumes. For most pulses the majority of N_2 fixation occurs after flowering during pod development (13). In soybean, which has determinate nodules, crown nodules formed during early growth account for 100% of the N_2 fixed at 20 d after planting but less than 20% at 76 d after planting (25). Later nodules formed on lateral roots account for most of N_2 fixed in soybean and lupin. Thus, the amount of N_2 fixed shifts according to the nodule population throughout the season.

Since N_2 fixed by legumes is in essence a gain in reduced N without the high cost associated with fertilizer N, it is worthwhile to calculate how much energy would be required for production of an equivalent amount of fertilizer N as that produced through fixation (Tables 1 and 2). Depending upon the species, the amount of N gained as potential fertilizer would be equivalent to a savings of 45 to 210 dollars per

ha. Currently 32 million ha of maize are grown in the U.S. A modest replacement of 25 kg of fertilizer N with that derived from legume symbiotic N₂ fixation would result in a yearly savings of \$560 million (32). This savings would equate to about \$2,600/year for a typical 150 ha farm. These values reflect an almost doubling of the cost of N fertilizer in the last ten years.

Table 1. Nitrogen-fixation characteristics of selected legumes and the cost of an equivalent of N fertilizer

Species	N ₂ fixed ha ⁻¹ per season ^a median value (kg)	Plant N from atmosphere median value (%)	Equivalent cost of fertilizer N production ^b (U.S. dollars/ha)
Forage Legumes			
<i>Trifolium pratense</i>	170	59	119.00
<i>Lotus corniculatus</i>	92	55	64.40
<i>Medicago sativa</i>	180	70	126.00
<i>Vicia sativa</i>	130	70	91.00
<i>Trifolium repens</i>	172	75	120.40
<i>Desmodium</i> sp	200	85	140.00
Pulse Legumes			
<i>Pisum sativum</i>	72	35	50.40
<i>Glycine max</i>	120	53	84.00
<i>Arachis hypogaea</i>	114	57	79.80
<i>Phaseolus vulgaris</i>	65	40	45.50
<i>Vigna angularis</i>	80	70	56.00
<i>Vicia faba</i>	151	80	105.70
<i>Lupinus angustifolius</i>	170	65	119.00
<i>Lens culinaris</i>	100	63	70.00

^aCalculated or adapted from Heichel (17), Nutman (28), Peoples and Craswell (29), and Peoples et al. (30, 31). ^bCost for fertilizer N, 0.70 dollar kg⁻¹.

Table 2. Nitrogen fixation characteristics of selected trees and cost of an equivalent of N fertilizer

Species	N ₂ fixed ha ⁻¹ per season ^a median value (kg)	Plant N from atmosphere ^a median value (%)	Equivalent cost of fertilizer N production ^b (U.S. dollars/ha)
<i>Casurina</i>	180	47	126.00
<i>Alnus</i>	188	55	131.60
<i>Gliricidia</i>	170	53	119.00
<i>Acacia</i>	30	25	21.00
<i>Leucaena</i>	300	60	210.00
<i>Sesbania</i>	160	63	112.00

^aCalculated or adapted from Danso et al. (6); Peoples and Craswell (29); Peoples et al. (30), and Sanginga et al. (34). ^bCost for fertilizer N, 0.70 dollar kg⁻¹.

4. Legume Fixed N₂: Benefits to Cropping Systems

Nitrogen fixing species have played an integral role in cropping systems since the domestication of plants and have been prominently featured in rotations and intercropping, as alley crops, in pasture systems, as green manures, in agroforestry, and cover crops (17, 29, 45). Mixed cropping with N₂ fixing species as a major component was the accepted norm prior to the development of the Haber Bosch process (10). In the U.S. and Europe the use of legumes to provide N for subsequent

crops reached a maximum in the 1940s (17). Since then implementation of legumes into cropping systems has declined due to the low cost of N fertilizer, high yielding cereal crops, and other economic and political forces (3, 17). A return to the widespread use of N₂ fixing plants in cropping systems of developed countries will require convincing evidence of the economic and environmental advantages accrued due to their use. Alternatively, social and/or political pressures may force changes favorable for the enhanced use of N₂ fixing species in management schemes. By contrast, more than 50% of the crops grown in Africa, India, and Latin America are either intercropped or rotated with N₂ fixing species (10). However, new and improved strategies need to be developed and transmitted to farmers to more effectively use biological N₂ fixation in developing countries.

Symbiotically fixed N may become available to an intercrop or subsequent crop through several avenues including: (i) release from root exudates; (ii) vesicular arbuscule mycorrhizal (VAM) mediated transfer between species; (iii) N leaching from leaves and leaf litter decomposition; (iv) plow down of green manures; (v) decomposition of roots and nodules, and (vi) release of animal waste (30). The quantity and availability of symbiotically fixed N available to a companion or subsequent crop are governed by genotypic, environmental, and management factors. Accurate assessment of the legume contribution almost invariably requires the ¹⁵N methodologies (17). However, with the use of new non-N₂ fixing genotypes representative estimates of symbiotically fixed N available for other species can be obtained.

The long-held assumption is that planting legumes with companion crops, either interspersed or between rows, provides additional N to and improves the performance of the non-N₂ fixing species. However, most evidence supporting N transfer to a companion crop is indirect (17, 33, 45). In more exact studies where ¹⁵N has been used, the amount of N in the companion crop that is derived from the N₂-fixing legumes varies from 0 to 70% (17, 23, 45). Although there is a wide range in the amount of N transferred and the % of companion crop N that is derived from the legume (Table 3), these figures are generally less than 40 kg N_{ha}⁻¹ and 30%, respectively (23, 31, 45). Because N transfer is a function of plant growth and development, soil N content, and plant proximity, the most reliable data and maximum amounts of N transfer are obtained when the growth habit of the legume and companion species is similar, the experiment is conducted in low soil N, and plant spacing is optimal (5, 23, 33, 38). Studies conducted in the presence of high soil N frequently fail to show transfer of fixed N due to the inhibitory effect of soil N on N₂ fixation and the greater competitiveness of the non-legume species (10, 17, 45). Brophy et al. (5) elegant study with alfalfa and trefoil clearly demonstrated that at suboptimal densities and populations N transfer was hard to detect, while at optimal populations and spacing striking amounts of N transfer could occur.

Although most studies of N transfer do not differentiate what proportion of above and below ground components contribute to transfer, experiments with alfalfa and trefoil provide insight into this question (9, 24, 37). The quantity of symbiotically fixed N deposited in the rhizosphere of alfalfa was less than 3 kg_{ha}⁻¹. Additionally, the amount of N potentially available for a companion crop from the turnover of roots and nodules was approximately 13 kg N_{ha}⁻¹ and 2 kg N_{ha}⁻¹, respectively. Heichel (17) estimated that nodule turnover would contribute less than 6 kg N_{ha}⁻¹. These data indicate that above ground N contributions are of similar if not greater importance than below ground parts toward N transfer because total N transfer is usually around 30 to 40 kg N_{ha}.

Legume N as a replacement for fertilizer N derives from the practice of comparing the yield of a non-legume grown after a legume to that of a non-legume grown with fertilizer. This assessment provides an estimate of the amount of N in the non-legume that is derived from the legume. Replacement N is usually thought of in terms of rotational systems in which either the legume leaf debris and roots or the

entire plant is returned to the soil for the subsequent crop. In most instances the replacement N value represents the response of the non-legume to the total available soil N and does not distinguish between symbiotically fixed N and N from other sources (17, 30, 44). Because only the amount the N derived from fixation and acquired by the subsequent crop is gain of N to be credited against fertilizer use, the fertilizer N replacement value frequently is an overestimate of that contributed by fixation.

The fertilizer replacement value for legumes when grown preceding a grain crop varies from 0 to 110 kg N_{ha}⁻¹ (Table 4). This range represents composite data taken from several sources.

Table 3. Transfer of fixed N from forage legume to accompanying grass.

Legume-grass mixture	N transferred amount (kg _{ha} ⁻¹)	% of legume N ₂ fixation (%)	Grass N derived from legume (%)
Alfalfa-reed canarygrass	9	13	68
Alfalfa-orchardgrass	13	7	22
Alfalfa-timothy	10	5	24
White clover-ryegrass	78	26	27
White clover-tall fescue	30	21	37
Birdsfoot trefoil-reed canarygrass	14	10	28
Red clover-Italian ryegrass	30	23	39
Red clover-orchardgrass	38	19	58

Data adapted from Ledgard and Steele (23); Peoples et al. (30); and West and Mallarino (45).

Table 4. Fertilizer N replacement value of preceding legume for subsequent year grain yield of non-N₂ fixing species.

Preceding legume	Fertilizer N replacement value (kg N _{ha} ⁻¹)
Forage legumes	
Alfalfa	110
Sweet Clover	115
Red Clover	88
<u>Birdsfoot Trefoil</u>	94
Pulse Legumes	
Chickpea	70
Cowpea	50
Pigeonpea	44
Winged Bean	70
Pea	26

Data adapted from Heichel (17); Wani et al. (44); Giller and Cadisch (11).

As expected, there is substantial variation between species for N replacement values. Such variation reflects the impact of: (i) environment; (ii) moisture; (iii) plant composition, particularly C:N and phenolic content; (iv) soil texture and organic content; and (v) amount of legume incorporated into soil. Heichel (17) and Hesterman et al. (19) have suggested that about 40 to 70% of the fertilizer N replacement value of legumes is due to legume N. The remainder of the beneficial effect of legumes is due to increased soil health, improved disease and pest control, reduced allelopathic compounds, and enhanced water retention (29).

With the advent of increased population pressures, farming of marginal land, and degradation of the environment, research on N₂ fixation must include renewed efforts to deliver biologically fixed N to cropping systems (1). Research must identify the best species to incorporate into cropping systems, show the amount of N fixed by these species, and accurately predict the availability of fixed N as replacement for fertilizer N within intercrops and in rotations. Extension must be able to show on-farm success with enhanced use of biologically fixed N in practical management schemes. Lastly, we must develop new and/or value-added uses for N₂ fixing crops that make them attractive for production agriculture in developed countries.

5. Acknowledgment. This article is a joint contribution of the Plant Science Research Unit, U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, and the Minnesota Agricultural Experiment Station, Paper No. 981130066, Scientific Journal Series.

6. References

1. Becker, M., Ladha, J.K., and Ali, M. (1995) Green manure technology: potential, usage, and limitations. A case study for lowland rice, *Plant Soil* **174**, 181-194.
2. Bockman, O.-C., Kaarstad, O., Lie, O.H., and Richards, I. (1990) *Agriculture and Fertilizers: Fertilizers in Perspective*, Norsk Hydro, Drammen, Norway.
3. Bohlool, B.B., Ladha, J.K., Garrity, D.P., and George, T. (1992) Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture: a perspective, *Plant Soil* **141**, 1-11.
4. Bongaarts, J. (1994) Can the growing human population feed itself, *Sci. Amer.* **237**, 36-42.
5. Brophy, L.S., Heichel, G.H., and Russelle, M.P. (1987) Nitrogen transfer from forage legumes to grass in a systematic planting design, *Crop Sci.* **27**, 753-758.
6. Danso, S.K.A., Bowen, G.D., and Sanginga, N. (1992) Biological nitrogen fixation in trees in agro-ecosystems, *Plant Soil* **141**, 171-196.
7. Delwiche, C.C. (1970) The nitrogen cycle, *Sci. Amer.* **223**, 136-146.
8. Denison, R.F., Hunt, S., and Layzell, D. (1992) Nitrogenase activity, nodule respiration, and O₂ permeability following detopping of alfalfa and birdsfoot trefoil, *Plant Physiol.* **98**, 894-900.
9. Dubach, M., and Russelle, M.P. (1994) Forage legume roots and nodules and their role in nitrogen transfer, *Agron. J.* **86**, 259-266.
10. Fujiata, K., Ofosu-Budu, K.G., and Ogata, S. (1992) Biological nitrogen fixation in mixed-legume-cereal cropping systems, *Plant Soil* **141**, 155-175.
11. Giller, K.E. and Cadisch, G. (1995) Future benefits from biological nitrogen fixation: an ecological approach to agriculture, *Plant Soil* **174**, 255-277.
12. Golley, F., Baudry, J., Berry, R., Bornkamm, R., Dahlberg, K., Jansson, M., King, V., Lee, J., Lenz, R., Sharitz, R., and Svedin, U. (1992) What is the road to sustainability, *INTECOL Bull.* **20**, 15-20.
13. Hardarson, G. (1993) Methods for enhancing symbiotic nitrogen fixation, *Plant Soil* **152**, 1-17.
14. Hardarson, G., and Danso, S.K.A. (1993) Methods for measuring biological nitrogen fixation in grain legumes, *Plant Soil* **152**, 19-23.
15. Hardy, R.W.F., Holsten, R.O., Jackson, E.K., and Burns, R.C. (1968) The acetylene-ethylene assay for nitrogen fixation; laboratory and field evaluation, *Plant Physiol.* **43**, 1185-1207.
16. Hartwig, U.A., and Nosberger, J. (1994) What triggers the regulation of nitrogenase activity in white clover after defoliation, *Plant Physiol.* **161**, 109-114.
17. Heichel, G.H. (1987) Legume nitrogen: symbiotic fixation and recovery by subsequent crops, in Z.R. Hessel (ed.), *Energy in Plant Nutrition and Pest Control*, Elsevier Science, Amsterdam, pp. 63-80.
18. Herridge, D.F. and Danso, S.K.A. (1995) Enhancing crop legume nitrogen fixation through selection and breeding, *Plant Soil* **174**, 51-82.
19. Hesterman, O.B., Russelle, M.P., Sheaffer, C.C., and Heichel, G.H. (1987) Nitrogen utilization from fertilizer and legume residues in legume-corn rotations, *Agron J.* **79**, 726-731.
20. Hunt, S. and Layzell, D.B. (1993) Gas exchange of legume nodules and the regulation of nitrogenase activity, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**, 483-511.
21. Kinzig, A.P. and Socolow, R.H. (1994) Human impacts on the nitrogen cycle, *Physics Today* **47**, 24-35.

22. Ladha, J.K. and Peoples, M.B. (1995) *Management of Biological Nitrogen Fixation for the Development of More Productive and Sustainable Agricultural Systems*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
23. Ledgard, S.F. and Steele, K.W. (1992) Biological nitrogen fixation in mixed legume/grass pastures, *Plant Soil* **141**, 137-152.
24. Lory, J.A., Russelle, M.P., and Heichel, G.H. (1992) Quantification of symbiotically fixed nitrogen in soil surrounding alfalfa roots and nodules, *Agron. J.* **84**, 1023-1040.
25. McDermott, T.R. and Graham, P.H. (1989) *Bradyrhizobium japonicum* inoculant mobility, nodule occupancy, and acetylene reduction in the soybean root system, *Appl. Environ. Microbio.* **55**, 2493-2498.
26. Minchin, F.R., Witty, J.F., and Mytton, L.R. (1994) Reply to 'Measurement of nitrogenase activity in legume root nodules: in defense of the acetylene reduction assay' by J.K. Vessey, *Plant Soil* **158**, 163-167.
27. Newbould, P. (1989) The use of nitrogen fertilizer in agriculture. Where do we go practically and ecologically, *Plant Soil* **115**, 297-311.
28. Nutman, P.S. (1976) IBP field experiments on nitrogen fixation by nodulated legumes, in P.S. Nutman (ed.), *Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants*, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 211-237.
29. Peoples, M.B., and Craswell, E.T. (1992) Biological nitrogen fixation: investments, expectations and actual contributions to agriculture, *Plant Soil* **141**, 13-39.
30. Peoples, M.B., Herridge, D.F., and Ladha, J.K. (1995a) Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production, *Plant Soil* **174**, 3-28.
31. Peoples, M.B., Ladha, J.K., and Herridge, D.F. (1995b) Enhancing legume N₂ fixation through plant and soil management, *Plant Soil* **174**, 83-102.
32. Peterson, T.A. and Russelle, M.P. (1991) Alfalfa and the nitrogen cycle in the corn belt, *J. Soil Water Conserv.* **46**, 229-233.
33. Russelle, M.P. (1996) Nitrogen cycling in pasture systems, in R.E. Joost and C.A. Roberts (eds.), *Nutrient Cycling in Forage Systems*, Potash and Phosphorous Institute and Foundation for Agronomic Research, Manhattan, Kansas, pp. 125-166.
34. Sanginga, N., Vanlauwe, B., and Danso, S.K.A. (1995) Management of biological N₂ fixation in alley cropping systems: estimation and contribution to N balance, *Plant Soil* **174**, 119-141.
35. Sheehy, J.E. (1987) Photosynthesis and nitrogen fixation in legume plants, *Crit. Rev. Plant Sci.* **5**, 121-159.
36. Sprent, J.I. (1984) Nitrogen fixation, in M. B. Wilkins (ed.), *Advances in Plant Physiology*, Pitman, London, pp. 249-276.
37. Ta, T.C., and Faris, M.A. (1987) Effects of alfalfa proportions and clipping frequencies on timothy-alfalfa mixtures II. Nitrogen fixation and transfer, *Agron J.* **79**, 820-824.
38. Thomas, R.J. (1995) Role of legumes in providing N for sustainable tropical pasture systems, *Plant Soil* **174**, 103-118.
39. Vance, C.P. (1996) Root bacteria interactions: symbiotic nitrogen fixation, in Y. Waisel, A. Eschel, and U. Kafkafi (eds.), *Plant Roots: The Hidden Half*, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 723-756.
40. Vance, C.P. and Graham, P.H. (1995) Nitrogen fixation in agriculture: application and perspective, in I.A. Tikhonovich, N.A. Provorov, V.I. Romanov, and W.E. Newton (eds.), *Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 77-86.
41. Vance, C.P., Heichel, G.H., Barnes, D.K., Bryan, J.W., and Johnson, L.E. (1979) Nitrogen fixation, nodule development and vegetative regrowth of alfalfa (*Medicago sativa* L) following harvest, *Plant Physiol.* **64**, 1-8.
42. Vessey, J.K. (1994) Measurement of nitrogenase activity in legume root nodules: in defense of the acetylene reduction assay, *Plant Soil* **158**, 151-162.
43. Waggoner, P.E. (1994) *How much land can ten billion people spare for nature*, Council for Agricultural Science and Technology Task Force Report 121, Ames, Iowa.
44. Wani, S.P., Rupela, O.P., and Lee, K.K. (1995) Sustainable agriculture in the semi-arid tropics through biological nitrogen fixation in grain legumes, *Plant Soil* **174**, 29-50.

45. West, C.P. and Mallarino, A.P. (1996) Nitrogen transfer from legumes to grasses, in R.E. Joost and C.A. Roberts (eds.), *Nutrient Cycling in Forage Systems*, Potash and Phosphate Institute and Foundation for Agronomic Research, Manhattan, Kansas, pp. 167-175.

SECCION 1

FISIOLOGÍA Y BIOQUÍMICA

LA FERREDOXINA NADP⁺ REDUCTASA EN LOS HETEROCISTOS DE ANABAENA

Fillat M.F., Razquin P., Mógica P.A., Blasco L. y Peleato M.L.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza. 50009-Zaragoza. mpeleato@posta.unizar.es

La ferredoxina NADP⁺ reductasa (FNR, EC 1.18.1.2) es una flavoproteína que contiene FAD, y que cataliza la fotorreducción del NADP⁺ durante la fotosíntesis oxigénica. Esta enzima se encuentra en todas las cianobacterias y en todos los eucariotas fotosintéticos, y también ha sido descrita en diferentes tejidos no fotosintéticos de plantas superiores.

La FNR de cianobacterias, aislada de células vegetativas esta muy bien caracterizada (Sancho et al., 1987. Schluchter & Bryan, 1992. Morand et al. 1994), y su papel fisiológico consiste en catalizar la reducción del NADP⁺ utilizando dos electrones donados por sendas moléculas de ferredoxina reducida. Se ha descrito también que en las cianobacterias, la FNR puede también funcionar como una NADPH deshidrogenasa respiratoria (Schereer et al.1988).

En cianobacterias, la FNR es considerablemente más larga que la forma madura purificada a partir de eucariotas fotosintéticos (Schluchter & Bryan, 1992., Fillat et al. 1993), y además de los dos dominios similares a los de la proteína de 35 kDa purificada de plantas y algas, se encuentra una extensión de unos 120 aminoácidos en la zona amino-terminal (Schluchter & Bryan, 1992., Fillat et al. 1993). Este tercer dominio de la FNR de cianobacterias presenta alta homología con un pequeño polipéptido de unión presente en los ficobilisomas llamado CpcD, (Phycocyanin associated linker protein). Este hecho, junto con los datos previos de la presencia de la FNR en fracciones de ficobilisomas aislados, llevó a Bryan (1994) a proponer un modelo de membrana tilacoidal de cianobacterias, en que la FNR estaría unida a los ficobilisomas. Este modelo, todavía sin alternativa, presenta ciertos problemas funcionales, dada la ubicación de los ficobilisomas como antenas del fotosistema II, pero es un hecho que la FNR esta presente en los ficobilisomas y no se ha logrado encontrarla asociada con ningún otro polipéptido de la membrana tilacoidal. En el caso de *Anabaena* sp, se había observado que la FNR se co-purificaba con ficobiliproteínas, y que resultaban enormemente difíciles de eliminar de fracciones en que la FNR estaba pura de cualquier otra proteína.

En las cianobacterias filamentosas fijadoras de nitrógeno, la reducción del dinitrógeno a amoníaco sucede en una células especializadas llamadas heterocistos. Cuando un heterocisto se diferencia, ocurren una serie de cambios encaminados a adaptar el

metabolismo de la célula para llevar a cabo la fijación de nitrógeno; la diferenciación de los heterocistos implica la expresión de entre unos 600-1000 genes, que significan el 15-25% del genoma activo de la cianobacteria (Lynn et al. 1986), entre ellos los genes denominados *nif*, operones específicos de la fijación de nitrógeno. Por el contrario, otras muchas proteínas, fundamentales en el metabolismo de una célula vegetativa, no van a expresarse, y así no van a sintetizarse proteínas del fotosistema II, Rubisco, proteínas implicadas en la producción de oxígeno, etc. La diferenciación implica también la excisión de al menos 3 fragmentos de DNA en el heterocisto.

El ATP necesario para la nitrogenasa lo proporciona la fotofosforilación cíclica, con un fotosistema I activo, pero que no da lugar a fotofosforilación de NADP⁺; una pequeña parte podría ser sintetizado por fosforilación oxidativa (Bothe & Neuer, 1988). Los electrones necesarios para la reducción del dinitrógeno atmosférico proceden en último termino de una serie de compuestos carbonados sintetizados en la fotosíntesis. Una ferredoxina específica de heterocistos, cuyo gen esta situado en la misma zona del genoma que los genes *nifHDK*, es el donador último de electrones a la nitrogenasa. Esta ferredoxina es bastante diferente a la caracterizada procedente de células vegetativas, y mucho mas eficaz como donador de electrones a la nitrogenasa que ésta (Schrautemeier & Bohme 1985). Aunque tanto la ferredoxina de células vegetativas como la flavodoxina pueden actuar como donadores de electrones a la nitrogenasa, y estan presentes en los heterocistos, presumiblemente su función no es reducir a la nitrogenasa. (Razquin et al. 1995). En heterocistos se acepta que existen tres vias principales de transporte de electrones a la nitrogenasa, que confluyen en la ferredoxina de heterocistos: la vía del fotosistema I, la vía de la piruvato-ferredoxina reductasa, y la vía de la FNR, esta ultima no dependiente de la luz (Bothe & Neuer 1988). Otra posibilidad es que la FNR puede también transferir electrones, en presencia de luz, desde el NADPH generado por la ruta de las pentosas fosfato, al fotosistema I via el complejo citocromo *b₆/f*, y el fotosistema I reduciría a la ferredoxina de heterocistos, el donador a la nitrogenasa (Bohme & Schrautemeier, 1987); en este caso, el transporte directo de electrones del NADPH a la ferredoxina de heterocistos via FNR estaría inhibido por la luz (Schrautemeier et al. 1984).

La FNR es una proteína que a nuestro juicio podría jugar un papel clave en la interrelación entre respiración, fotosíntesis y fijación de nitrógeno, ya que puede ser el cruce de varias rutas implicadas en estos procesos. Conocido el precedente de la especialización molecular de las ferredoxinas para realizar funciones diferentes en los heterocistos y en las células vegetativas, nos planteamos el estudiar si la FNR expresada en células vegetativas de *Anabaena* sp era la misma especie molecular que la expresada en sus heterocistos. Tras purificar heterocistos hasta un 98% de pureza, se caracterizó la FNR obtenida de ellos, y evidencias inmunológicas, junto con todas las características físico-químicas de la molecula, y la secuencia amino-terminal, indicaron que se trataba de la misma especie molecular. El papel de la FNR fotosintética en los heterocistos, implicaría llevar a cabo una transferencia de

electrones inversa a la que tiene lugar en las células vegetativas, lo que tratándose de la misma molécula, plantea interesantes problemas de regulación de la actividad.

La especie purificada, tanto en células vegetativas como en heterocistos fue la de 36 kDa, pero el estudio de los extractos crudos en ambos tipos de células mostró que la especie presente era una forma de 49 kDa, que en cortos espacios de tiempo era degradada a la forma de 36 kDa.

Se observaron cambios fuertes en la expresión de la FNR asociados a la fijación de nitrógeno. Se cuantificó la FNR presente en células vegetativas y en heterocistos, y se midió también su actividad diaforasa; los resultados obtenidos mostraron que la cantidad total de FNR se incrementaba unas 10 veces en los heterocistos respecto a la presente en células vegetativas, mientras que su actividad se incrementaba unas 7 veces en los heterocistos. Este hecho pone de manifiesto un papel relevante de esta proteína en el heterocisto. Razquin et al. (1996) mostraron que el gen de la FNR no está localizado en la agrupación *nif*, y que estaba cercano a genes de proteínas de la cadena de transporte fotosintética, aunque su expresión era también regulada por la disponibilidad de nitrógeno en el medio.

La membrana tilacoidal de heterocistos carece de fotosistema II, y se acepta que la cantidad de ficobiliproteínas es nula o muy pequeña. Esto plantearía un problema respecto al modelo de la interacción de la FNR con la membrana tilacoidal propuesto por Bryan (1994). Con objeto de aportar datos a este problema, se han aislado complejos FNR-ficobiliproteínas de heterocistos y de células vegetativas de *Anabaena*, y se han caracterizado desde diferentes puntos de vista. Los complejos formados por FNR unida a ficobiliproteínas, coprecipitan cuando son reconocidos por los anticuerpos específicos de la FNR. Las ficobiliproteínas unidas a la FNR son distintas en el caso de células vegetativas y en el caso de heterocistos, y la secuencia aminoterminal de estas nos ha permitido identificar algunos de estos polipéptidos. Estudios cinéticos llevados a cabo con complejos de FNR y ficobiliproteínas purificados nos indican sin embargo, que la enzima unida a ficobiliproteínas es, en todas las actividades que puede presentar la FNR que hemos determinado, mucho más lenta, y con unas *k_m* mucho mayores. Este dato plantearía otra aparente contradicción con respecto al modelo vigente de una FNR unida a los ficobilisomas en la membrana tilacoidal. Curiosamente, hay una cita puntual en *Nostoc* en la que se ha descrito que la nitrogenasa, que se considera una enzima citosólica, esta unida a ficobilisomas, sugiriendo que los ficobilisomas podrían comportarse como una especie de matriz estructural para la nitrogenasa y su cadena de transporte (Bekasova, 1994), en la que presumiblemente podría quedar integrada la FNR.

Referencias

- Bekasova, O.D. Proc. VIII International Symposium on phototrophic prokaryotes, 10-15 September, 1994. Urbino (Italy). p.148.
- Böhme, H. & Schrautemeier, B., (1987) Biochim. et Biophys Acta. 891, 1-7.

- Bothe, H. & Neuer, G. (1988). *Methods in Enzymology*, 167: 596-501.
- Bryan, D.A. (1994) *The Molecular Biology of the Cyanobacteria*. Kluwer Academic Pub. Dordrech.
- Fillat, M.F., Flores, E. and Gómez-Moreno, C. (1993) *Plant Mol. Biol.* 22: 725-729.
- Lynn, M.E., Bantle, J.A., & Ownby, J.D. (1986). *J.Bacteriol.* 167: 940-946.
- Morand, L.Z., Cheng, R.H., Ho, K.K. & Krogmann, D.W. (1994). En: *The molecular biology of cyanobacteria* (Bryan D. ed.) pp 389-392. Kluwer Ac. Pub. Dordrecht
- Razquin, P., Schmitz, S., Peleato, M.L., Fillat, M.F., Gómez-Moreno, C., Böhme, H. (1995) *Photosynt. Res.* 43, 35-40.
- Razquin, P., Fillat, M.F. Schmitz, S., Stricker, O, Böhme, H. & Peleato, M.L. (1996) *Biochem. J.* 316: 157-160.
- Sancho, J., Peleato, M.L., Gómez-Moreno, C. & Edmondson, D.E. (1987) *Arch.Biochem.Biophys.* 288, 231-238.
- Schluchter, W.M. & Bryan, D.A. (1992) *Biochemistry* 31, 3092-3102
- Scherer, S., Alp, I. Sadowski, H. & Boger, P. (1988). *Arch.Biochem.Biophys.* 267: 228-235.
- Schrautemeier, B., Böhme, H. & Boger, P. (1984)) *Arch. Microbiol.* 137: 14-20.
- Schrautemeier, B.& Böhme, H. (1985) *FEBS Lett.* 184, 304-308

EN *RHODOBACTER CAPSULATUS* UN SISTEMA ESPECÍFICO DE TRANSPORTE DE ELECTRONES A LA NITROGENASA PARTICIPA EN LA BIODEGRADACIÓN DEL 2,4-DINITROFENOL

Blasco R, García P, Sáez L, Martínez-Luque M, Klipp W¹, Castillo F

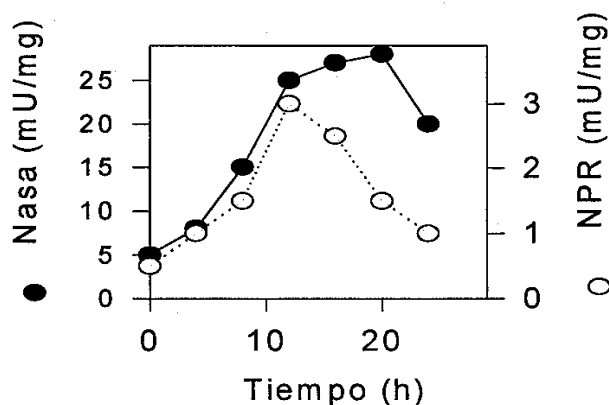
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Córdoba
(1) Lehrstuhl für Biologie der Mikroorganismen, Fakultät für Biologie, Universität Bochum, RFA

E-mail: bb1carof@uco.es

En *Rhodobacter capsulatus*, el balance C/N intracelular, reflejado en el cociente [glutamina]/[2-oxoglutarato], regula varias rutas del metabolismo del nitrógeno. Los cambios en este cociente constituyen una señal alostérica que inicia la activación o inactivación en cadena de proteínas sensoras del status nitrogenado y activadores transcripcionales de genes de respuesta. Este sofisticado sistema regulador integra además otras señales, como la presión de O₂, y está codificado por los genes *nifR1R2R4R5* (equivalentes a los genes *ntnCBA* y *glnB* de las enterobacterias), *nifAL* y varios factores y controla la fijación de nitrógeno, el transporte y el metabolismo del molibdeno (Kranz y Foster-Harnett, 1990; Masepohl y Klipp, 1995). Posiblemente también regula el metabolismo de aminoácidos y la asimilación de nitrato, y, como veremos en este trabajo, otros procesos no relacionados *a priori* con el metabolismo del nitrógeno.

Rhodobacter capsulatus es muy resistente al desacoplante 2,4-dinitrofenol (DNP), compuesto altamente contaminante derivado de las industrias de fabricación de explosivos, colorantes, plaguicidas, etc. Aunque la fijación de N₂ se inhibe fuertemente por DNP, ésto sólo ocurre durante un período inicial. Durante esta fase, la bacteria induce una actividad nitrorreductasa (NPR) que reduce el DNP a 2-amino-4-nitrofenol (ANP).

Figura 1.- Inducción de la nitrogenasa y la NPR en presencia de 2,4-DNP



La inducción de la nitrogenasa (Nasa) y la nitrorreductasa (NPR) tiene lugar simultáneamente, a lo largo de 10 h, coincidiendo con la fase de consumo de DNP y producción de ANP. La caída brusca de la actividad NPR se debe a la ausencia de DNP, que provoca posiblemente la inactivación de la enzima. La biodegradación del DNP implica su transporte activo, que requiere un componente periplásmico, seguido de la transferencia de 6 electrones al grupo 2-nitro, dando ANP como producto final (Blasco y Castillo, 1993). Dado que el ANP no es desacoplante, aunque sí mutagénico, la bacteria reanuda el crecimiento y la fijación de nitrógeno a medida que va disminuyendo la concentración de DNP.

La nitrorreductasa posee dos subunidades idénticas de 27 kDa, contiene FMN como grupo prostético y utiliza NADPH como donador de electrones. La enzima es extremadamente fotosensible cuando está oxidada, debido a la generación de oxígeno singlete en el centro activo de flavina. Sin embargo, la fotoinactivación de la NPR es muy poco probable *in vivo* dado que los carotenos absorben la luz azul y que en condiciones anaeróbicas existe un exceso de poder reductor.

La biodegradación de DNP parece estar bajo el control del regulón del nitrógeno. El transporte de DNP se inhibe fuerte e instantáneamente por amonio o glutamina, lo que se traduce en una disminución significativa de la actividad nitrorreductasa. Por otra parte, el O₂ inhibe también el transporte y la metabolización del DNP. La actividad nitrorreductasa se recupera varias horas después de haber transferido las células de medios con glutamina o amonio a medios con DNP y glutamato o dinitrógeno. Sin embargo, la actividad se recupera en varios minutos si las células cultivadas con glutamato o N₂ se transfieren al mismo medio con DNP. Dado que el amonio (en realidad, la glutamina) inhibe la síntesis y la actividad de la nitrogenasa a través del sistema *nifR*, la nitrorreductasa podría estar sometida al mismo control. En este sentido, y de la misma forma que ocurre con la fijación de nitrógeno, la inhibición de la síntesis de glutamina por MSX revierte el efecto del amonio sobre la metabolización del DNP.

Para comprobar la implicación del sistema *nifR* en la regulación del metabolismo del DNP se utilizaron mutantes de *R. capsulatus* afectados en los genes *nifR1* (*ntnC*) y *nifR4* (*ntnA* o *rpoN*). Ambos mutantes metabolizan sólo un 20% de DNP en relación con la estirpe silvestre y su actividad NPR es sólo un 10-15% de la del silvestre. Por consiguiente, los mutantes *nifR* son muy sensibles al DNP. Como era de esperar, la escasa metabolización del DNP por parte de estos mutantes desregulados no es sensible al amonio. Estos resultados sugieren que la nitrorreductasa podría ser una de las flavoproteínas que catalizan el transporte de electrones a la nitrogenasa. Sin embargo, los mutantes afectados en genes que codifican las proteínas NifF (de tamaño parecido a la nitrorreductasa de *R. capsulatus*) u Orf14 (que codifica una flavoproteína de 40 kDa) crecen en presencia de DNP y lo fotorreducen a ANP. Además, los anticuerpos anti-NifF obtenidos a partir de la proteína pura de *R. capsulatus* no inhiben la reacción de la nitrorreductasa. Tampoco se puede detectar la NPR de *Rhodobacter* mediante análisis *western* utilizando estos anticuerpos. Recientemente, se ha descrito una agrupación génica denominada *rnf* (*Rhodobacter nitrogen fixation*), bajo control de *nifR*, que codifica proteínas necesarias para la transferencia de electrones a las formas clásica (*nif*) y alternativa (*anf*) de la nitrogenasa (Schmehl et al., 1993; Jouanneau et al., 1998). Se han obtenido mutantes por interposón afectados en estos genes y, entre ellos, sólo los afectados en los genes *rnfA* (que codifica una proteína de membrana de 20 kDa) y

rnfC (que codifica una proteína sulfoférrica de 55 kDa) no fotorreducen ANP *in vivo* ni muestran actividad NPR *in vitro*. No obstante, las mutaciones *rnf* disminuyen la expresión de los componentes I y II de la nitrogenasa, por lo que podrían afectar también a la expresión de la NPR. A tenor de estos resultados se puede concluir que las transferencias de electrones al DNP y a la nitrogenasa comparten algunos componentes y, probablemente por esta razón, la expresión de la NPR está controlada por *nifR*. Además, dado que la NPR oxidada es altamente fotosensible, la disminución del aporte de poder reductor podría afectar su estabilidad en los mutantes *rnf*. Por lo que respecta al transporte de DNP, debe estar implicado un sistema multicomponente similar al que transporta molibdato o nitrato, ambos regulados por *nifR*.

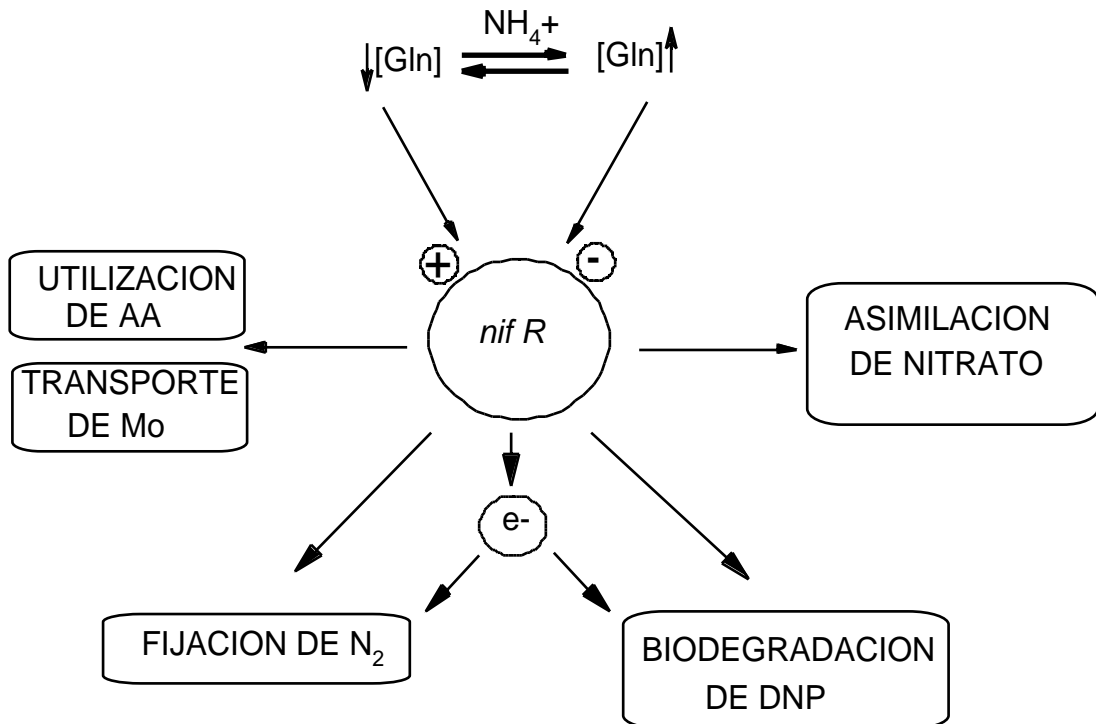


Figura 2.- Regulación del metabolismo del nitrógeno en *Rhodobacter capsulatus*

Las bacterias entéricas poseen una actividad nitrorreductasa que también produce aminas aromáticas. Sin embargo, esta enzima no se regula por el O_2 ni se reprime en presencia de amonio, por lo que los mutantes *rpoN* o *ntrC* de *E. coli* reducen el DNP a ANP y expresan la actividad nitrorreductasa. También los cloroplastos poseen una actividad que fotorreduce DNP a ANP (Del Campo et al., 1966), de lo que se deduce que estas enzimas están ampliamente distribuidas entre los organismos vivos. Además de su papel como enzimas desintoxicantes del medio ambiente, las NPR de la flora microbiana producen aminas aromáticas en el colon, lo que incrementa del riesgo de cáncer. Por otra parte, las NPR se utilizan en terapias anticancerosas como la ADEPT (*antibody-directed enzyme prodrug therapy*), por lo que resulta muy interesante su estudio desde el punto de vista estructural y funcional.

Agradecimientos

Los autores agradecen las ayudas económicas concedidas por la DGICYT (Proyecto PB 95 0554 Co2 02), el II Plan Andaluz de Investigación (CVI 117) y la Fundación Alexander von Humboldt (RFA).

Referencias

- Blasco, R, Castillo, F (1993). Characterization of a nitrophenol reductase from the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* E1F1. *Appl Environ Microbiol*, 59: 1774-1778.
- Del Campo, FF, Ramírez, JM, Paneque, A, Losada, M (1966) Ferredoxin and the dark and light reduction of dinitrophenol. *Biochem Biophys Res Commun*. 22: 547-553.
- Jouanneau Y, Jeong HS, Hugo N, Meyer C, Willison JC (1998) Overexpression in *Escherichia coli* of the *Rnf* Genes from *Rhodobacter capsulatus*: Characterization of 2 Membrane-bound Iron-Sulfur Proteins. *European J Biochem*, 251, 54-64
- Kranz, RG, Foster-Harnett, D (1990). Transcriptional regulatory cascade of nitrogen-fixation genes in anoxygenic photosynthetic bacteria: oxygen and nitrogen-responsive factors. *Mol Microbiol*, 4: 1793-1800
- Masepohl, B, Klipp, W (1996) Organization and regulation of genes encoding the molybdenum nitrogenase and the alternative nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus*. *Arch Microbiol*, 165, 80-90.
- Schmehl M, Jahn A, Meyer A, Hennecke S, Masepohl B, Schuppler M, Marxer M, Oelze J, Klipp W (1993) Identification of a new class of nitrogen fixation genes in *Rhodobacter capsulatus*: a putative membrane complex involved in electron transport to nitrogenase. *Mol Gen Genetics* 241: 602-615:

LIPID BIOSYNTHESIS IN RHIZOBIA

López-Lara I.M., de Rudder K.E.E., Epple G., Röhrs V., and Geiger, O.

Technische Universität Berlin, Institut für Biotechnologie, FG Technische Biochemie, Seestraße 13, 13353 Berlin, Germany. lope1532@mailszrz.zrz.TU-Berlin.De

1. Introduction

The development of legume nodules is largely controlled by reciprocal signal exchange between members of the *Rhizobiaceae* family and their legume host. For the establishment of an effective nitrogen fixing symbiosis numerous extracellular and cell surface components of the rhizobial partner are required. Nod factors are needed to induce nodule primordia on their respective host plants while cyclic glucans, exopolysaccharides, lipopolysaccharides, and K-like capsular polysaccharides are important for the infection process by rhizobia. It is expected that other components of the rhizobial membrane are involved in the formation of nitrogen-fixing nodules. We are studying the biosynthesis of membrane lipids and fatty acids in the *Rhizobiaceae* and their role on nitrogen fixation.

The phospholipid composition of the *Rhizobiaceae* is more complex than that of *Escherichia coli*. In addition to phosphatidylglycerol, cardiolipin and phosphatidylethanolamine also methylated derivatives of phosphatidylethanolamine, among them phosphatidylcholine, are found. Other integral membrane lipids reported in the *Rhizobiaceae* are sulfolipids and hopanoids. Hopanoids are structural relatives of steroids which are found only in representatives of the genus *Bradyrhizobium*. The structures of fatty acids are very diverse as well. This complex situation in fatty acid structures is reflected by channelling of biosynthetic systems by various different acyl carrier proteins.

2. Acyl carrier proteins in rhizobia

Biosynthesis and transfer of fatty acids is of major importance during the formation of biological membranes, storage lipids, or certain amphiphilic signal molecules [i.e. Nod factors in rhizobia (1) or autoinducers in Gram-negative bacteria (2)]. In bacteria a small protein, substituted with a 4'-phosphopantetheine prosthetic group, functions as the carrier of the growing acyl chains during fatty acid biosynthesis; this protein is called acyl carrier protein (ACP). ACPs are involved not only in the synthesis of fatty acyl chains but also in their transfer during phospholipid, lipid A, or hemolysin biosynthesis in bacteria. In *E. coli* all these functions seem to be realized by a single ACP which is produced constitutively from the *acpP* gene, and which is now named AcpP.

Some bacteria have, beside the constitutive ACP (AcpP), additional specialized ACPs. In *Rhizobium* species infecting plants of the *Trifolieae*, *Vicieae* and *Galegeae* tribes, one specialized ACP, the nodulation protein NodF, is needed for the formation of nitrogen-fixing nodules on their respective host plant (3). Together with Node it is involved in the synthesis of polyunsaturated fatty acids.

Besides the AcpP and the NodF proteins, there are at least two additional ACPs in *Rhizobium*. The first one was identified by its ORF in the complementation unit I of the *fix23* locus in *R. meliloti* (4) and this gene is now called *rkpF* (5). The protein product derived, RkpF, was recently shown to be an ACP (6). The second novel ACP is involved in the transfer of 27-hydroxyoctacosanoic acid to a sugar backbone during lipid A biosynthesis in *R. leguminosarum* (7). The overall amino acid sequence identity among the different ACPs of *Rhizobium* is only 25% (7), and a

well conserved amino acid region can only be observed around the phosphopantetheine-binding site. A three-dimensional structure of the AcpP of *E. coli* has been obtained. An initial characterization of the secondary structure and the general tertiary fold of the NodF protein (8) has shown that the overall structure of the ACPs is surprisingly well conserved. Theoretical predictions for the secondary structure of the four ACPs of *Rhizobium* also confirm a well conserved secondary structure.

2.1. Overproduction of acyl carrier proteins of *Rhizobium*

The *nodF* gene of *R. leguminosarum* (*R. leg.*) had been cloned in a pET9a vector (9). With this system it is possible to overexpress the NodF protein in *E. coli* to comprise 40% of the total soluble cell protein. In an analogous way, the *rkpF* gene of *R. meliloti* had been cloned and its protein product was overproduced in *E. coli* (6). The *acpXL* gene from *R. leg.* has been amplified using the PCR technique and was cloned in pET9a. Only the amino acid sequence of the constitutive ACP of *R. meliloti* was known so far (10). Using reverse genetics we have cloned and sequenced the *acpP* gene of *R. meliloti*.

When NodF, or other ACPs, are overproduced from *E. coli* mainly the apo-form is obtained (6, 8). ACPs of *Streptomyces*, coexpressed with the holo-acyl carrier protein synthase (AcpS) of *E. coli*, are modified with the 4'-phosphopantetheine group leading to the predominant expression of holo-ACPs (11). In a similar approach, we have cloned the *acpS* gene of *E. coli* downstream of the respective genes for the four ACPs of *Rhizobium*, in the respective overproducing plasmids. In case of RkpF, in which the holo-form can be easily distinguished from the apo-form in a native PAGE system, exclusive formation of the holo-form could be detected. Now we are able to overproduce the four ACPs of *Rhizobium* in their holo-form. The overproduced ACPs will be used to study their biospecific interaction with enzymes involved in fatty acid biosynthesis or transfer.

2.2. The role of ACPs in Nod factor specificity

During Nod factor biosynthesis NodA of *R. leg. bv. viciae* is required for the transfer of the *R. leg. bv. viciae* NodFE-dependent polyunsaturated fatty acid to the chitin oligosaccharide acceptor. In contrast, NodA of *Bradyrhizobium* is unable to direct the transfer of such a polyunsaturated fatty acid (12). This result could be explained if the NodA proteins had different selectivities for the respective fatty acids. We think a more likely explanation would be a specific interaction between NodF and NodA of *R. leg. bv. viciae* (13), while NodA of *Bradyrhizobium* would not be able to interact with NodF.

We have checked for NodF-NodA interaction using a modification of the Western blot technique: NodF-affinity blotting. The NodA proteins from *R. leg. bv. viciae*, *R. meliloti*, and *Bradyrhizobium* which have been overproduced from an *E. coli* strain (12) were separated in a SDS-PAGE. After renaturation of the blotted proteins we have detected significant binding of NodF to NodA of *R. leg. bv. viciae* and to NodA of *R. meliloti*. However, also NodA of *Bradyrhizobium* showed a weak interaction with NodF.

For the first time, we have demonstrated the direct interaction of the potential acyl transferase NodA of *R. leg.* with the acyl carrier protein NodF, indicating that NodF functions as the donor of polyunsaturated fatty acyl residues in Nod factor biosynthesis. In order to understand the specificity of NodA proteins from different rhizobia we want to determine dissociation constants of the interactions between the three NodA proteins with the four ACPs of *Rhizobium*, respectively.

2.3. Identification of proteins interacting with the acyl carrier protein NodF

Expression of the nodulation genes *nodFE* in rhizobia is sufficient for the synthesis of polyunsaturated fatty acids (14). Clearly, an ACP (NodF) and a condensing enzyme (Node) alone cannot be sufficient to allow the synthesis or

elongation of such fatty acids. Additional minimal enzymatic activities which should be involved are malonyl-NodF synthase, 3-oxoacyl-NodF reductase and β -hydroxyacyl-NodF dehydrase. These rhizobial enzymes therefore should interact with the respective ACP NodF. Surprisingly, if *nodFE* are expressed in *E. coli* the typical *nodFE*-dependent fatty acids are not synthesized suggesting that there are extra enzymatic activities in rhizobia or common enzymes with an altered (broader) substrate specificity. Using the NodF protein as a ligand we are identifying proteins of *R. leguminosarum* that specifically interact with NodF and, therefore, are presumably involved in the biosynthesis or transfer of the unusual C18:4 fatty acid.

The acyl carrier protein NodF was purified from the overexpressing strain and the homogeneous protein was coupled to an activated Sepharose gel. We have chromatographed crude cell-free extracts from *R. leguminosarum* on the NodF affinity column and detected several soluble and membrane bound proteins that interact with the column material only when NodF was provided as a ligand.

There is one soluble protein which elutes from the NodF affinity column only with 2 M NaCl. Determination of the N-terminal amino acid sequence of this protein, that has a (subunit) molecular weight of 29 kDa, yielded a 50 amino acid sequence. A BLAST search (15) with this fragment revealed high similarity to NodG of *Rhizobium* sp. N33 (82 % identity and 90% similarity) (16) and to NodG of *R. meliloti* (72% identity and 84% similarity) (17, 18). So far, the *nodG* gene has been found only on the two rhizobia mentioned above, in both cases it is located in the same operon as *nodE* and *nodF* (*nodFEG*). The deduced amino acid sequences of the *nodG*-gene product of *R. meliloti* and of *Arabidopsis thaliana* 3-oxoacyl-(acyl carrier protein) reductase exhibit 41% overall identity and 60% similarity (19). We have shown a direct interaction between NodF and a protein with homology to NodG, reinforcing the notion that NodG is involved in the synthesis of polyunsaturated fatty acids. Presently we are studying whether the 29 kDa NodF-binding protein is the product of a so far not identified nodulation gene of *R. leg.* or a constitutively expressed protein which is involved in general as well as in specialized fatty acid biosynthesis.

3. Biosynthesis of phosphatidylcholine in *R. meliloti*

In eukaryotes, phosphatidylcholine (lecithin) is the major membrane-forming phospholipid. In prokaryotes only some groups of bacteria, among them the *Rhizobiaceae*, contain phosphatidylcholine (PC). It was thought that bacteria have only a methylation pathway for PC biosynthesis. In this pathway PC is formed by three successive methylations of phosphatidylethanolamine (PE) using the methyl donor *S*-adenosyl-*L*-methionine. The enzyme carrying out the methylation steps is called phospholipid *N*-methyltransferase (PMT). Recently, we have isolated mutants of *R. meliloti* 1021 deficient in PMT activity (20). These mutants are unable to form PC when they are grown on minimal medium. Surprisingly, PC, but not the monomethylated and dimethylated derivatives of PE, is still formed when a *pmt* mutant is grown on complex medium or in minimal medium containing choline. *In vivo* and *in vitro* experiments have shown that *R. meliloti* can incorporate choline into PC, demonstrating the existence of a novel choline-dependent pathway for PC biosynthesis in *R. meliloti*. It is possible that during symbiotic interaction *Rhizobium* uses choline from the plant to form PC thereby switching from the methylation to the choline-dependent pathway for PC biosynthesis.

4. Alternative membrane lipids formed under phosphate limitation

Limitations of nitrogen and phosphate are frequent physiological stress situations for free-living organisms. Bacteria react to phosphate starvation by activating genes involved in transport and assimilation of phosphate as well as other phosphorous compounds. Under phosphate-limiting conditions some soil bacteria replace their membrane phospholipids by lipids containing no phosphorous. We have studied the membrane lipid pattern of *R. meliloti* at low phosphate concentrations. At growth-

limiting phosphate concentrations next to a decrease of phospholipids, the increase of sulfolipids, ornithine lipids and the *de novo* synthesis of diacylglycerol trimethylhomoserine (DGTS) lipids can be observed (21). *R. meliloti ndvF* mutants are deficient in phosphate uptake to the cytoplasm (22) and such mutants synthesize DGTS constitutively at low or high medium phosphate concentrations, suggesting that the cytoplasmic phosphate pool controls DGTS expression. Regulation of some phosphate-controlled processes occurs in *R. meliloti* through the two-component regulator system PhoU/PhoB (23, 24). *R. meliloti phoU* or *phoB* mutants are unable to direct DGTS biosynthesis at low phosphate concentrations demonstrating that the intact two-component signal transduction system PhoU/PhoB is required for the biosynthesis of the membrane lipid DGTS (21).

Acknowledgements: I.M.L.L. is the recipient of an EMBO long-term fellowship. Part of the work was financed by DFG grants Ge 556/2-2, Ge 556/3-1 and Ge 556/4-1.

5. References

1. Dénarié, J., Debelle, F. & Promé J.C. (1996) *Ann. Rev. Biochem.* **65**: 503-535.
2. Fuqua, C., Winans, S.C., & Greenberg, E. (1996) *Ann. Rev. Microbiol.* **50**: 727-751.
3. Debelle, F., Yang, G.P., Ferro, M., Truchet, G., Promé, J.C. & Dénarié, J. (1997) in *Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture*, eds Legocki, A., Bothe, H. & Pühler, A. (Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg), pp. 15-23.
4. Petrovics, G., Putnoky, P., Reuhs, B., Kim, J., Thorp, T.A., Noel, K.D., Carlson, R.W. & Kondorosi, A. (1993) *Mol. Microbiol.* **8**: 1083-1094.
5. Reuhs, B.L. (1996) in *Biology of Plant-Microbe Interactions*, eds. Stacey, G., Mullin, B. & Gresshoff, P.M. (International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions, St Paul), pp 331-336.
6. Epple, G. & Geiger, O. (1998) *J. Bacteriol.*, submitted.
7. Brozek, K.A., Carlson, R.W., & Raetz, C.H.R. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**: 32126-32136.
8. Ghose, R., Geiger, O. & Prestegard, J.H. (1996) *FEBS Lett.* **388**: 66-72.
9. Ritsema, T., Geiger, O., van Dillewijn, P., Lugtenberg, B.J.J., & Spaink, H.P. (1994) *J. Bacteriol.* **176**: 7740-7743.
10. Platt, M.W., Miller, K.J., Lane, W.S. & Kennedy, E.P. (1990) *J. Bacteriol.* **172**: 5440-5444.
11. Cox, R.J., Hitchman, T.S., Byrom, K.J., Findlow, I.S.C., Tanner, J.A., Crosby, J. & Simptom, T.J. (1997) *FEBS Letters* **405**: 267-272.
12. Ritsema, T., Wijfjes, A.H.M., Lugtenberg, B.J.J., & Spaink, H.P. (1996) *Mol. Gen. Genet.* **251**: 44-51.
13. Geiger, O., Glushka, J., Lugtenberg, B.J.J., Spaink, H.P., & Thomas-Oates, J.E. (1998) *MPMI* **11**: 33-44.
14. Geiger, O., Thomas-Oates, J.E., Glushka, J., Spaink, H.P. & Lugtenberg, B.J.J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**: 11090-11097.
15. Altschul, S.F. Madden, T. L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W & Lipman, D.J. (1997) *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
16. Cloutier, J., Laberge, S. & Antoun, H. *MPMI* **10**: 401-406.
17. Debelle, F. & Sharma, S.B. (1986) *Nucleic Acids Res.* **14**: 7453-7472.
18. Horvath, B., Kondorosi, E., John, M., Schmidt, J., Torok, I., Gyorgypal, Z., Barabas, I., Wieneke, U., Schell, J. & Kondorosi, A. (1986) *Cell* **46**: 335-343.
19. Slabas, A.R., Chase, D., Nishida, I., Murata, N., Sidebotton, C., Safford, R., Sheldon, P.S., Kekwick, R.G.O., Hardie, D.G. & Mackintosh, R.W. (1992) *Biochem. J.* **283**: 321-326.
20. de Rudder, K.E.E., Thomas-Oates J.E., & Geiger, O. (1997) *J. Bacteriol.* **179**: 6921-6928.
21. Geiger, O., Röhrs, V., Finan, T.M., & Thomas-Oates, J.E. (1998) *Mol. Microbiol.* submitted.
22. Bardin, S., Dan, S., Osteras, M. & Finan, T.M. (1996) *J. Bacteriol.* **178**: 4540-4547.
23. Al-Niemi, T.S., Summers, M.L., Elkins, J.G., Kahn, M.L. & McDermott, T.R. (1997) *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4978-4981.
24. Bardin, S.D. & Finan, T. M. *Genetics*, in press.

PLASTICIDAD FENOTÍPICA EN LA SIMBIOSIS *SESBANIA ROSTRATA-AZORHIZOBIUM CAULINODANS* ORS571

Fernández-López M., Goormachtig S., Gao M., D’Haeze W., Van Montagu M. y Holsters M.

V.I.B.-Dept. Genetics, Universiteit Gent, K.L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Gent, Bélgica. mafer@gengenp.rug.ac.be

Numerosos organismos, especialmente las plantas, poseen la capacidad de desarrollar un mismo órgano en diferentes formas (plasticidad fenotípica) como respuesta a cambios en las condiciones ambientales (Callahan *et al.* 1997). La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa da lugar a la formación de nódulos fijadores de nitrógeno. Estos nódulos se han clasificado en 2 tipos: determinados e indeterminados (Newcomb 1981). Los nódulos determinados se forman mayoritariamente en leguminosas tropicales; se desarrollan desde el córtex externo y presentan una actividad meristemática transitoria. Los nódulos de tipo indeterminado se forman mayoritariamente en leguminosas templadas; se originan en el córtex interno y poseen un meristemo apical persistente (Vasse *et al.* 1990). Generalmente se ha aceptado que cada especie de leguminosa desarrolla un único tipo de nódulo.

En *Sesbania rostrata* el desarrollo nodular es de tipo mixto (Tsien *et al.* 1983, Duhoux 1984, Ndoye *et al.* 1994, Goormachtig *et al.* 1997). Los estadíos tempranos se parecen a los de los nódulos indeterminados, con origen en el cortex interno. Sin embargo la actividad meristemática cesa 1 semana después de la infección, y los nódulos maduros son de tipo determinado.

Recientemente hemos podido observar que plantas crecidas en jarras Leonard con medio Norris, desarrollan nódulos de tipo indeterminado en las zonas de la raíz sometidas a oscuridad. Sin embargo las zonas, de esta misma raíz, expuestas a la luz desarrollan nódulos de tipo determinado. Este resultado se confirmó mediante hibridaciones *in situ* utilizando como sondas genes que diferenciaban un tipo de nódulo de otro. Así se utilizó la histona H4 y una ciclina de *S. rostrata* como marcadores de la actividad meristemática (Goormachtig *et al.* 1997) y *Srenod2* como marcador del parénquima nodular (Goormachtig *et al.* 1998). Además se determinó la existencia de la zonación típica de los nódulos indeterminados mediante el uso de

fusiones *nifH::lacZ* (para la zona de fijación de nitrógeno) y *nodA::gusA* (para la expresión de los genes de nodulación bacterianos) (Sharma y Signer 1990).

Es conocido que la síntesis de etileno en las raíces de las plantas se induce por la luz y otros tipos de estrés (Eliasson y Bolmark 1988). Por tanto hemos comprobado la posible implicación del etileno en la plasticidad fenotípica nodular. Así, se desarrolló un tipo de experimento en el que se utilizaron tubos manteniendo las raíces en oscuridad y adicionando 10 μM de Ag_2SO_4 a la solución nutritiva 5 días después de la inoculación de las plantas. En estas condiciones, los nódulos que se formaron fueron de tipo indeterminado, y su número fue menor que el de las plantas control. De igual modo, la adición de ACC o CEPA 20 μM a las plantas crecidas en jarras Leonard dio lugar al desarrollo de nódulos determinados. Nuestros datos sugieren un papel importante del etileno en el proceso de nodulación en *S. rostrata*. Al tiempo que abren una nueva vía en la investigación de la evolución de la nodulación y sus implicaciones en el desarrollo de nuevos órganos

Bibliografía

- Callahan H.S., Pigliucci M. y Scglichting C.D. 1997. Developmental phenotype plasticity: where ecology and evolution meet molecular biology. *BioEssays* 19: 519-525.
- Duhoux E. 1984. Ontogénèse des nodules caulinares du *Sesbania rostrata* (legumineuses). *Can. J. Bot.* 62: 982-994.
- Eliasson L. y Bollmark M. 1988. Ethylene as a possible mediator of light-induced inhibition of root growth. *Physiol. Plant.* 72: 606-609.
- Goormachtig S., Alves-Ferreira M., Van Montagu M., Engler G. y Holsters M. 1997. Expression of cell cycle genes during *Sesbania rostrata* stem nodule development. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10: 316-325.
- Goormachtig S., Van Montagu M. y Holsters M. 1998. The early nodulin gene *Enod2* shows different expression patterns during *Sesbania rostrata* stem nodule development. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11: 237-241.
- Ndoye I., de Billy F., Vasse J., Dreyfus B. y Truchet G. 1994. Root nodulation of *Sesbania rostrata*. *J. Bacteriol.* 176: 1060-1068.
- Newcomb W. 1981. Nodule morphogenesis and differentiation. In *Biology of the Rhizobiaceae*. K.L. Giles y A.G. Atherly (Eds.), pp. 247-298. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 13. Academic Press, New York.
- Sharma S.B. y Signer E.R. 1990. Temporal and spatial regulation of the symbiotic genes of *Rhizobium meliloti* in planta revealed by transposon *Tn5-gusA*. *Genes & Develop.* 4: 344-356.

- Tsien H.C., Dreyfus B.L. y Schmidt E.L. 1983. Initial stages in the morphogenesis of nitrogen-fixing stem nodules of *Sesbania rostrata*. J. Bacteriol. 156: 888-897.
- Vasse J., de Billy F., Camut S. y Truchet G. 1990. Correlation between ultrastructural differentiation bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. J. Bacteriol. 172: 4295-4306.

FERRITINA Y DESARROLLO DEL NÓDULO DE LAS LEGUMINOSAS

Lucas M.M.¹, Van de Sype G.², Hernández M.J.¹, Hérouart D.², Puppo A.² y de Felipe M.R.¹

(1), Dpto. Fisiología y Bioquímica Vegetal, Centro Ciencias Medioambientales, CSIC, C/Serrano, 115 bis 28006 Madrid. (2), Laboratoire de Biologie Végétale et Microbiologie, CNRS ERS590, Université de Nice-Sophia Antipolis, 06108 NICE Cedex 2 Francia. MLS@pinar1.csic.es

Introducción

El hierro en los tejidos no se encuentra como elemento libre, debido a su alta reactividad en presencia de oxígeno. Los animales, las plantas y las bacterias, poseen proteínas almacenadoras de hierro, las ferritinas.

La ferritina, constituida por subunidades, alberga miles de átomos de hierro en su interior. En plantas, la ferritina se codifica en el núcleo. En el citoplasma se sintetiza un péptido tránsito (Ragland *et al.* 1990), y la incorporación del hierro parece producirse en el plastidio (Waldo *et al.* 1995).

La presencia de ferritina se ha descrito en varios órganos vegetales (Theil 1987), incluyendo los nódulos de las leguminosas. En los nódulos se hace necesario disponer de elevadas cantidades de hierro para la síntesis de leghemoglobina, citocromos, nitrogenasa, etc, y por tanto, el hierro almacenado en la ferritina sería de gran importancia.

Estudios realizados por Ko *et al.* (1985) en nódulos de soja sugieren una relación inversa entre el contenido de ferritina y de leghemoglobina, y también entre los niveles de ferritina y la fijación de nitrógeno, ya que sólo fue detectada en nódulos jóvenes de simbiosis efectivas. La correlación negativa entre las concentraciones de ferritina y del grupo hemo (Ko *et al.*, 1987), el aumento de mRNA y de la proteína ferritina durante las etapas tempranas de la nodulación, y la disminución de la proteína cuando la leghemoglobina se acumula en estados posteriores (Ragland and Theil, 1993) sugieren que la ferritina puede jugar un papel importante en los primeros estadios del desarrollo. Sin embargo, no existe información acerca de ferritina y su posible papel durante el la senescencia de los nódulos.

En este trabajo se presenta un estudio inmunocitoquímico de la ferritina llevado a cabo en nódulos determinados e indeterminados con diferentes estados de desarrollo.

Material y Métodos

Se inocularon semillas de *Glycine max* L Merr cv Labrador, *Medicago sativa* cv Europe y *Lupinus albus* L cv Multolupa inoculadas con *Bradyrhizobium japonicum* cepa USDA 110, *Sinorhizobium meliloti* cepa Rm500 y *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) cepa ISLU16, respectivamente. Las plantas de soja y alfalfa se crecieron en invernadero, y las de lupino en cámara de cultivo. Se tomaron muestras a diferentes tiempos desde la siembra.

Inmunocitoquímica:

Los nódulos de soja y alfalfa se fijaron en 1,5% glutaraldehído/1,5% paraformaldehído en tampón cacodilato-Na 0,05 M pH 7.4, y los nódulos de lupino se fijaron en 2,5% de glutaraldehído en el mismo tampón. Las muestras se incluyeron en Araldita Durcupan ACM o en LR White según Lucas *et al.* (1992) y de Lorenzo *et al.* (1993).

El inmunomarcado se llevó a cabo según Vivo *et al.* (1989) empleando un anticuerpo policlonal obtenido frente a ferritina de semilla de guisante, cedido por el Dr. J.F. Briat (URA CNRS 2133, Montpellier), y un anticuerpo secundario de cabra anticonejo conjugado con oro coloidal (GAR 15 nm, BioCell). Las secciones teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo se observaron en un microscopio de transmisión (Philips EM 300 o CM 12) a 80 kV.

Se llevaron controles sin anticuerpo primario y con suero preinmune, que no dieron inmunoreacción.

Inmunoblot de proteínas del nódulo de lupino:

Las proteínas de los nódulos de lupino, recogidos a las 3-12 semanas de la siembra, se extrajeron con tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.8 conteniendo ascorbato 1 M o con tampón fosfato potásico 100 mM pH 6.5, se fraccionaron por SDS-PAGE, y se electroblotearon con tampón descrito por Towbin *et al.* (1979), en un sistema semiseco (Transblot, BioRad) durante 1 h a 20 V. Se empleó el suero anti-ferritina, un anticuerpo policlonal anti-leghemoglobina (Vivo *et al.*, 1989), y el anticuerpo secundario IgG de cabra anticonejo conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma).

Resultados

Localización en nódulos determinados (soja)

En los nódulos determinados, las células del tejido central se encuentran, aproximadamente, en el mismo estado de desarrollo.

En los nódulos de soja, la zona central está constituida por células infectadas, y por células no infectadas especializadas en la producción de ureidos (Newcomb *et al.*, 1985). En ambos tipos de células se observaron plastidios, con tamaños y formas variadas, y la presencia de amiloplastos, con masivas acumulaciones de almidón, en el caso de las células no infectadas.

La ferritina se localizó en la matriz de los plastidios y los amiloplastos de ambos tipos celulares en nódulos jóvenes y maduros (3 a 8 semanas), e incluso en nódulos senescentes (11 semanas). Aunque en general, en las células infectadas se observó un marcaje superior en plastidios que en amiloplastos, no se apreciaron diferencias importantes relacionadas con la edad del nódulo. Sin embargo, en las células no infectadas el inmunomarcado aumentó con la edad el nódulo, localizándose cantidades relativamente elevadas del epitopo ferritina en los amiloplastos de estas células, en los nódulos de mayor edad.

Localización en nódulos indeterminados (alfalfa, lupino)

El nódulo de alfalfa, típicamente indeterminado, se caracteriza por presentar un gradiente de desarrollo en su interior. En este nódulo se pueden distinguir 3 zonas con células infectadas: 1) zona de pre-fijación de nitrógeno, 2) zona de fijación de nitrógeno, y 3) zona senescente. Junto a las células infectadas coexisten células no infectadas sin función descrita.

La ferritina se localizó en los plastidios de las células de las zonas de pre-fijación y de fijación de nitrógeno. En la zona de fijación se observaron, con mucha frecuencia, plastidios con matrices de ligera densidad electrónica, que contenían estructuras cristalinas inmunomarcadas. En zonas más maduras del nódulo, los plastidios no presentaban marcaje, o si lo había era muy débil.

Para determinar si las características observadas, de presencia de ferritina en los diferentes estados de desarrollo del nódulo, estaban relacionadas con el tipo de nódulo, se estudió el nódulo de lupino, que en ciertos aspectos no se considera un nódulo indeterminado típico. Al comparar el nódulo de lupino con el de alfalfa, al menos dos características los diferencian: 1) en el nódulo de lupino, la zona central sólo posee células infectadas, y 2) no presenta el gradiente de desarrollo típico de nódulos indeterminados.

En el nódulo de lupino, la ferritina se localizó en plastidios y amiloplastos de las células infectadas, en todos los estados de desarrollo estudiados. También se observó inmunomarcado sobre los bacteroides.

Se apreció una clara disminución del marcaje en nódulos maduros (5 semanas) respecto a nódulos jóvenes (3 semanas), pero incluso en las células que presentaban síntomas claros de senescencia en nódulos más viejos (7 semanas), los plastidios presentaban ferritina en su estroma. En las células con síntomas de avanzada senescencia, en nódulos de 12 semanas, los únicos orgánulos subcelulares reconocibles fueron los amiloplastos, que frecuentemente contenían grandes acumulaciones de almidón, y ferritina dispersa en el estroma o en estructuras cristalinas.

Con objeto de confirmar la disminución de ferritina con la edad de los nódulos de lupino, se llevó a cabo un inmunoblot. El suero anti-ferritina reconoció varias bandas de 50, 28 y 26 kDa, aproximadamente. Sorprendentemente, la inmunotinción de las bandas aumentó durante el desarrollo del nódulo, aún cuando la esperada disminución de la leghemoglobina fue observada. Por este motivo el estudio inmunocitoquímico se centró en otra zona del nódulo: la corteza.

Los nódulos de lupino presentan en su corteza 3 zonas diferenciadas (de Lorenzo, 1992): 1) la corteza externa o zona 1; 2) la corteza media o zona 2, relacionada en estos nódulos con el control a la difusión de oxígeno (de Lorenzo *et al.*, 1993; Iannetta *et al.*, 1993); y 3) la corteza interna o zona 3, próxima a la zona infectada.

Los plastidios de la corteza de los nódulos jóvenes de lupino (3 semanas) parecen tener bajo contenido de ferritina. Sin embargo, los plastidios y amiloplastos de la corteza de nódulos más maduros (5 y 7 semanas) presentaron abundante inmunomarcado en el estroma y en estructuras cristalinas. Los nódulos de 12 semanas, que mostraban síntomas de avanzada senescencia en la zona infectada, no parecían afectados en su corteza. Las células de la corteza, especialmente de la zona 3, poseían plastidios y amiloplastos con elevado contenido de ferritina, generalmente asociada a estructuras cristalinas.

Discusión

En este trabajo se ha inmunolocalizado por primera vez la ferritina en nódulos de leguminosas. La técnica ha permitido hacer un seguimiento del contenido de ferritina en los diferentes tipos celulares del nódulo, durante el envejecimiento.

La zona central de los nódulos de las leguminosas contienen significativas cantidades de ferritina, especialmente en las primeras etapas del desarrollo.

La evolución de la ferritina con la edad del nódulo parece ser distinta dependiendo de la simbiosis rizobio-leguminosa: en la zona central de los nódulos senescentes de soja

y de lupino se puede detectar ferritina, pero no sucede lo mismo en las zonas senescentes de los nódulos de alfalfa. En cualquier caso, nuestros resultados sugieren una relación inversa entre el contenido de ferritina en la zona infectada y la edad del nódulo, ya que el inmunomarcado disminuyó en las células infectadas de los nódulos o zonas senescentes. En estas células, la capacidad de unión del Fe estaría disminuída con la edad, y el hierro no secuestrado en la molécula de ferritina podría contribuir a aumentar la producción de radicales libres observada en nódulos senescentes por Becana y Klucas (1992).

Por otra parte, la presencia de ferritina durante el envejecimiento del nódulo depende del tipo de célula. Las células no infectadas de la zona interna de los nódulos de soja y las células de la corteza del nódulo de lupino tenían importantes acumulaciones de ferritina, incluso en estados avanzados de senescencia, mientras que en las células infectadas se producía disminución del contenido de la ferritina, con la edad. Es sorprendente que en el mismo nódulo las células de la corteza aparentemente no presenten daños ultraestructurales mientras que las de la zona infectada muestren síntomas de avanzado estado de senescencia. Quizás la corteza actúa como un escudo o protección para el resto de la planta, en el sentido de que compuestos tóxicos liberados en la zona infectada senescente, como es el caso del hierro, son retenidos en los plastidios evitando su transporte a otros tejidos de la planta. En las células de la corteza de nódulos senescentes de lupino, la ferritina se encuentra, muy frecuentemente, en estructuras cristalinas, que es la forma más estable de almacenamiento de ferritina para acumulaciones permanentes (Seckback, 1982). Esto es especialmente cierto en la zona 3 de la corteza, en dónde está localizado el sistema vascular. El hecho de que los plastidios sean los últimos orgánulos destruídos, durante el proceso de senescencia, indicarían su importancia en el proceso.

El metabolismo de plastidios no fotosintéticos en la actualidad es poco conocido (Emes and Neuhaus, 1997). El gran número de plastidios y amiloplastos presentes tanto en las células infectadas como en las no infectadas, y los resultados expuestos en este trabajo indican que los plastidios pueden jugar un papel importante en la senescencia del nódulo, y mayor atención se debería prestar para determinar su papel en el metabolismo general de los nódulos fijadores de nitrógeno.

Bibliografía

- Becana M. and R.V. Klucas. 1992. Proc.Natl. Acad. Sci. USA. 89: 8958-8962.
- De Lorenzo C. 1992. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica Madrid.
- De Lorenzo C. *et al.* 1993. J. Exp. Bot. 44: 1469-1474.
- Emes M.J. and H.E. Neuhaus. 1997. J. Exp. Bot. 48: 1995-2005.
- Iannetta P.P.M. *et al.* 1993. J. Exp. Bot. 44: 1461-1467.
- Ko M.P. *et al.* 1985. Phytopathol. 75: 159-164.
- Ko M.P. *et al.* 1987. Plant Physiol. 83: 299-305.
- Lucas M.M. *et al.* 1992. J. Plant Physiol. 140: 84-91.
- Newcomb E.H *et al.* 1985. Protoplasma. 125:1-12.
- Ragland M. *et al.* 1990. J. Biol. Chem. 263: 18339-18344.
- Ragland M. and E.C. Theil. 1993. Plant Mol. Biol. 21: 555-560.
- Seckback J. 1982. J. Plant Nutrition 5: 369-394.
- Theil E.C. 1987. Annu. Rev. Biochem. 56: 289-315.
- Towbin H. *et al.* 1979. Proc. Antl. Acad. Sci. USA 76: 4350-4354.
- Vivo A. *et al.* 1989. Plant Physiol. 90: 452-457.
- Waldo G.S. *et al.* Plant Physiol. 109: 797-802.

METABOLISMO CARBONADO Y RESPIRACIÓN BACTEROIDAL EN NÓDULOS DE LEGUMINOSAS SOMETIDAS A ESTRÉS SALINO

Ocaña A., Martínez E., Ferri A. y Lluch C.

Dpto. Biología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada. 18071-Granada.

clluch@goliat.ugr.es

Introducción

La salinidad es uno de los mayores problemas agrícolas en regiones áridas y semiáridas con irrigación. En las leguminosas el estrés salino es un factor limitante, afectando tanto al crecimiento y producción como a la nodulación y fijación de nitrógeno. Entre los mecanismos que provocan la inhibición de la fijación simbiótica de nitrógeno bajo condiciones de salinidad, se han propuesto la disminución en el aporte de compuestos carbonados, principalmente ácidos dicarboxílicos, a los bacteroides, y la inhibición de la respiración bacteroidal (Delgado *et al.*, 1993). La hipótesis de la limitación en el aporte de fotosintato al nódulo, parece descartada pues se ha detectado acumulación de azúcares solubles en respuesta a la salinidad tanto en nódulos de *Pisum sativum* (Delgado *et al.*, 1993) como de *Phaseolus vulgaris* (Zúñiga, 1997) o de *Cicer arietinum* (Soussi *et al.*, 1998).

Por otra parte, la acumulación de determinados solutos compatibles, como aminoácidos o azúcares, es una respuesta al estrés salino bien estudiada en muchas especies vegetales. La acumulación de prolina se ha descrito en nódulos radicales de *Glycine max* (Fougère *et al.*, 1991), de *Vicia faba* (Cordovilla *et al.*, 1996) habiéndose discutido el posible papel de este soluto como osmorregulador y/o como substrato energético para el bacteroide (Trinchant *et al.*, 1996).

En este trabajo se analiza la influencia de la salinidad sobre el crecimiento y fijación de nitrógeno en nódulos radicales, así como su relación con las actividades enzimáticas implicadas en el metabolismo de los ácidos dicarboxílicos, en citosol nodular y bacteroidal. Se estudia también la capacidad respiratoria de los bacteroides aislados, incubados en presencia de varios compuestos susceptibles de ser utilizados como substratos energéticos.

Material y Métodos

Plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Contender se han cultivado en dispositivos del tipo jarra Leonard, con solución nutritiva de Rigaud y Puppo (1975), en cámara de ambiente controlado (25/19°C; 55/75% humedad relativa). Las semillas se pregerminaron en semilleros con vermiculita estéril a 28°C, transplantándose a las 48 horas. Se inocularon con 1 ml de una suspensión bacteriana de *Rhizobium tropici* cepa CIAT899 (aprox. 10⁹ céls./ml). Las plantas se trataron con NaCl 50 y 100 mM en la solución nutritiva desde el inicio del cultivo, manteniéndose las plantas control sin NaCl. Se realizaron dos recogidas, la primera a los 20 días de cultivo, en pleno periodo de crecimiento vegetativo, y la segunda en el inicio de floración, a los 28 días.

Se determinaron parámetros de crecimiento y nodulación: peso seco de planta (PSP), relación de peso seco de raíz/parte aérea (RPA), peso seco de nódulos (PSN) y peso normalizado de nódulos (PNN), actividad reductora de acetileno específica (ARA) y total por planta (ARAP).

Se analizaron las actividades enzimáticas fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), malato deshidrogenasa (MDH) e isocitrato deshidrogenasa (ICDH) en el citosol de la fracción vegetal de los nódulos, así como la MDH e ICDH en el citosol bacteroidal.

Los bacteroides se aislaron según la técnica descrita por Delgado *et al.* (1993) y, para las medidas de consumo de oxígeno, se incubaron en un electrodo de oxígeno (Hansatech DW) en presencia de varios sustratos exógenos (succinato, malato, lactato, prolina y glutamato) o sin sustratos exógenos (control).

Resultados y discusión

Las plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Contender mostraron una alta sensibilidad a la sal en el medio de cultivo, tanto en crecimiento como en el proceso de fijación de nitrógeno (ARA y PSN). El peso seco de las plantas disminuyó en un 50% con 100 mM en la segunda recogida (Tab. 1). En cambio, RPA incrementa significativamente con 50 mM. El peso seco de nódulos también se afectó negativamente, pero no disminuyó el peso normalizado de nódulos, a excepción de 100 mM en la primera recogida.

Tabla 1. Peso seco de planta (PSP) en gramos, relación de peso seco de raíz/parte aérea (RPA), peso seco de nódulos (PSN) en g planta⁻¹, peso normalizado de nódulos (PNN) en mg PSN (g peso seco parte aérea)⁻¹, actividad reductora de acetileno específica (ARA) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4$ (g PSN)⁻¹ h⁻¹, ARA total por planta (ARAP) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4$ planta⁻¹ h⁻¹, en plantas de *Phaseolus vulgaris* inoculadas con la cepa CIAT899 de *Rhizobium tropici*, crecidas con diferentes concentraciones de NaCl. (N.D. = no detectado)

Días	NaCl (mM)	PSP	RPA	PSN	PNN	ARA	ARAP
20	0	1.70	0.45	0.111	100.5	49.4	5.41
	50	1.48	0.50	0.094	103.2	31.0	2.81
	100	1.03	0.29	0.024	35.1	24.8	0.65
28	0	2.29	0.26	0.143	83.6	41.9	6.12
	50	1.50	0.38	0.084	85.7	14.6	1.30
	100	1.11	0.32	0.054	73.0	N.D.	N.D.
MDS (0.05)		0.43	0.11	0.032	36.0	29.2	2.91

Los datos de ARA presentaron gran variabilidad, que se refleja en el valor muy alto de la MDS (Tab. 1). La inhibición de la actividad ARA específica fue especialmente alta en el segundo muestreo, en el que dicha actividad no se pudo detectar con 100 mM de sal. La actividad ARA total por planta también disminuyó drásticamente con la salinidad, especialmente al inicio de floración. La fijación de nitrógeno es más sensible a las condiciones de salinidad que el crecimiento (Elsheik y Wood, 1990; Soussi *et al.*, 1998).

Los datos de actividades enzimáticas del metabolismo carbonado en el citosol nodular (Tab. 2) muestran una disminución importante en el segundo muestreo (inicio de floración) respecto al primero (p. vegetativo) en las plantas control. Además, la inhibición de estas actividades por la sal fue importante. La actividad PEPC sufrió una inhibición espectacular, incluso con la dosis más baja de sal, en las dos recogidas. Estos resultados contradicen la activación de esta enzima en condiciones de

estrés descrita para otras especies de leguminosas (Yen *et al.*, 1995; Irigoyen *et al.*, 1992). La actividad MDH también se inhibió por la sal, así como la ICDH, aunque estas actividades se afectaron poco con 50 mM en el periodo vegetativo. La reducción de las actividades PEPC y MDH podría explicar la inhibición de la nitrogenasa por el menor aporte de malato a los bacteroides.

Tabla 2. Actividades enzimáticas del metabolismo carbonado (en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$) en citosol nodular y bacteroidal de nódulos radicales de *Phaseolus vulgaris* inoculada con la cepa CIAT899 de *Rhizobium tropici*, en condiciones de salinidad.

Días	NaCl (mM)	Citosol nodular			Citosol bacteroidal	
		PEPC	MDH	ICDH	MDH	ICDH
20	0	149.5	6013	47.3	88.6	4.2
	50	12.5	5077	47.3	51.6	1.4
	100	2.7	1194	8.3	29.6	0.9
28	0	48.2	3549	30.1	71.5	2.5
	50	2.1	1300	13.7	68.3	1.1
	100	4.6	685	12.3	61.7	1.4
MDS (0.05)		5.5	606	4.6	7.3	0.3

La actividad MDH en el citosol bacteroidal (Tab. 2) dio valores más bajos que en citosol nodular, pero el efecto inhibitorio de la sal en este caso, aunque significativo, fue mucho menor que en el citosol vegetal. De hecho, a los 28 días el descenso con respecto al control sólo fue significativo con 100 mM. Así mismo, la actividad ICDH también mostró niveles más bajos que en el citosol nodular, pero en este caso la sal produjo una inhibición importante en ambos muestreos con las dos dosis de sal.

Tabla 3. Consumo de O_2 ($\text{nmol mg}^{-1} \text{proteína min}^{-1}$) en bacteroides de nódulos radicales de *Phaseolus vulgaris* inoculada con la cepa CIAT899 de *Rhizobium tropici*, incubados con diferentes sustratos exógenos o sin sustratos exógenos (control).

Días	NaCl (mM)	Control	Succinato	Malato	Lactato	Prolina	Glutamato
20	0	26.4	52.6	47.4	15.6	28.4	28.9
	50	20.1	32.8	30.3	21.3	18.4	17.7
	100	11.6	19.1	15.4	13.1	15.4	12.2
28	0	17.0	40.6	30.8	17.8	20.6	19.2
	50	12.3	27.3	22.0	17.0	20.4	17.8
	100	13.7	22.6	20.6	17.7	18.1	13.5
MDS (0.05)		3.9	7.8	5.8	6.0	5.1	6.5

Los datos de consumo de O₂ por los bacteroides aislados (Tab. 3) muestran una disminución significativa con la salinidad. El succinato y malato añadidos al medio de incubación, estimularon el consumo de oxígeno respecto al control con todas las dosis de sal, resultados que coinciden con Delgado *et al.* (1993). En cambio, lactato, prolina y glutamato no produjeron efectos significativos. Además, en nódulos de *P. vulgaris* var. *Contender* no se detectó incremento de prolina con la sal, por lo que, al menos en esta variedad, la prolina no parece jugar un papel importante en relación con la salinidad (Trinchant *et al.*, 1996).

La fuerte inhibición de las actividades PEPC y MDH, junto con la disminución de la capacidad respiratoria de los bacteroides, puede estar relacionada con la sensibilidad de esta variedad de judía a la salinidad.

Bibliografía

- Cordovilla MP, Ligeró F, Lluch C. (1996). *Journal of Experimental Botany* 47, 203-10.
- Delgado MJ, Garrido JM, Ligeró F, Lluch C. (1993). *Physiologia Plantarum* 89, 824-29.
- Elsheikh EAE, Wood M. (1990). *Journal of Experimental Botany* 41, 1263-69.
- Fougère F, Le Rudulier D, Streeter JG. (1991). *Plant Physiology* 96, 1228-36.
- Irigoyen JJ, Emerich DW, Sánchez-Díaz M. (1992). *Physiologia Plantarum* 84, 61-66.
- Rigaud J, Puppo A. (1975). *Journal of General Microbiology* 88, 223-28.
- Soussi M, Ocaña A, Lluch C. (1998). *Journal of Experimental Botany* (en prensa).
- Trinchant JC, Van de Sybe G, Rigaud J. (1996) *Plant Physiology and Biochemistry* Special issue S18-57.
- Yen HE, Grimes HD, Edwards GE. (1995). *Journal of Plant Physiology* 145, 557-64.
- Zuñiga D. (1997). Tesis doctoral. Universidad de Granada.

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos INCO-950717 (Contract Number ERBIC18CT960081) y PB95-1159 de la DGICYT.

PAPEL DEL BORO EN EL DESARROLLO DE *FRANKIA*. INCIDENCIA SOBRE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO EN VIDA LIBRE

Redondo M.¹, Orellana M.², Wall L.G.², Bolaños L.¹ y Bonilla I.¹

¹Dpto. Biología. Facultad de Ciencias. UAM. Madrid 28049.
ildefonso.bonilla@uam.es

²Dpto. Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de Quilmes. Argentina.

Introducción

Nuestro grupo ha demostrado un requerimiento del micronutriente boro (B) y sus papeles fisiológicos en relación con los procesos de fijación biológica del nitrógeno, tanto en forma de vida libre, cianobacterias (Bonilla y col. 1990) como en nódulos de leguminosas (Bolaños y col. 1994). Así, en cianobacterias, el B juega un papel estabilizador de las cubiertas del heterocisto (García-González y col. 1991), principal barrera protectora para la nitrogenasa contra la difusión de oxígeno. En la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas, si bien el B no parece esencial para la bacteria, la estructura del nódulo (Bolaños y col. 1994; Bonilla y col. 1997) y las interacciones planta-bacteria durante el desarrollo del mismo se ven alteradas por la ausencia del micronutriente (Bolaños y col. 1996).

En la actualidad, hemos iniciado el estudio de la incidencia de este oligoelemento en el desarrollo de *Frankia*, así como en el proceso de simbiosis *Frankia*-actinorrizas. A diferencia de *Rhizobium*, pero de forma análoga a las cianobacterias, *Frankia* tiene capacidad de fijar nitrógeno en vida libre en aerobiosis para lo cual, y de igual modo que en cianobacterias, diferencia una estructura especializada, que en el caso de las anteriores es el heterocisto y en el caso de *Frankia* es la vesícula, las cuales van a proteger a la nitrogenasa ante el oxígeno. Las vesículas presentan una cubierta multilaminar de naturaleza lipídica (Kleemann y col. 1994), similar a la de los heterocistos, susceptible de interaccionar con B. Por ello, nuestro proyecto actual comienza con el estudio del papel del B en *Frankia* en vida libre, cuyos resultados preliminares, obtenidos en cultivos de *Frankia* BCU110501, sugiriendo un papel del B sobre todo para el crecimiento de *Frankia* en condiciones de fijación de nitrógeno, presentamos.

Resultados y discusión

Frankia BCU110501 se cultivó en medio BAP-glucosa para seguir su crecimiento y desarrollo en condiciones de +B (2,86 p.p.m.) +N (5 mM NH₄Cl), +B-N, -B+N y -B-N, y estudiar la influencia del boro tanto en condiciones fijadoras como en condiciones no fijadoras. Se determinó su crecimiento y se hizo un estudio a nivel de microscopía óptica y electrónica de su estructura.

Debido a la naturaleza hifal de la bacteria, el estudio del crecimiento por la medición de la densidad óptica no es fiable. A causa de ello, dicho factor se midió en

función de la cantidad de proteína de los cultivos (Smith y col. 1985). Los resultados obtenidos indican que la cantidad de proteína por cultivo crece respecto a la cantidad inicial en todos ellos, excepto en aquellos crecidos en condiciones de fijación de N₂ en ausencia de B.

El estudio al microscopio óptico muestra que los cultivos crecidos en presencia de B presentan unas hifas de longitud considerablemente mayor que las de aquellos crecidos en ausencia de B, que son más cortas y de aspecto más frágil, además, el número de vesículas diferenciadas parece menor en estos últimos. Estas observaciones quedan contrastadas tras la visualización al microscopio electrónico. Así, en tanto que las hifas en presencia de B presentan un citoplasma y una septación normal, las hifas de los cultivos crecidos en ausencia de B carecen de septos definidos así como aparentemente, de citoplasma. De igual modo, en ausencia de B las vesículas y los esporangios aparecen con una estructura totalmente desorganizados.

La ausencia de B en los medios de cultivo influye radicalmente tanto en el crecimiento como en la integridad y funcionalidad del microorganismo, es decir, en el desarrollo del mismo y en la formación de vesículas con función fijadora. Posiblemente la ausencia de B disminuya la estabilidad de la pared celular al no poder generarse los enlaces ester entre el borato y los grupos cis-diol de las moléculas constitutivas de la pared celular. También debe de influir en la diferenciación y funcionalidad de las vesículas, ya que en condiciones de fijación y ausencia de B la cantidad de proteínas no se incrementa respecto al valor inicial, lo que indica que hay una menor disponibilidad de nitrógeno reducido, el cual ha de ser proporcionado por las vesículas. Dicha funcionalidad, posiblemente se vea alterada debido a una desestabilización de la cubierta protectora contra el oxígeno, lo que determina, una vez más, un papel estructural para el boro.

Este trabajo ha sido financiado por D.G.I.C.Y.T. nº PB95-0217-CO2-01 y M.E.C. (Proyecto de Cooperación con Iberoamérica).

Bibliografía

- Bolaños L. y col. *Plant Physiol.* 104: 85-90 (1994)
- Bolaños L. y col. *Plant Physiol.* 110: 1249-1256 (1996)
- Bonilla I. y col. *Plant Physiol.* 94: 1554-1560 (1990)
- Bonilla I. y col. *Plant Physiol.* 115: 1329-1340 (1997)
- García-González M. y col. *J. Exp. Bot.* 240: 925-929 (1991)
- Kleemann G. y col. *Protoplasma* 183: 107-115 (1994)
- Smith P.K. y col. *Anal. Biochem.* 150: 76-85 (1985)

CARACTERIZACIÓN DE *ACETOBACTER DIAZOTROPHICUS* EN CONDICIONES DE ESTRÉS

Tejera N. A¹., Ortega E²., Ocaña A¹. y Lluch C¹.

¹Dpto. Biología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada. 18071-Granada. natejera@goliat.ugr.es

²Dpto. Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de la Habana. Cuba.

En los últimos años se han encontrado numerosos diazotrofos (*Azoarcus*, *Acetobacter*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia* y *Azospirillum*) que colonizan gramíneas de distintos ecosistemas. El descubrimiento del *Acetobacter diazotrophicus*, endofito obligado en la caña de azúcar, por Cabalcante y Döbereiner en 1988, abrió un nuevo campo en el estudio de la Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN). Estudios con ¹⁵N y de balance de nitrógeno han revelado que este cultivo es capaz de obtener más del 60% de su nitrógeno (>150 kg. N. ha⁻¹.año⁻¹) proveniente de esta fijación biológica. Este microorganismo que no ha sido detectado en el suelo, es tolerante a pH bajos, así como, altas concentraciones de sacarosa (Boddey *et. al.*, 1991), no existiendo bibliografía que amplifique su comportamiento ante otras condiciones de cultivo. Por otra parte el cultivo de la caña de azúcar en suelos salinos provoca un incremento considerable en el nivel de cationes en el jugo extraído del tallo (Sarah *et. al.*, 1997).

En este trabajo se estudia la influencia de diferentes dosis de sal (NaCl) en el medio de cultivo, sobre el crecimiento y viabilidad del *A. diazotrophicus* (PAL-5), así como el comportamiento de algunas enzimas en dichas condiciones, creciendo la bacteria con amonio inorgánico (NH₄)₂SO₄ o con fijación de nitrógeno.

El análisis del crecimiento fue seguido por mediciones de D.O (560 nm) y del número de células viables (NCV) a las 24h de crecimiento, en agitación mecánica. El medio de crecimiento utilizado fue el LGI con dosis de sal de 0, 25, 75, 100, 150 y 200 mM. Los extractos para las determinaciones enzimáticas se prepararon según (Álvarez *et. al.*, 1995). El contenido de proteínas determinado por el método de Lowry.

El efecto de las diferentes dosis de sal en el crecimiento del *A. diazotrophicus* con dos concentraciones de sustrato carbonado (1 y 10%) de sacarosa, tanto en placa como en medio líquido, demostraron que el microorganismo es tolerante al NaCl, y que lo es más cuando crece en un medio con 10% de sacarosa, llegando a tolerar hasta 150 mM. Algunos resultados de la literatura plantean que esto puede interpretarse como una osmotolerancia de la bacteria (Reis, datos no publicados).

Las determinaciones enzimáticas (Tabla 1) se realizaron en cultivos crecidos con dosis de sal (0, 75, 150, 200 mM). Las enzimas analizadas sufrieron una reducción considerable con el estrés salino, fundamentalmente con las dosis de 150 y 200 mM, exceptuando la gluconato y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD) que incrementan su valor hasta 150 mM. Los valores altos de esta última evidencian la contribución de la vía de las pentosas fosfato (PP) al catabolismo de la glucosa 6 fosfato (Álvarez *et. al.*, 1995). Por otra parte la presencia de enzimas como la gluconato deshidrogenasa, pudieran desempeñar un importante papel en reciclar el NAD, además contribuir a la protección de la nitrogenasa, por los altos consumos de O₂ que implica la oxidación directa de estos sustratos (Álvarez *et. al.*, 1995).

Las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (ATC), isocitrato deshidrogenasa (ICDH), malato deshidrogenasa (MDH) y fumarasa, fueron detectadas en los distintos tratamientos. La presencia de estas dos últimas indica que la bacteria

puede metabolizar ácidos dicarboxílicos (ADC), aunque no sea capaz de crecer utilizando estos (Ureta *et. al.*, 1995). En este microorganismo el metabolismo de los ADC no parece tener un papel esencial en la fijación del nitrógeno como en el *Rhizobium* (Gardiol *et al.*, 1982). En todas las enzimas estudiadas no se presentan grandes diferencias en las condiciones de fijación o crecimiento en amonio, aunque sí una marcada influencia del estrés salino en la mayoría de estas.

Tabla 1. Actividades enzimáticas en cultivo de *Acetobacter diazotrophicus* PAL-5, crecido con diferentes dosis de NaCl en el medio de cultivo.

Actividad enzimática nmoles/min.mg prot.			
Enzima	Sal (mM)	Fijación	Amonio
Fumarasa	0	348.39 a	243.44 e
	75	122.84 b	186.76 f
	150	78.93 c	78.85 c
	200	41.63 d	64.95 dc
ICDH	0	142.74 a	130.62 a
	75	132.87 a	133.93 a
	150	56.60 b	51.59 b
	200	56.60 b	52.00 b
MDH	0	7.96 a	5.98 d
	75	2.32 b	2.60 b
	150	2.73 b	0.60 c
	200	0.79 c	0.77 c
Glucosa deshidrog.	0	185.38 a	205.42 a
	75	80.73 b	307.54 e
	150	43.35 c	76.83b
	200	25.60 d	51.50 c
Gluconato deshidrog.	0	60.76 a	62.97 a
	75	91.05 b	66.08 a
	150	101.90 c	75.61 d
	200	62.43 a	64.27 a
6PGD	0	636.34 a	642.62 a
	75	743.96 b	671.89 ab
	150	977.06 c	965.99 c
	200	474.44 d	739.69 b
Alcohol deshidrog.	0	175.86 a	154.70 a
	75	123.64 b	76.65 ec
	150	78.22 c	52.60 fd
	200	41.17 d	68.50 ef

Referencias

- Álvarez B. *et. al.*, 1995. *Can. J. Microbiol.* 14, 918-924.
 Boddey R. M. *et. al.*, 1991. *Plant and Soil* 137, 111-117.
 Gardiol A. *et. al.*, 1982. *J. Bacteriol.* 151, 1621-1623.
 Sarah E. L. *et. al.*, 1997. *Field Crops Research* 54, 259-268.
 Ureta A. *et. al.*, 1995. *Plant and Soil* 172, 271-277.

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos INCO-950717(Contract Number ERBIC18CT960081) y PB95-1159 de la DGICYT.

PRODUCCIÓN DE INDOL-3-ACÉTICO A PARTIR DE INDOL-3-ACETONITRILLO: UNA NUEVA VÍA PARA LA SÍNTESIS DE AIA EN *BRADYRHIZOBIUM*

Vega Hernández M.C., León Barrios M., Jarabo Lorenzo A. y Pérez Galdona R.M.

Departamento de Microbiología y Biología Celular. Facultad de Farmacia. Universidad de La Laguna. 38071 La Laguna. Tenerife. marco@ull.es

Desde la propuesta hecha por Thimann (1) atribuyendo una papel a las auxinas en el desarrollo de los nódulos radicales hasta la actualidad, no ha podido ser establecida una función clara para las fitohormonas en el proceso simbiótico. Por otro lado, son numerosos los trabajos llevados a cabo desde entonces, con el fin de esclarecer cómo tiene lugar la producción de ácido indol-3-acético (AIA) en bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. Sin embargo, pese al tiempo transcurrido, la situación está todavía lejos de poder ser aclarada.

Un diverso grupo de bacterias son capaces de sintetizar AIA; entre ellas se encuentran, numerosas bacterias del suelo, epifitas y colonizadoras de tejidos vegetales. En efecto, se estima que aproximadamente un 80% de las bacterias de la rizosfera son productoras de esta auxina. Las vías de biosíntesis más ampliamente encontradas son la de la indol-3-acetamida (IAM), o vía de la monooxigenasa, y la vía del ácido indol-3-pirúvico (AIP), cuyo primer paso es catalizado por aromático aminotransferasas. Otras vías hasta ahora de menor importancia en cuanto a su distribución, son la de la oxidasa de la cadena lateral del triptófano, la de la triptamina (TAM), la del indol-3-acetonitrilo (IAN) y la vía independiente de triptófano.

Pensamos que al no haberse detectado actividad monooxigenasa, ni localizado el gen que codifica para esta enzima en *Bradyrhizobium japonicum*, la presencia de IAM en los sobrenadantes de los cultivos sugiere la producción de este compuesto por la vía del IAN, mediante la acción de una nitrilo hidratasa. Este parece ser también el caso de nuestras bacterias, ya que no hemos detectado actividad triptófano-monooxigenasa medida siguiendo el consumo de O₂ en un electrodo de oxígeno, ni presencia de indoles por reacción de Salkowsky en la mezcla de reacción, ni IAM por HPLC. Para abordar esta hipótesis hemos procedido a la búsqueda de la ruta del IAN en dos cepas de *Bradyrhizobium (Chamaecytisus)* BTA-1 y BGA-1 y en las cepas de *Bradyrhizobium japonicum* USDA-110 y USDA-76.

El estudio de la denominada ruta del IAN implica en realidad la detección de dos vías. En efecto, la producción de AIA a partir del IAN puede ser llevada a cabo por la acción directa de una nitrilasa o mediante la acción conjunta de una nitrilo hidratasa que produce IAM, y una amidasa que la hidroliza a AIA. Bacterias de los géneros *Klebsiella*, *Rhodococcus* y *Alcaligenes*, transforman el IAN en AIA por la acción de una nitrilasa y *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Rhodococcus* convierten el IAN en AIA mediante la acción de una nitrilo hidratasa y una amidasa (2). Sin embargo, hasta ahora, nunca se ha descrito actividad nitrilasa ni nitrilo hidratasa en bacterias del género *Bradyrhizobium*.

La actividad nitrilo hidratasa fue ensayada según el método descrito por Kobayashi (3). Los indoles fueron extraídos de mezclas de reacción, acidificadas (pH 3) y alcalinizadas (pH 8), con acetato de etilo. Las muestras llevadas a sequedad fueron resuspendidas en metanol y analizadas por cromatografía en capa fina, o resuspendidas en acetonitrilo:agua (1:1) y sometidas a análisis por HPLC. Estos análisis revelaron la presencia de cantidades significativas de AIA en las cepas de *Bradyrhizobium (Chamaecytisus)* BTA-1 y BGA-1 y en la cepa USDA 76 de *Bradyrhizobium japonicum*, pero no en USDA 110. Además se detectaron pequeñas cantidades de IAM por HPLC en las dos primeras. Dado que los bajos niveles de IAM detectada no pueden explicar las cantidades de AIA producidas, éstas pueden ser atribuidas a la presencia de una actividad nitrilasa en estas cepas, más que a la acción de una nitrilo hidratasa.

Sin embargo, esta última actividad debe estar presente, como lo pone de manifiesto la IAM detectada. Ahora bien, hemos de tener en cuenta que la nitrilo hidratasa es una enzima muy lábil y que además se expresa a niveles muy bajos en ausencia de inductor. Aunque en bacterias como *Rhodococcus rhodochrous* un incremento en la actividad de la misma puede obtenerse cuando son cultivadas en presencia de compuestos como el γ -caprolactamo o la crotonamida, análogos del producto de la reacción que cataliza, estos compuestos pueden ejercer efectos contrarios dependiendo de la cepa, ocasionando la activación de la nitrilo hidratasa y la inhibición de la amidasa en algunos casos y el efecto contrario en otros (3). Por esta razón, pensamos que aunque parece clara la presencia de la nitrilo hidratasa en nuestras bacterias, no hemos encontrado las condiciones idóneas para conseguir la inducción de mayores niveles de actividad.

Bibliografía

- (1) Thimann, K. V. (1936). On the physiology of the formation of nodules on legume roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. Wash.* **22**: 511-514.
- (2) Patten, C. L. and Glik, B. R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* **42**: 207-220.
- (3) Kobayashi, M., Suzuki, T., Fujita, T., Masuda, M. and Shimizu, S. (1995). Occurrence of enzymes involved in biosynthesis of indole-3-acetic acid from indole-3-acetonitrile in plant-associated bacteria, *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **92**:714-718.

REVERSIBILIDAD DE LA TOXICIDAD DE IMAZETHAPYR SOBRE *RHIZOBIUM*

Hualde I. y Royuela M.

Dpto. Ciencias del Medio Natural, Univ. Pública de Navarra, 31006 Pamplona.
royuela@upna.es

Introducción

El herbicida imazethapyr es una imidazolinona selectiva utilizada para controlar un amplio espectro de malas hierbas, mono y dicotilédoneas, en el cultivo de algunas leguminosas, entre ellas el guisante. El mecanismo de acción de este herbicida es la inhibición de la actividad del enzima acetolactato sintasa (ALS), funcional tanto en plantas como en microorganismos y que participa en la ruta metabólica de síntesis de tres aminoácidos esenciales: valina, leucina e isoleucina.

El herbicida imazethapyr puede ser utilizado de forma selectiva en el cultivo de leguminosas, siendo la razón de su selectividad la degradación metabólica del herbicida a compuestos no tóxicos. Su efecto sobre microorganismos es poco conocido. En trabajos recientes se ha mostrado que algunas especies de *Rhizobium* son tolerantes a altas dosis de imazethapyr. Sin embargo en estudios preliminares se observaron distintas respuestas en el crecimiento del microorganismo según el pH del medio. Concretamente, a pH 5 se observó un efecto tóxico del herbicida sobre el microorganismo en dosis de 50 a 100 mg l⁻¹, toxicidad que no se observó a pH 6 y 7.

Por otro lado, también se observó una mayor toxicidad del herbicida cuando se aplicó en su formulación comercial que cuando se aplicó como producto técnico. Este efecto puede estar relacionado con la mayor absorción celular debida a los adyuvantes de la formulación comercial, o bien con la toxicidad intrínseca del producto.

Una de las principales pruebas que clásicamente se utiliza en el estudio del mecanismo de acción de un herbicida es la reversibilidad del efecto tóxico por adición de los metabolitos cuya síntesis es inhibida.

El objetivo de este trabajo es estudiar la posible reversibilidad de la inhibición de crecimiento de *R. leguminosarum* provocada por imazethapyr, mediante la adición al medio de los tres aminoácidos cuya síntesis es inhibida (valina, leucina e isoleucina.). Los aminoácidos se añadieron juntos, en combinaciones de dos e individualmente.

Materiales y Métodos

Rhizobium leguminosarum biovar. *viciae* se creció en cultivo puro utilizando un medio mínimo o definido M&W (Manhart y Wong, 1979) esterilizado y a pH 5 (es decir, en las condiciones en las que el efecto inhibitorio es mayor y en las cuales se pretendía estudiar la reversibilidad) El imazethapyr se aplicó al medio como herbicida técnico (ingrediente activo al 99%) en concentración de 200 mg l⁻¹ o comercial (ingrediente activo al 10%) en concentración de 50 mg l⁻¹. Todas las indicaciones de concentración hacen referencia a la concentración del ingrediente activo. Los aminoácidos se añadieron a los medios juntos, en combinaciones de dos e individualmente en una concentración de 0,05 mM para cada uno de ellos. Los medios se inocularon con 1 ml de suspensión bacteriana (aproximadamente 10⁸ células) y se incubaron a 26°C con una agitación de 180 rpm hasta que los controles alcanzaran la fase estacionaria de crecimiento. En cada uno de los trabajos efectuados

se realizaron 3 réplicas por tratamiento y el estudio fue repetido en tres experimentos independientes.

Resultados y Discusión

El herbicida se utilizó tanto en su formulación técnica como comercial en concentraciones de 200 y de 50 mg l⁻¹ respectivamente, puesto que la inhibición que producen estas dos dosis en *Rhizobium* son comparables.

La adición a los medios de los tres aminoácidos juntos no revirtió en absoluto el efecto inhibitorio provocado por el herbicida imazethapyr cuando éste fue aplicado en su formulación comercial (50 mg l⁻¹). Sin embargo, el efecto tóxico del producto técnico (200 mg l⁻¹) fue revertido en parte, especialmente a partir de las 96 horas de crecimiento, pudiéndose prever que en tiempos mayores de crecimiento del cultivo se alcanzara el mismo crecimiento que los controles.

Para determinar en qué grado contribuía cada uno de los tres aminoácidos al efecto de reversión del efecto inhibitorio del herbicida, éstos se añadieron por parejas en las tres combinaciones posibles, e individualmente. Puesto que el efecto inhibitorio del herbicida cuando éste se añadió en su formulación comercial no fue revertido en absoluto por adición de los tres aminoácidos juntos en el estudio anterior, los estudios de reversibilidad a partir de aquí se realizaron únicamente con aplicaciones de imazethapyr en su formulación técnica.

La adición a los medios de valina y leucina no revirtió en absoluto el efecto tóxico del herbicida. La adición de valina e isoleucina revirtió en parte la toxicidad entre las 96 y las 180 horas de crecimiento. Sin embargo, la mayor reversión se produjo en la aplicación de leucina e isoleucina, que revirtió de manera importante el efecto inhibitorio del herbicida, alcanzándose un nivel de reversión cercano a cuando se añaden los tres aminoácidos juntos. Esto permite establecer que la leucina y la isoleucina son los dos aminoácidos principales en la reversión.

En cuanto a la adición a los medios de los aminoácidos individualmente, se observó que mientras que la valina no producía reversión alguna, las adiciones de leucina e isoleucina revertían en mayor o menor grado la toxicidad del herbicida, confirmando los resultados de los estudios con aplicaciones de parejas de aminoácidos. La leucina revirtió en parte dicha toxicidad, entre las 96 y las 170 horas de crecimiento. La isoleucina provocó una muy importante recuperación de los cultivos que crecían en presencia de imazethapyr, mostrándose como el aminoácido más importante en las reversiones.

Estos resultados muestran que la reversibilidad del efecto inhibitorio sólo se produce cuando el imazethapyr se aplica como producto técnico, pero no cuando se aplica como producto comercial, al menos en las concentraciones a las que las dos formulaciones han sido utilizadas en este estudio (200 y 50 mg l⁻¹ respectivamente). El distinto comportamiento de ambas formulaciones puede ser atribuido a que la presencia de adyuvantes en la formulación comercial facilita la absorción del herbicida por el microorganismo. Sin embargo este trabajo ha sido realizado con distintas concentraciones de ambas formulaciones para poder comparar las que producen una inhibición similar. Así, el hecho de que el efecto tóxico del herbicida sólo pueda ser revertido por los aminoácidos cuando se usa la formulación técnica puede ser indicativo de un efecto tóxico de estos adyuvantes, adicional al propio efecto herbicida.

La mayor reversión de la toxicidad del herbicida (en formulación técnica) se produce cuando los tres aminoácidos se añaden juntos (en concentración 0,05 mM cada uno). En cuanto al nivel de contribución de cada uno de los aminoácidos en dicha reversión, el más importante es la isoleucina, seguido de la leucina y de la valina, que no produce reversión alguna en el efecto tóxico del herbicida.

RELACIÓN ENTRE ENZIMAS ANTIOXIDANTES, LIPOOXIGENASA Y ÁCIDO SALICÍLICO DURANTE LAS PRIMERAS ETAPAS DE LA INTERACCIÓN *RHIZOBIUM-LEGUMINOSA*

Bueno P.², Herrera-Cervera J.A.¹, Rodríguez-Rosales P²., Sanjuan J¹., Olivares J¹.
Donaire J.P².

1. Dpto. Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos.
2. Dpto. Bioquímica Molecular y Celular de Plantas. Estación Experimental del Zaidín. CSIC. Granada

Todas las plantas parecen responder de la misma forma cuando interaccionan con otros organismos. Sin embargo, en el caso de las asociaciones mutualistas los mecanismos de defensa deben de ser controlados para que llegue a establecerse la simbiosis sin rechazo del microsimbionte. El intercambio de señales conduce en este caso a la formación de los nodulos fijadores.

Se conoce poco de las bases de este comportamiento que se sale de la regla general. El establecimiento de la simbiosis mutualista *Rhizobium*-leguminosa requiere que la bacteria no induzca la reacción defensiva de la planta, bien porque se neutralicen los receptores del hospedador o porque la bacteria se enmascare de forma que pase desapercibida para dichos receptores. Los exopolisacáridos y/o lipopolisacáridos han sido considerados por mucho tiempo los principales candidatos implicados en ese control. Sin embargo, independientemente de que estos compuestos tengan algo que ver, nosotros hemos encontrado y descrito (Martínez-Abarca et al. 1998) que los factores Nod son determinantes en el control de la respuesta defensiva de la planta. Este control se ha detectado como la inhibición de la acumulación de ácido salicílico (SA) que siempre aparece en la interacción incompatible patógeno-planta y que da lugar a la resistencia sistémica adquirida (SAR). Se ha observado que en ausencia del factor Nod correspondiente, utilizando un mutante *nodC*, acumulan SA, mientras que con la parental silvestre se mantienen los niveles basales.

Hay muchos modelos, todavía sin concretar ninguno, que describen la relación posible entre SA y la producción de especies de oxígeno activado. Se ha sugerido que el SA podría conducir a la respuesta defensiva por inhibición de la catalasa con la correspondiente acumulación de H₂O₂. Hoy parece más claro que este producto, derivado de la activación de la señal correspondiente, determina la síntesis de SA. En cualquier caso, esta prevista acumulación de SA en la interacción incompatible nos ha llevado a estudiar el comportamiento de una serie de actividades enzimáticas relacionadas con el incremento de los niveles de oxidación: catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR) y superóxido dismutasa (SOD). Paralelamente, se ha visto interesante el estudio de la lipoxigenasa (LOX), descrita en diferentes patosistemas (Croft et al. 1990). Esta enzima lleva a la formación de ácido

jasmónico (JA) que se ha propuesto como un mediador en la respuesta defensiva al ataque de patógenos.

Los valores obtenidos de las medidas de estas actividades enzimáticas a tiempo 0, 4, 8, 12 y 24 h después de la inoculación, han mostrado las diferencias existentes entre la relación *Rhizobium*-leguminosa compatible e incompatible.

De estas actividades, el comportamiento de la LOX es interesante en el sentido de que puede representar un mecanismo de defensa adicional al derivado de la acumulación de SA. Todavía está por demostrar si a esa alta actividad LOX que aparece en la intracción compatible, donde no debería haber respuesta defensiva, corresponde un nivel de JA alto, o tal actividad va dirigida a la oxidación de los ácidos grasos insaturados para otros menesteres.

Martínez-Abarca et al. 1998. Mol. Plant-Microbe Interact. **11**, 153-155.

**PAPEL DEL TRANSPORTE DE OLIGOPEPTIDOS EN LA SIMBIOSIS
RHIZOBIUM MELILOTI-AFALFA**

Nogales J., Muñoz S., Olivares J. y Sanjuan J.

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín-CSIC. Prof. Albareda 1, 18008 Granada.

Las bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* y *Sinorhizobium* establecen simbiosis fijadoras de nitrógeno con plantas leguminosas, cuya expresión está representada por los nódulos radicales. El nódulo fijador de nitrógeno es un nuevo órgano vegetal, cuya formación es inducida por la bacteria y en cuyo interior ésta se diferencia en una forma celular, el bacteroide, especializada en la reducción de dinitrógeno hasta amonio y en su excreción hacia las células vegetales. La formación de bacteroides implica la previa endocitosis de las bacterias por células del nódulo, quedando englobadas en sacos membranosos denominados simbiosomas. Tras esta endocitosis ocurre la diferenciación de bacteria en bacteroide, que implica la detención de la división de las bacterias, cambios en la composición y estructura de la pared celular, así como la puesta en marcha de toda la maquinaria metabólica necesaria para la reducción del dinitrógeno atmosférico hasta amonio. Se cree que estos cambios están inducidos, no sólo por el ambiente microaeróbico que rodea a la bacteria, sino también por señales producidas por la planta hospedadora.

Una característica del bacteroide es que su pared celular cambia respecto a la bacteria en vida libre (1). Sin embargo, para mantener la integridad del bacteroide, la síntesis de peptidoglucano debe continuar, lo cual implica síntesis de novo de sus componentes, además del reciclaje de oligomuropéptidos, que son reincorporados de nuevo a la pared celular. El reciclaje de estos oligopéptidos es importante, pues bajo ciertas condiciones de estrés, puede prevenir la lisis celular. El transporte de oligomuropéptidos hacia el citoplasma para su reutilización en la síntesis del mucopéptido requiere la funcionalidad del operón *opp* (oligopéptido permeasa), que además es necesario para el transporte de péptidos nutricionales de entre 3-5 aminoácidos (2). El sistema *opp* ha sido caracterizado en diversas especies bacterianas, entre ellas en *B. subtilis*, en la que el sistema *Opp* es también necesario para la adquisición de competencia y el inicio del proceso de esporulación (3), un proceso de diferenciación celular que, como en el caso de los bacteroides de *Rhizobium*, implica la previa detención de la división celular.

Con el objetivo de determinar su posible papel en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, se ha llevado a cabo este estudio dirigido a la caracterización de sistemas de transporte de oligopéptidos en *R. meliloti*. Para ello, se obtuvieron derivados de la cepa GR4 resistentes al tripéptido bialafos, inhibidor de la glutamina sintetasa. Todos los mutantes tenían alterada la capacidad de utilizar los tetrapéptidos 4-Ala, 4-Gly, además de los tripéptidos 3-Ala y 3-Leu, como única fuente de nitrógeno, si bien crecían normalmente a expensas de los correspondientes aminoácidos simples, en

otros tripéptidos tales como Ala-Gly-Gly, 3-Gly o Gly-Gly-Ala, o en dipéptidos como 2-Ala o 2-Gly. Esto indicaba que tales mutantes posiblemente estaban alterados en el transporte de tetrapéptidos y ciertos tripéptidos. Se comprobó que los mutantes obtenidos mapeaban en dos operones diferentes: uno correspondiente al operón *opp*, y otro que incluye un gen homólogo a un tipo de reguladores transcripcionales. Se pudo determinar además que los genes *opp* identificados se localizan en el megaplásmido simbiótico 2 de *R. meliloti*. Sin embargo, todos los mutantes poseen propiedades simbióticas similares a la cepa silvestre, lo cual indica que estos genes no son esenciales para la simbiosis. Los mutantes *opp* obtenidos mantienen, sin embargo, cierta capacidad de crecimiento en tetrapéptidos que se manifiesta exclusivamente en medio sólido y cuando las placas son incubadas por periodos prolongados. Esto sugiere que existe un segundo sistema *opp* en *R. meliloti*, o bien que tales tetrapéptidos pueden ser transportados de manera ineficiente por otro sistema de transporte distinto a *Opp*. Hasta ahora, todos los intentos de identificar una u otra posibilidad han sido infructuosos. La generación de dobles mutantes incapaces de crecer en medio sólido con tetrapéptidos como fuente nitrogenada ha llevado a la obtención de diversas mutaciones que mapean en genes no relacionados con el transporte de oligopéptidos. Así mismo, se ha intentado generar mutantes en la tripéptido permeasa de esta bacteria, pero todos los mutantes aislados hasta el momento están así mismo alterados en genes que nada tienen que ver con sistemas de transporte. Todos estos resultados indican que el transporte de oligopéptidos en *R. meliloti* puede ser más complejo que en otras especies bacterianas.

1. Vance, C.P. 1983. *Ann. Rev. Microbiol.* 37:399-424.
2. Goodell, E.W. and C.F. Higgins. 1987. *J. Bacteriol.* 169: 3861-3865.
3. Perego, M., et al. 1991. *Mol. Microbiol.* 4: 2019-2025.

Trabajo realizado con apoyo del proyecto PB95-0083 de la DGICYT.

INTERACCIÓN B/CA EN EL MANTENIMIENTO DE LA INTEGRIDAD ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE NÓDULOS DE LEGUMINOSAS

Bolaños L. y Bonilla I.

Dpto. Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid. 28049 - Madrid. luis.bolarios@uam.es

Introducción

La interacción entre B y Ca ha sido sugerida en numerosos estudios de nutrición mineral de plantas. Así, los niveles de ambos nutrientes aparecen normalmente correlacionados de manera inversa (Bowen 1981). De este modo, se ha mostrado cómo la concentración de uno de ellos determina un mayor o menor requerimiento del otro para la planta (Ramón y col. 1990; Teasdale y Richards 1990).

Nuestro equipo analizó una interacción B/Ca en cianobacterias, observando que, tanto un suplemento de de Ca a cultivos deficientes en B (Bolaños y col. 1993), como una adición extra de B a cultivos deficientes en Ca (Bonilla y col. 1996), tenían efectos recuperadores de aquellos que la deficiencia en estudio causa, tanto a nivel de células vegetativas y fotosíntesis, como sobre la estructura y funcionalidad de los heterocistos fijadores de N₂.

Durante los últimos años hemos venido investigando las alteraciones que provoca la deficiencia de B sobre el desarrollo de nódulos de leguminosas, tanto sobre su morfogénesis (Bolaños y col. 1994; Bonilla y col. 1997a), como sobre el desarrollo de la interacción planta-*Rhizobium* (Bolaños y col. 1996).

Una vez estudiados estos aspectos, presentamos ahora los datos preliminares que muestran una recuperación parcial, por suplemento de Ca, de nódulos de guisante deficientes en B, y que sugieren una interacción y actuación sinérgica de ambos nutrientes, también durante el establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas.

Resultados y Discusión

Plantas de guisante crecidas en presencia (0.1 ppm) o ausencia de B y con una concentración normal (0.68 mM) de Ca en el medio de cultivo o con un suplemento del doble de este nutriente (1.36 mM), se inocularon con *R. leguminosarum* 3841. Se hizo un recuento y tara de nódulos, así como una determinación de actividad reductora de acetileno (ARA) a las 2 y 3 semanas después de inocular. Se estudió también al microscopio óptico la estructura de nódulos con 3 semanas de desarrollo, período de máxima actividad fijadora para nódulos de guisante.

En principio, es destacable que la concentración doble de Ca produjo efectos negativos sobre el desarrollo y funcionalidad de nódulos de plantas crecidas sin deficiencia de B, con una disminución de aproximadamente un 30% del número de nódulos y del 60 % del peso de los mismos. Por su parte, la ARA cayó también en un 60% respecto a nódulos de plantas crecidas con concentraciones normales de B y Ca.

Sin embargo, esta concentración “tóxica” de Ca resultó reparadora en parte de los efectos producidos por la deficiencia de B. Así, el número de nódulos, que viene a

ser la mitad en plantas de guisante deficientes en B (Bolaños y col. 1994), llegó incluso a ser mayor que en plantas control si se las suplementaba con Ca, y el peso de los mismos pasó de un 30 % respecto al control a un 50% en los deficientes en B pero con doble concentración de Ca. La actividad nitrogenásica, disminuida en un 70% en nódulos deficientes en B, subió también hasta el 50%.

El análisis estructural de los nódulos parece explicar, al menos en parte, estos efectos encontrados en nódulos deficientes en B y suplementados con Ca. La gran desorganización de membranas y, sobre todo, paredes encontrada en deficiencia de B (Bolaños y col. 1994; Bonilla y col. 1997a, b), es reparada parcialmente por la adición extra de Ca.

Uno de los efectos más drásticos de la deficiencia de B en nódulos es la pérdida de pectinas ancladas en la pared de las células de los mismos (Bonilla y col. 1997b), con la consiguiente destrucción de la barrera cortical contra la difusión de O₂ y la desorganización de los tejidos internos del nódulo. Estudios realizados a nivel de pared indican una acción sinérgica de B y Ca, de forma que la asociación de ambos con la fracción hemicelulósica y pectínica de la pared es la encargada de mantener su integridad (Yamauchi y col. 1986; Goldbach 1997). Es posible, por tanto, a la vista de las observaciones descritas, que el suplemento de Ca se asocie principalmente a estas fracciones de pared, manteniendo el anclaje de las mismas perdido en deficiencia de B, conservando así parcialmente la integridad de los tejidos nodulares, especialmente el córtex, con lo que, al menos en parte, se conserva funcional la barrera de difusión de oxígeno, lo que explicaría la menor inhibición de la actividad nitrogenásica en estos nódulos deficientes en B y suplementados con Ca.

Este trabajo ha sido financiado por D.G.I.C.Y.T. nº PB95-0217-CO2-01.

Bibliografía

- Bolaños L. y col. *J. Plant Physiol.* 142: 513-517 (1993)
- Bolaños L. y col. *Plant Physiol.* 104: 85-90 (1994)
- Bolaños L. y col. *Plant Physiol.* 110: 1249-1256 (1996)
- Bonilla I. y col. *Physiol. Plant.* 94: 31-36 (1995)
- Bonilla I. y col. *Plant Physiol.* 115: 1329-1340 (1997a)
- Bonilla I. y col. *En Boron in Soils and Plants*, 213-220 (1997b)
- Bowen, J.E. *En Trop. Agric.* 58, 215-220 (1981)
- Goldbach, H.E. *J. Trace and Microprobe Techniques* 15: 51-97 (1997)
- Ramón A.M. y col. *En Plant Nutrition Physiology and Applications*, 287-290 (1990)
- Teasdale R.D. y Richards D.K. *Plant Physiol.* 93: 1071-1077 (1990)
- Yamauchi T. y col. *Plant Cell Physiol.* 27: 729-732 (1986)

¿EXISTE ATPASA EN LA MEMBRANA PERIBACTEROIDEA?

Santamaría M.^a, Gutiérrez-Navarro A.M.^b y Corzo J.^a

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular^a, y Departamento de Microbiología y Biología Celular^b, Universidad de La Laguna, 38206 Tenerife. msantam@ull.es

La ATPasa bombreadora de protones es una enzima cuya presencia ha sido descrita en simbiosomas de soja [1,2], altramuz [3] y guisante [4]; se ha adscrito a la clase P de ATPasas, basándose en su comportamiento frente a inhibidores, dependencia del pH y reacción inmunológica cruzada con la P-ATPasa de la membrana plasmática de plantas. Dado que la ATPasa de la membrana plasmática es la responsable de la creación del μH^+ empleado por los procesos de transporte activo secundario, se ha propuesto un papel similar para la presunta PBM ATPasa. Así, el gradiente de protones creado por la PBM ATPasa se emplearía como fuente de energía para el transporte de dicarboxilatos desde el citosol al espacio peribacteroideo, y de amonio en sentido opuesto [5,6,7]. Sin embargo, esta posible función de la PBM ATPasa, aunque conceptualmente atractiva, carece de soporte experimental. Otra función propuesta (pero tampoco probada) para la PBM ATPasa es la de acoplar la carga energética del bacteroide y del citoplasma de la célula vegetal [8]. Ahora bien, en lo que sí ha habido general consenso ha sido en la presencia de dicha ATPasa en la PBM. Sin embargo, Campos *et al.* [9] cuestionaron la existencia de esta enzima en las PBM de nódulos de *Phaseolus*, basándose en la falta de expresión del gen de la ATPasa BHA1 en las células infectadas, y en la falta de inmunorreactividad de los simbiosomas frente a un anticuerpo dirigido contra la P-ATPasa. Estos resultados, junto con los muy bajos niveles de actividad específica de la PBM ATPasa que se han publicado, plantean la cuestión de si la presunta PBM ATPasa no es en realidad más que el resultado de la contaminación de los simbiosomas con otras membranas del nódulo. Dado nuestro interés por el estudio de las relaciones metabólicas entre la célula infectada y el bacteroide, hemos tratado de aclarar la presencia de esta enzima en los simbiosomas de nódulos de soja.

Valoración de la actividad ATPasa en la membrana peribacteroidea

El principal problema metodológico de este trabajo consiste en evitar la contaminación de las PBM por otras fracciones de membrana en las que pudiera encontrarse la enzima. Para evitarlo en lo posible, en vez de aislar directamente la PBM del homogeneizado total, purificamos inicialmente los simbiosomas mediante centrifugación en gradiente de Percoll, según lo descrito en [2]. Tras sucesivos lavados, aislamos a partir de ellos las membranas peribacteroideas por ultracentrifugación. Se usaron la membrana plasmática y tonoplastos de hojas como controles positivos de las ATPasas P y V, respectivamente; la fracción mitocondrial de los nódulos se empleó como control positivo de la ATPasa F. Para evitar errores sistemáticos debidos al método de detección de la actividad ATPasa se valoró su actividad tanto mediante la cuantificación del fosfato producido a partir del ATP, como por la valoración enzimática del ADP. En todas aquellas membranas en las que no existen dudas sobre la presencia de P-ATPasa fuimos capaces de detectarla, así como en la fracción "mitocondrial" cruda (en la que se encuentran por microscopía electrónica restos de membranas no identificadas). Sin embargo, tanto en los simbiosomas totales como en las membranas obtenidas a partir de ellos, no se encontró actividad que pudiera ser adscrita inequívocamente a una P-ATPasa; la baja actividad ATPasa

encontrada podría ser debida a contaminación por ATPasa de tipo F, ya que resultó completamente inhibida por oligomicina. Tampoco se encontró actividad V-ATPasa sensible a nitrato o a bafilomina, aunque sí se detectó en la fracción de tonoplastos de hoja. Ahora bien, hemos encontrado actividad ATPasa sensible a vanadato (50% inhibición aprox. en presencia de vanadato 0,4 mM) en la fracción “microsomal” de los nódulos, siendo mayor esta actividad a pH 6,5 que a pH 7,4. Podemos concluir que esta actividad corresponde a la P-ATPasa presente una fracción no simbiosomal de los nódulos, tal vez en las membranas celulares de las células no infectadas, tal como fue inmunodetectada por Campos *et al.*

Detección inmunológica de la ATPasa

Se empleó el anticuerpo policlonal AHA3, cedido amablemente por el Dr. R.Serrano (Instituto de Biología Molecular y Celular de plantas, Valencia) dirigido frente al dominio C-terminal de la H⁺-ATPasa de *Arabidopsis thaliana*, capaz de reconocer ATPasas de diferentes tipos de plantas incluyendo judía. Este anticuerpo produjo reacción positiva frente a homogeneizados de raíz de plántula de soja y en la fracción microsomal de nódulos de soja; en la fracción mitocondrial cruda y en una fracción compuesta por simbiosomas, restos mitocondriales y membranas no identificadas (ambas de nódulos) produjo una señal menor. Las fracciones simbiosomal y de PBM produjeron la misma señal que los controles negativos, revelados con suero preinmune. Por consiguiente, los resultados inmunológicos coincidieron con las medidas de actividad ATPasa.

Discusión

Evidentemente, la ausencia de evidencia no implica evidencia de la ausencia. Además, y dado que hemos empleado el mismo anticuerpo que usaron Campos *et al.*, cabe la posibilidad de que la PBM ATPasa, aunque cinética y mecanísticamente sea del tipo P, estructuralmente fuera tan diferente a las restantes ATPasas vegetales que no la reconociera el anticuerpo empleado. Sin embargo, los datos de actividad parecen indicar que tal actividad ATPasa, si existe, es muy baja, del orden de 1 nmol ATP hidrolizado por minuto y por mg de proteína. Ciertamente podemos haber cometido algún tipo de error en la valoración de la actividad ATPasa, aunque teniendo en cuenta que se valoraron simultáneamente todas las fracciones por dos métodos diferentes, y que se detectó en una fracción no simbiosomal de los nódulos, un error de este tipo parece poco probable. Es posible que exista una actividad que, aunque muy baja, fuese suficiente para energizar la PBM y permitir la realización de procesos de transporte activo, pero en cualquier caso estos resultados cuestionan el modelo comúnmente aceptado del papel de la PBM como mediadora entre la planta y el bacteroide.

1 Blumwald, E., Fortin, M.G., Rea, P.A., Verma, D.P.S. y Poole, R.J. (1985) *Plant Physiol.* 78: 665. 2 Udvardi, M.K. y Day, D.A. (1989) *Plant Physiol.* (1989) 90:982. 3 Domingan, N.M., Farden, K.J.F., Robertson, J.G. y Monk, B.C. (1988) *Arch. Biochem. Biophys.* 264:564. 4 Szafran, M.M. y Haaker, H., (1995) *Plant Physiol.* 108:1227. 5 Streeter, J.G. (1995) *J. Theoret. Biol.* 174:441. 6 Udvardi, M.K. y Day, D.A. (1997) *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 48:493. 7 Whitehead & Day, D.A.(1997), *Physiol. Plantarum*, 100: 1. 8 Corzo, J., Santamaría, M. y Gutiérrez-Navarro, A.M., (1997) *Biosci. Rep.* 17:389. 9 Campos, F., Pérez-Castiñeira, J.R., Villalba, J.M., Culiáñez –Marcía, F.A., Sánchez, F. y Serrano, R. (1996), 32:1043.

DETERMINACIÓN ESPECÍFICA DEL TRIPÉPTIDO GLUTATIÓN EN NÓDULOS DE LEGUMINOSAS

Matamoros M.A., Iturbe-Ormaetxe I. y Becana M.

Dpto. Nutrición Vegetal, Estación Experimental de Aula Dei, Apdo. 202, 50080 Zaragoza. manumat@ead.csic.es

Introducción

El radical superóxido y el peróxido de hidrógeno se producen inevitablemente en los diferentes compartimentos celulares. Estas moléculas pueden reaccionar con los componentes de la maquinaria celular, dañándolos y produciendo disfunciones metabólicas irreparables que en último término provocan la muerte celular. Las células vegetales poseen, sin embargo, una gran variedad de defensas antioxidantes, que incluyen enzimas (ciclo ascorbato-glutatión, superóxido dismutasa, catalasa) y metabolitos (ascorbato, glutatión), que destruyen los radicales libres y peróxidos (2). En particular, el tripéptido glutatión (Glu-Cys-Gly; GSH) es un potente antioxidante, pero también puede realizar otras funciones de relevancia, tales como la protección frente a herbicidas, el transporte de azufre orgánico desde los lugares de síntesis a otras zonas de la planta y la regulación de la expresión génica en condiciones de estrés (1).

La determinación de GSH en tejidos vegetales puede realizarse por técnicas de amplificación enzimática o por HPLC. En nuestro laboratorio utilizamos habitualmente la técnica enzimática (con glutatión reductasa de levadura), pues posee gran precisión y permite determinar la proporción de tioles reducidos y oxidados. No obstante, la glutatión reductasa no distingue entre el GSH y el homoglutiación (Glu-Cys-Ala). Puesto que este tripéptido está presente en algunos tejidos de leguminosas (6), hemos desarrollado una técnica para cuantificar específicamente GSH en nódulos, hojas y raíces de varias leguminosas de interés agronómico y determinar así la importancia relativa del GSH en los nódulos.

Materiales y métodos

Las plantas de guisante (*Pisum sativum* L. cv. Lincoln x *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* NLV8), lupino (*Lupinus albus* L. cv Multolupa x *Bradyrhizobium* sp. ISLU16), judía (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Contender x *R. leguminosarum* bv *phaseoli* 3622), soja (*Glycine max* Merr. cv Williams x *B. japonicum* USDA 110) y "cowpea" (*Vigna unguiculata* Walp cv. California blackeye x *B. sp.* 32H1) crecieron en cámara en ambiente controlado (4). Los nódulos, hojas y raíces se cosecharon cuando las plantas se encontraban en el periodo vegetativo de crecimiento. El material vegetal se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta su uso (1 semana como máximo).

La proporción de tioles reducidos y oxidados se determinó enzimáticamente (5). El contenido específico de GSH se determinó mediante HPLC, tras derivatizar el tiol con monobromobimano para formar un aducto altamente fluorescente (3). El rango de concentraciones de GSH se encontraba entre 8-80 pmol.

Resultados y discusión

En nuestro laboratorio hemos adaptado una técnica de HPLC para la cuantificación precisa y altamente sensible de GSH en nódulos y otros tejidos de leguminosas. El método consistió esencialmente en la extracción de 10-50 mg de nódulos con 100-500 µL de ácido metanosulfónico 200 mM (conteniendo ácido

dietilentriamino-pentaacético 0.5 mM). Tras centrifugar, el sobrenadante se ajustó a pH 8 y se derivatizó con 0.2 mM de monobromobimano. El pH se ajustó a 3.5 con ácido acético y se inyectaron 10 μ L en el HPLC. Para hojas y raíces se siguió un proceso similar, pero utilizando 0.25 g de tejido. Las dos mejoras importantes sobre métodos anteriores fueron: primero, la posibilidad de utilizar muestras muy pequeñas de nódulos con igual eficacia y sensibilidad, lo cual fue de una gran ayuda, teniendo en cuenta las pequeñas cantidades de nódulos que producen especies como el guisante; segundo, la duración de cada cromatograma se redujo a tan sólo unos 20 min, lo que nos permitió analizar numerosas muestras en cortos intervalos de tiempo. En los mismos extractos se determinó también la proporción de tiol reducido. En todos los casos dicha proporción fue >85% y en la mayoría >95%.

Tabla. Contenido de GSH en leguminosas

Leguminosa	Edad	Nódulos	Raíces	
	Hojas (días)		(nmol g ⁻¹ PF)	
Guisante	32	523 \pm 49	58 \pm 8	409 \pm 24
Lupino	34	383 \pm 22	40 \pm 4	27 \pm 9
Soja	37	106 \pm 7	0	0
Judía	33	52 \pm 4	0	0
Cowpea	36	564 \pm 40	29 \pm 2	218 \pm 11

*Los valores son medias \pm SE de 6-8 muestras de dos series de plantas crecidas independientemente.

Los resultados obtenidos (Tabla) permiten varias conclusiones. Primera, los nódulos tienen concentraciones muy elevadas de GSH, superiores a las de hojas, que tradicionalmente son consideradas como el lugar de síntesis de los tioles. Segundo, las raíces contienen muy poco GSH y estos bajos niveles son probablemente resultado del transporte de GSH desde otros puntos de la planta y no de su síntesis en la raíz. Tercero, algunas especies como soja y judía no contienen GSH en raíces y hojas, pero sí en nódulos. Esto puede explicarse fácilmente ya que se ha descrito que la soja y judía poseen casi exclusivamente homoglutatión en vez de GSH en hojas, raíces y semillas (6). Cuarto, el alto contenido de GSH en nódulos con respecto a otros tejidos sugiere que este antioxidante es muy importante para proteger el proceso de fijación de nitrógeno, lo que está de acuerdo con el hecho de que el GSH puede reducir *in vitro* la ferril-leghemoglobina (generada por la oxidación de la leghemoglobina por los peróxidos) y contribuir a mantener así la leghemoglobina en estado reducido funcional (7). La abundancia de GSH en nódulos también sugiere que los nódulos son un importante lugar de síntesis de tioles.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto PB95-0091 (DGES, Ministerio de Educación y Cultura).

Referencias

1. Alscher RG (1989) *Physiol Plant* **77**: 457-464
2. Dalton DA et al (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 3811-3815
3. Fahey RC et al (1981) *Anal Biochem* **111**: 357-365
4. Gogorcena Y et al (1997) *Plant Physiol* **113**: 1193-1201
5. Griffith OW (1980) *Anal Biochem* **106**: 207-212
6. Klapheck S (1988) *Physiol Plant* **74**: 727-732
7. Puppo A et al (1993) *Biochem J* **289**: 435-438

SUPERÓXIDO DISMUTASAS EN NÓDULOS DE LEGUMINOSAS: DETERMINACIÓN PRECISA DE LA ACTIVIDAD Y COMPOSICIÓN ISOENZIMÁTICA EN PEQUEÑAS MUESTRAS (10-50 mg) DE TEJIDO

Rubio M.C. y Becana M.

Estación Experimental de Aula Dei, CSIC, Apdo. 202, 50080 Zaragoza.
mcr@ eead.csic.es

Introducción

Los nódulos de leguminosas son estructuras simbióticas formadas por la interacción de la planta con los rizobios. Los nódulos producen radicales libres y H_2O_2 debido a su ambiente altamente reductor y a la abundancia de proteínas como la nitrogenasa y la leghemoglobina, que son fácilmente autooxidables por el oxígeno molecular (4). Los nódulos poseen, sin embargo, diversos mecanismos de protección frente a los radicales libres, siendo la superóxido dismutasa (SOD) una de las defensas primarias de las células. Este metaloenzima cataliza la dismutación del radical superóxido a H_2O_2 y oxígeno. Los dos tipos más ampliamente distribuidos de SODs contienen Cu y Zn o bien Mn como cofactores metálicos. Las CuZnSODs se localizan principalmente en el citosol de los nódulos y las MnSODs en la matriz mitocondrial, peroxisomas y bacteroides (2,4).

En este trabajo hemos determinado la actividad total y la composición isoenzimática de la SOD en muestras muy pequeñas de nódulos. Para verificar la validez de la técnica, hemos seleccionado dos especies con nódulos de crecimiento determinado (judía y "cowpea") y dos de crecimiento indeterminado (guisante y alfalfa). Asimismo, hemos investigado el efecto de dos tipos de estrés (oscuridad continua ó 10 mM de nitrato, durante 0-4 días) sobre la actividad e isoenzimas de la SOD de nódulos de judía.

Materiales y métodos

Las plantas de guisante (*Pisum sativum* L. cv. Lincoln x *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* NLV8), judía (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Contender x *R. leguminosarum* bv *phaseoli* 3622), alfalfa (*Medicago sativa* L. cv. Aragón x *R. meliloti* 102F78) y "cowpea" (*Vigna unguiculata* Walp cv. California blackeye x *Bradyrhizobium* sp. 32H1) crecieron en cámara en ambiente controlado (5). Los nódulos se congelaron en N_2 líquido y se almacenaron a $-80^\circ C$ hasta su uso (1 semana como máximo).

La actividad SOD se determinó por el método del citocromo *c* (6) en presencia de $10 \mu M$ KCN. Una unidad SOD es la cantidad de enzima que inhibe la reducción del ferricitocromo *c* en un 50% a $25^\circ C$. Los isoenzimas de la SOD de nódulos se resolvieron por electroforesis nativa y se visualizaron por tinción selectiva de la actividad SOD en los geles (1). Las CuZnSODs y MnSODs se diferenciaron por inhibición selectiva con KCN y H_2O_2 en los geles previamente a la visualización de las bandas (3).

Resultados y discusión

En este trabajo hemos puesto a punto un método para determinar con precisión la actividad total y composición isoenzimática de la SOD en muestras de tan sólo 10-50 mg de nódulos. Esta técnica permite estudiar las SODs en leguminosas con pequeña producción nodular o comparar diferentes poblaciones nodulares de la misma planta.

Se utilizó un volumen de extracción de 100-400 μL y la diálisis convencional, necesaria para eliminar pequeñas moléculas que pueden interferir en el ensayo, se sustituyó por ultrafiltración con dispositivos Centricon-10 o Microcon-10 (Amicon). Asimismo, se seleccionó un volumen de 10 μL de extracto para el ensayo, de tal forma que la inhibición de la reacción por la SOD se encontraba en el óptimo del 30-60%. También se utilizaron controles (imprescindibles) con extractos hervidos para verificar que no existían interferencias con pequeñas moléculas como el ascorbato y que éstas habían sido eliminadas por la ultrafiltración. La introducción de todas estas mejoras permitió un ahorro muy importante en la cantidad de muestra (10-50 mg vs 0.25-0.5 g convencionales) y tiempo de análisis (2 h de ultrafiltración vs 18 h de diálisis), así como incrementar la eficacia de la extracción (recuperación prácticamente total de la SOD sin pequeñas moléculas frente a la dilución imprevisible que supone la diálisis).

La actividad SOD total fue similar para las dos especies de nódulos determinados e inferior, a su vez, a las obtenidas para los nódulos indeterminados (Tabla). No obstante, los nódulos de guisante y alfalfa mostraron actividades bastante diferentes, siendo la última especialmente elevada.

El estrés causó una disminución de la actividad SOD de nódulos de judía: 340, 276 y 177 U g^{-1} PF después de 0, 2 y 4 d de oscuridad continua, y 346, 387 y 242 U g^{-1} PF después de 0, 2 y 4 d de nitrato. Los estudios con inhibidores indican que los descensos de actividad son atribuibles a una pérdida de actividad MnSOD y no a la CuZnSOD, que permaneció relativamente constante.

Tabla. Actividad total y composición isoenzimática de la SOD de nódulos de leguminosas

Leguminosa	Edad (días)	Actividad SOD total* (U g^{-1} PF)	Número de isoenzimas	
			Mn	CuZn
Guisante	35-36	620 \pm 40	2	2
Alfalfa	56-57	1004 \pm 46	2	2
Judía	30-33	351 \pm 24	1	2
Cowpea	34-36	368 \pm 18	1	2-3

*Los valores son medias \pm SE de 4-10 muestras de al menos dos series de plantas crecidas independientemente.

En cuanto a la composición isoenzimática de la SOD, se ha observado que todos los nódulos estudiados contienen una MnSOD mitocondrial y una CuZnSOD citosólica (Tabla). Se pudo detectar una MnSOD adicional en los nódulos de crecimiento indeterminado, que no estaba presente en los de crecimiento determinado. La MnSOD adicional es probablemente responsable de la mayor actividad SOD detectada en los nódulos de crecimiento indeterminado y está siendo estudiada en detalle en nuestro laboratorio.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto PB95-0091 (DGES, Ministerio de Educación y Cultura).

Referencias

1. Beauchamp CO, Fridovich I (1971) *Anal Biochem* **44**: 276-287
2. Becana M et al. (1989) *Plant Physiol* **67**: 415-421
3. Bridges SM, Salin ML (1981) *Plant Physiol* **68**: 275-278
4. Dalton DA et al. (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 3811-3815
5. Gogorcena Y et al. (1997) *Plant Physiol* **113**: 1193-1201
6. McCord JM, Fridovich I (1969) *J Biol Chem* **244**: 6049-6055

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL PYRIDINE DISULFIDE OXIDOREDUCTASE ISOENZYME FROM SOYBEAN ROOT NODULES OVEREXPRESSED IN *ESCHERICHIA COLI*

Moran J.F.^{1*}, Sun Z.¹, Sarath G.¹, Becana M.², and Klucas R.V.¹

¹Department of Biochemistry, University of Nebraska-Lincoln, The Beadle Center, P.O. Box 880664, Lincoln, NE 68588, USA; and ²Estación Experimental Aula Dei, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Apdo 202, 50080 Zaragoza, Spain
*jmoran@unlinfo.unl.edu

Introduction

Ferric leghemoglobin reductase (FLbR1) from soybean nodules is a homodimeric flavoprotein of 110 kDa. It contains active thiol groups and catalyzes the reduction of ferric to ferrous leghemoglobin (Lb) using NADH as the electron donor. FLbR1 has a high affinity for ferric Lb ($K_m = 9.2 \mu\text{M}$) and NADH ($K_m = 46 \mu\text{M}$), which strongly suggests that the enzyme is critical for the maintenance of Lb in the reduced form in N_2 -fixing nodules. Several FLbR isoenzymes are present in soybean nodules and at least two genes have been detected in soybean by genomic Southern-blot analysis (2,3). Another enzyme belonging to the family of pyridine disulfide oxidoreductases, dihydrolipoamide reductase (DLDH), catalyzes the NADH-dependent reduction of lipoamide. DLDH is the E3 component and L-protein of the glycine decarboxylase and pyruvate dehydrogenase complexes, respectively. In pea leaf mitochondria DLDH in both complexes is identical and is encoded by a single gene (1). E3 is also the flavoprotein component of the 2-oxoglutarate acid and branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase multienzyme complexes.

Recently, we found a new cDNA sequence that codes for a second FLbR (FLbR2), which shows Lb reductase and DLDH activities and may be encoded by the second gene detected in soybean nodule tissue (2,6). To ascertain the function of this isoenzyme we cloned the cDNA for the mature transcript in the expression vector pET28a(+), purified the overexpressed protein, and characterized the structural and kinetic properties of the recombinant enzyme.

Materials and methods

FLbR2 from soybean root nodules was PCR amplified out of a *gt111* cDNA library and the coding sequence for the mature protein was cloned into the expression vector pET28a(+) (6). The protein was designed to be expressed fused to a short His-tag at the N-terminus of the recombinant protein. The enzyme was purified from *E. coli* extracts to near homogeneity in two purification steps: Probond affinity resin followed by strong anion exchange chromatography (HQ-H, Poros) in a BioCad protein workstation (PerSeptive Biosystems). His-tag removal was performed using a thrombin cleavage capture kit (Novagen) following manufacturer's instructions. Protein purification was monitored by SDS- and native-PAGE electrophoresis as well as by IEF. Western analysis was carried out as described (4). UV-Vis spectral analysis was performed with a Cary-3000 spectrophotometer. Protein concentration was measured with the Bio-Rad protein microassay procedure, using BSA as standard. Kinetic determinations for lipoamide, NADH, and Lb were assayed using between 0.2 and 2 μg of recombinant protein per assay (5).

Results and Discussion

The enzyme was purified 42-fold in terms of ferric Lb reducing activity and 324-fold in terms of lipoamide reductase activity. Specific activities of the recombinant protein were 958 and 83,055 U/mg for FLbR and DLDH activities. The recombinant soluble protein accounted for 0.7% of the bacterial protein while the native enzyme was less than 0.03% of the total nodule protein. The recombinant enzyme cross-reacted with antibodies raised against FLbR1 of soybean nodules (4). Native gel electrophoresis suggested that the protein is a dimer and SDS gels showed a monomeric molecular mass of 55 kDa. UV-Vis spectral analysis showed great similarities with pig and yeast DLDH spectra, indicating the presence of an FAD prosthetic group.

Kinetic analysis of the recombinant protein with Lb, lipoamide, and NADH showed K_m values of 30 μM , 58.2 μM , and 3.4 mM respectively (Table). However, the K_{cat}/K_m ratios for lipoamide and Lb were 116 and 52 $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$. Although the FLbR2 does not show high affinity for lipoamide, K_{cat}/K_m ratios for lipoamide and Lb resembled those of pig heart DLDH. This indicates that both functions may be efficiently carried out in soybean nodules by this isoenzyme under physiological conditions. This recombinant protein expression system provides a good method to isolate and study FLbR2. Further research will be necessary to determine the presence of this novel protein in plant tissue.

Table. Kinetic properties of soybean nodule FLbRs and pig heart DLDH

Enzymes	Substrates	K_m (μM)	V_{max} (U/mg) ^a	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)
FLbR2 (This work)	Lipoamide ^b	3381	4.67×10^5	392	116
	NADH ^b	58	1.63×10^5	137	2360
	Soybean Lb ³⁺	29	1.84×10^3	1.55	52
FLbR1 (Ref. 4)	Lipoamide ^b	716	ND	ND	ND
	NADH ^b	46	1.6×10^2	58.7	1276
	Soybean Lb ³⁺	10	4.5×10^2	1.7	185
DLDH (Ref. 4)	Lipoamide ^b	430	ND	ND	133
	NADH ^b	73	2.5×10^4	82.7	1134
	Soybean Lb ³⁺	28	3.5×10^2	1.2	43

^aOne activity unit catalyzes the reduction of 1 nmol substrate per min.

^bDetermined as NADH-dependent lipoamide reduction. ND, not determined.

Acknowledgments. JFM was the recipient of a postdoctoral fellowship from MEC (Spain). This work was funded by NSF grant no. OSR-95552255 and USDA grant no. 95-37305-2441.

References

1. Bourguignon et al (1996) *Biochem J* **313**: 229-234
2. Ji et al (1991) *Plant Physiol* **96**: 32-37

3. Ji et al (1994) *Plant Physiol* **104**: 453-459
4. Ji et al (1994) *Plant Physiol* **106**: 203-209
5. Luan et al (1998) *Physiol. Plant.* submitted
6. Moran et al (1998) ASPP 1998 Meeting, Madison, WI

ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS NODULARES Y SU INFLUENCIA EN EL DESARROLLO DEL GUISANTE NODULADO CRECIDO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CO₂

Cabrerizo P.M., Arrese-Igor C., Aparicio-Tejo P.M.

Depto. Ciencias del Medio Natural, Universidad Pública de Navarra, Campus de Arrosadía, 31006 Pamplona. e-mail: becariosbv@upna.es

El estudio del efecto de elevadas concentraciones de CO₂ en plantas es interesante por varios aspectos: primero, el crecimiento de plantas en invernaderos a concentraciones marcadamente elevadas de CO₂ se usa con bastante frecuencia para mejorar el tamaño y la calidad de los cultivos. Segundo, el uso de combustibles fósiles implica un incremento de CO₂ en la atmósfera de 1,2-1,5 μmol CO₂ mol⁻¹ por año (Lashof y Tirpak 1990, Watson et al 1990). Un incremento, aunque relativamente lento, de la concentración de CO₂ en la atmósfera, puede conllevar alteraciones a nivel fisiológico y poblacional.

Se puede predecir que este aumento de CO₂ será más favorable para las especies con metabolismo fotosintético tipo C₃, porque se produce un aumento del material fotoasimilable (CO₂), y dentro de estas, las especies con importantes sumideros de energía, como las que fijan N₂, tienen una mayor estimulación del crecimiento comparada con otras especies del mismo tipo (Poorter 1993). Sin embargo, exposiciones prolongadas causan un mayor cierre estomático, un aumento en la producción de etileno y, en algunos casos, de la respiración (Bowes 1993).

Los trabajos en los que se analizan los efectos de la alta concentración de CO₂ sobre las leguminosas en simbiosis son escasos y por tanto, no están suficientemente estudiados las posibles consecuencias tanto sobre el macro como sobre el microsimbionte ni sobre la asociación *Rhizobium*-leguminosa.

Este estudio ha sido llevado a cabo con plantas de guisante (*Pisum sativum* L. cv. Frilene) inoculadas con *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* NLV8 que fueron crecidas con una solución exenta de nitrógeno en cámaras de ambiente controlado (Heraeus-Vötsch) a tres concentraciones de CO₂: **control** 360 μmol CO₂ mol⁻¹, **moderada** 700 μmol CO₂ mol⁻¹ y **elevada** 1000 μmol CO₂ mol⁻¹. La desviación estándar media en las tres concentraciones fue de ±20 μmol CO₂ mol⁻¹. Los parámetros de crecimiento de la planta se ven favorecidos de forma lineal a la concentración de CO₂: crecimiento de un 30% más tanto de la parte aérea como de la raíz en la concentración moderada y del 70 y 95% respectivamente en la elevada.

El crecimiento de los nódulos es mayor en las plantas crecidas en concentraciones superiores a la ambiental de CO₂, en cambio, este incremento no es lineal a la concentración de CO₂ sino que se produce un fuerte aumento del crecimiento hasta la concentración moderada (19% en número y 58% en peso). Este incremento se mantiene hasta la concentración elevada de CO₂ (17% en número y 51% en peso). En concentraciones superiores a la ambiental los nódulos son más grandes; pero no hay un incremento significativo entre 700 y 1000 μmol CO₂ mol⁻¹. La simbiosis planta-*Rhizobium* se ve favorecida por el aumento de CO₂ pero el

aumento del peso nodular de la planta que se produce a $700 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ es suficiente para el desarrollo de la planta a $1000 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$.

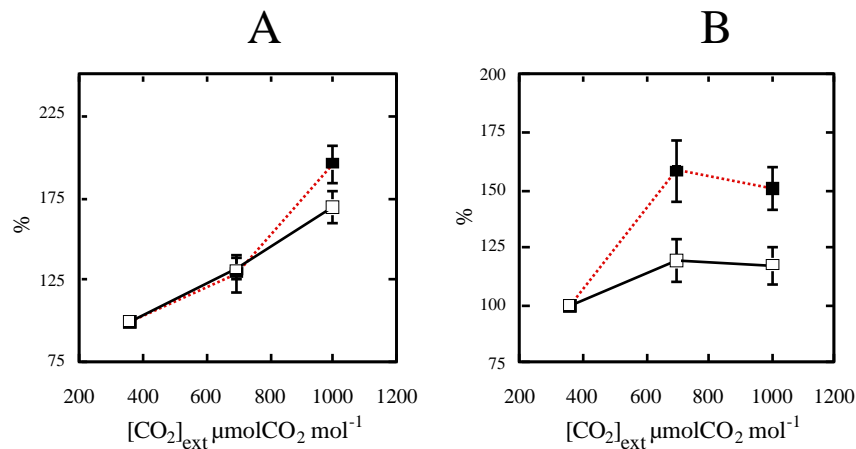


Fig. 1. **A** Porcentaje frente a la concentración control del peso seco de la parte aérea (blancos) y de la raíz (negros) de plantas de guisante. **B** Porcentaje frente a la concentración control del número de nódulos (blancos) y del peso seco de nódulos (negros) en plantas de guisante. Todos los valores son los obtenidos después de crecer las plantas 4 semanas a diferentes concentraciones de CO₂. Los valores son medias (+ES) de al menos 16 plantas por tratamiento.

Los requerimientos para la fijación en condiciones de elevado CO₂ están regidos por la planta y aunque que se produce una mayor formación de esqueletos carbonados (datos no mostrados), que suelen ser limitantes en la simbiosis, no se produce un incremento de la nodulación en condiciones de elevado CO₂.

Agradecimientos

Trabajo financiado por la DGICYT y el Dpto. de Educación del Gobierno de Navarra. P.C. es becario del MEC.

Bibliografía

- Bowes G. (1993) Facing the inevitable: plant and increasing atmospheric CO₂. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 127-145
- Lashof DA y Tirpak DA (1990) Policy options for stabilizing global climate. Hemisphere Publishing Corporation, New York
- Poorter H (1993) Interspecific variation in the growth response of plants to an elevated ambient CO₂ concentration. *Vegetatio* 104-105: 77-97
- Watson RT, Rodhe H, Oescheger H y Siegenthaler U (1990) Climate. En JT Houghton, GJ Jenjins y JJ Ephranums, eds., *The IPCC Scientific Assessment*. Cambridge University, Cambridge. pp. 1-40.

EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL EN NÓDULOS DE LUPINO BAJO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE OXÍGENO

Guasch L.M., Fernández-Pascual M., Pueyo J.J. y de Felipe M.R.

Dpto. de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Centro de Ciencias Medioambientales, C.S.I.C. C/ Serrano 115, dpdo. 28006 MADRID. ebvgp54@fresno.csic.es.

Introducción

Se ha sugerido que el gen *Enod2* puede intervenir en la regulación de la difusión de O₂ por los siguiente motivos: codifica para una proteína de pared rica en (hidroxi)prolina, su expresión es ligeramente anterior a la leghemoglobina y a la nitrogenasa, su localización coincide con la de la barrera a la difusión de oxígeno (van de Wiel *et al.*, 1990) y la expresión del antisentido en plantas transgénicas de *Lotus* produce nódulos defectivos en la barrera a la difusión de O₂ (Skøt *et al.*, 1996).

La función de la leghemoglobina (Lb) es la difusión de O₂ a los bacteroides y a las mitocondrias de las células infectadas. La regulación de la expresión de la Lb se ha estudiado en plantas transgénicas mediante actividad GUS y se han detectado factores *trans* y elementos *cis* que controlan su expresión (Szczyglowski *et al.*, 1994, Stougaard *et al.*, 1990). Así, se han caracterizado los elementos en *cis* necesarios para: la expresión específica en el nódulo, un elemento fuertemente activador, un activador débil y un elemento negativo. Sin embargo, ninguno de los promotores de Lb de lupino tiene la caja característica de las leghemoglobinas simbióticas y, además por su secuencia se considera que se trata de un género arcaico de esta familia (Strózycki y Legocki 1995). Esta diferencia en la secuencia se ve confirmada por la falta de reacción cruzada de los anticuerpos contra Lb de lupino con Lb de soja (Vivo *et al.*, 1989).

El objetivo de este trabajo fue el análisis de la variación de la expresión de los genes *LEnod2* y *leghemoglobina (lb1)* durante la aplicación de distintas concentraciones de O₂ (1, 21, 40%) a los sistemas radicales de lupino. También se estudió la localización del gen *nifH* que codifica para el componente II de la nitrogenasa, así como el efecto de dichas concentraciones de O₂ sobre las proteínas correspondientes a los genes mencionados.

Material y Métodos

Los sistemas radicales de *Lupinus albus* L. cv. Multolupa fueron sellados antes de la aplicación de las concentraciones de 1, 21, 40% O₂ durante 1, 3 y 10 días. Para el aislamiento de RNA se siguió el procedimiento de De Vries *et al.* (1980). La hibridación *in situ* por métodos radioactivos se realizó según Yang *et al.* (1991). La electroforesis de RNA total se realizó en condiciones desnaturalizantes según Sambrook *et al.* (1989), añadiendo un tratamiento con proteinasa K. La hibridación *in situ* y el Northern-blot con digoxigenina se realizaron según el Manual de Boehringer Mannheim. La SDS-PAGE y Western-blot se llevaron a cabo según Fernández-Pascual *et al.* (1996). Las técnicas inmunocitoquímicas al microscopio óptico y electrónico fueron descritas respectivamente por Lucas *et al.* (1992) y Vivo *et al.* (1989).

Resultados y Discusión

Los primeros cambios en la expresión de *LEnod2* y *lbi* se detectaron después de 3 días de aplicación de las distintas concentraciones de O₂, se observó un marcado aumento para el primer gen en el tratamiento de 40% O₂, mientras que *lbi* descendió en ambos tratamientos, bajo hipoxia e hiperoxia. Después de 10 días, el aumento de la expresión de *LEnod2* observado con 40% O₂ durante 3 días había desaparecido, mientras que las disminuciones encontradas en la *lbi* se mantuvieron. La expresión de *LEnod2* en las plantas tratadas con 1% O₂ fue inferior en todos los casos. No se observaron cambios en la localización del mensajero de *LEnod2* con los distintos tratamientos. Por lo que respecta a *nifH*, se detectó expresión mediante hibridación *in situ* después de 10 días de tratamiento con 1% O₂, aunque la degradación de los bacteroides es muy patente. Se analizó también el efecto sobre las proteínas que son codificadas por *lbi* y *nifH*. Se detectó disminución del contenido de leghemoglobina después de 10 días lo que ratifica los resultados de Northern-blot. Este descenso se confirmó con un menor inmunomarcado al microscopio electrónico. En relación con esta localización, se detectó leghemoglobina en las células adyacentes a la zona infectada de todos los tratamientos. El componente II de la nitrogenasa, que es el más sensible a altas concentraciones de oxígeno, muestra un descenso progresivo en el caso del 40% O₂, mientras que con el 1% O₂ se mantiene su contenido. El componente I muestra, sin embargo, un descenso con el 1% O₂ después de 10 días de tratamiento.

El aumento de la expresión de *LEnod2* después de 3 días de aplicación de 40% O₂, se corresponde con el incremento de la resistencia mínima de la barrera a la difusión de O₂ (Guasch, Tesis Doctoral 1998). Después de 10 días, la expresión de *LEnod2* retomó valores basales, posiblemente indicando que el cambio en la morfología de la corteza media producido en 3 días fue suficiente para adaptarse a 40% O₂. Por lo que respecta a la Lb el descenso en el 1% O₂ pudiera deberse a una senescencia general, mientras que el mismo efecto en el 40% O₂ contribuiría al bloqueo de la difusión facilitada, mecanismo regulador de la difusión de O₂ propuesto por Thumfort *et al.* (1994). La inhibición de la actividad nitrogenasa en 1% O₂ y en 40% O₂ no parece deberse a la variación del contenido de proteína, indicando que la regulación de la actividad fijadora es previa a la degradación del enzima.

Bibliografía

- De Vries S, *et al.*, 1988. In *Plant Mol. Biol. Man.* Kluwer Academic Publishers Dordrecht. B6, 1-13
- Fernández-Pascual M, *et al.*, 1996. *J. Exp. Bot.* 47, 1709-16
- Guasch LM. Tesis Doctoral 1998, ETSI Agrónomos. U. P. Madrid.
- Lucas MM, *et al.*, 1992. *J. Plant Physiol.* 140, 84-91
- Stougaard J, *et al.*, 1990. *Mol. Gen. Genet.* 220, 353-60.
- Strózycki PM and Legocki AB. 1995. *Plant Science* 110, 83-93
- Szczyglowski K, *et al.*, 1994. *Plant Cell.* 6, 317-32
- Thumfort PP, *et al.*, 1994. *Plant Physiol.* 105, 1321-33
- Van de Wiel C, *et al.*, 1990^a. *EMBO J.* 9, 1-7.
- Vivo A, *et al.*, 1989. *Plant Physiol.* 90, 452-7.
- Yang WC, *et al.*, 1991. *Mol. Plan. Microb. Interact.* 4, 464-8

FIJACIÓN SIMBIÓTICA Y ASIMILACIÓN DE AMONIO EN DOS CULTIVARES DE *CICER ARIETINUM* EN CONDICIONES DE SALINIDAD

Soussi M., Khadri M., Pliego L., Lluch C. y Ocaña A.

Dpto. Biología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada. 18071-Granada. clluch@goliat.ugr.es

En nódulos, el nitrógeno fijado es exportado en forma de amonio del bacteroide al citoplasma de la planta hospedadora donde es asimilado por las enzimas del ciclo de la glutamato sintasa/glutamina sintetasa (GS/GOGAT) (Cullimore y Bennet, 1988). La importancia de estas actividades enzimáticas las evidencia Pacovsky y Fuller (1991) cuando proponen que en un programa de mejora de la fijación de nitrógeno, se debe identificar el germoplasma que expresa elevados niveles de GS o GOGAT específica de nódulos. Basándose en estos hechos se propone un estudio entre dos genotipos de *Cicer arietinum*, con distinta tolerancia a la sal, con objeto de conocer su comportamiento ante la fijación de nitrógeno y la asimilación de amonio y a la vez valorar la adaptación de estos procesos ante el estrés salino

Se utilizaron dos cultivares de garbanzo, ILC1919 y Pedrosillano inoculados con la cepa ch-191 de *Mesorhizobium ciceri*, y tratados con NaCl (0, 50, 75 y 100 mM) desde el inicio del cultivo. En el estudio se analizó el efecto de la sal hasta el inicio de floración. Se determinó peso seco de planta (PSP), relación raíz parte aérea (RPA); actividad nitrógenasa específica (ARA) y por planta (ARAP), y las enzimas de la vía de asimilación de amonio en el citosol nodular. La acumulación intracelular en nódulos de aminoácidos y prolina ha sido igualmente determinado.

La salinidad reduce significativamente el crecimiento en plantas del cultivar Pedrosillano, los porcentajes de reducción fue entorno al 25% con 50 y 75 mM de NaCl y más drástico (41%) con 100 mM. En plantas de ILC1919, no se detectan diferencias significativas entre los tratamientos salinos de 50 y 75 mM respecto al control, solo con 100 mM se observó una reducción del 20% de peso seco total de la planta. En la relación raíz/parte aérea se observó un incremento significativo en ILC1919 con 50 mM, el aumento se debe a que, la reducción del crecimiento radical por la sal es menor que la de la parte aérea, este efecto puede generalizarse a ambas simbiosis (Tab. 1).

La actividad ARA específica de las plantas control fue más alta en ILC1919 que en Pedrosillano. La inhibición inducida por el NaCl fue menor en ILC1919 ya que en Pedrosillano se obtuvo una inhibición del 85% con 100 mM frente al 29% del ILC1919. Este efecto fue más evidente en ARAP (Tab. 1). Por tanto, el cultivar ILC1919 es más tolerante que Pedrosillano en parámetros de crecimiento y fijación de nitrógeno.

El cultivar ILC1919 expresó más actividad GS que Pedrosillano y se incrementó con 50 y 75 mM, esta activación por la sal no ha sido observada en nódulos de haba (Cordovilla et al., 1994). La actividad NADH-GOGAT se estimuló significativamente en ILC1919 con las dosis intermediarias de sal. En cambio, en Pedrosillano la GOGAT se inhibió con todas las dosis de sal. El ciclo GS/GOGAT en ILC1919 es menos sensible a la salinidad.

El estrés salino induce la acumulación de prolina en la fracción citosólica de los nódulos en ambas simbiosis (Tab. 2), siendo el incremento más pronunciado en Pedrosillano. Con 50 mM el nivel de prolina se multiplica por 2.5, y con 75 y 100 mM se detectaron valores cuatro veces superiores al observado en el control. En nódulos de ILC1919 el incremento en prolina con 50 y 100 mM no fue significativo. La prolina, por tanto, no parecer un indicador de la tolerancia a la salinidad. El incremento máximo en aminoácidos solubles totales en nódulo se observó con 75 mM en ambos cultivares. En nuestro estudio, el ciclo (GS/GOGAT) puede usarse como criterio de selección a la salinidad.

Tabla 1. Peso seco de planta (PSP) expresado en gramos; relación raíz/parte aérea (RPA), actividad reductora de acetileno específica (ARA) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 (\text{g PS})^{-1} \text{h}^{-1}$, ARA por planta (ARAP) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{planta}^{-1}$, en dos cultivares de *Cicer arietinum*, al inicio floración, con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

	NaCl	PSP	RPA	ARA	ARAP
Pedrosillano	0	1.11	0.44	32.8	1.27
	50	0.86	0.53	23.8	1.16
	75	0.81	0.47	13.5	0.49
	100	0.50	0.50	4.8	0.06
ILC1919	0	0.98	0.65	52.4	1.16
	50	0.93	0.76	46.0	1.52
	75	0.94	0.74	19.1	0.63
	100	0.78	0.64	15.3	0.44
	MDS (0.05)	0.09	0.09	5.7	0.20

Tabla 2. Actividad GS en $\mu\text{mol GH} (\text{g PF})^{-1}$, GOGAT en $\text{NADH}_{\text{ox}} (\text{g PF})^{-1}$, contenido en prolina y aminoácidos solubles totales en $\mu\text{g} (\text{g PF})^{-1}$, en nódulos de dos cultivares de *Cicer arietinum*, al inicio floración, con cuatro dosis de NaCl desde el inicio del cultivo.

	NaCl	GS	GOGAT	Prolina	Aminoácidos
Pedrosillano	0	140.4	8.38	19.5	4209
	50	271.6	2.05	50.2	4905
	75	258.4	2.90	87.1	7397
	100	197.8	2.60	87.4	5733
ILC1919	0	381.6	0.97	42.0	5261
	50	358.9	5.53	43.8	7088
	75	306.3	2.60	69.7	7660
	100	303.9	1.30	40.2	5733
	MDS	18.5	0.72	7.1	407

Referencias

- Cordovilla, M.P., Ligeró, F. y Lluch C. (1994) J. Exp. Bot. 45: 1483-1488
 Cullimore, J.V. y Bennet, M.J. (1988) J. Plant Physiol. 132: 387-393
 Pacovsky, R.S. y Fuller, G. (1991) Plant Soil 132: 139-148.

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos INCO-950717(Contract Number ERBIC18CT960081) y PB95-1159 de la DGICYT

RESPUESTA DEL METABOLISMO CARBONADO Y SOLUTOS INTRACELULARES EN NÓDULOS DE JUDÍA: EFECTO DEL CLORURO SÓDICO

Pliego L., Khadri M., Soussi M., Ocaña A. y Lluch C.

Dpto. de Biología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada. 18071-Granada. clluch@goliat.ugr.es

Las leguminosas en simbiosis, son sensibles a la sal, limitándose su crecimiento (Kanapathipillai, 1990), la disponibilidad de fotosintatos y en consecuencia la nodulación, la fijación de nitrógeno y la productividad (Delgado *et al.*, 1993). Estos efectos negativos son condicionados por la acumulación de iones tóxicos, que finalmente afectan los patrones de comportamiento de las actividades enzimáticas (Bordeleau y Prevost, 1994), estas permiten el aporte de esqueletos carbonados y poder reductor por las plantas a los bacteroides, y estos a su vez suministra los compuestos nitrógenados para su incorporación al metabolismo del hospedador

La judía se considera pobre en fijación de N₂ y sensible a la salinidad. En este trabajo se evaluó el proceso adaptativo al estrés salino de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculada con *Rhizobium tropici* cepa CIAT 899, relacionado con enzimas del metabolismo carbonado y contenido de osmorreguladores. Se aplicaron cuatro dosis de cloruro de sodio (0, 25, 50 y 100 mM) una vez establecida la simbiosis, 18 días después de la siembra. Se determinó el peso seco de planta (PSP), la relación raíz-parte aérea (RPA), el peso seco de nódulos (PSN), la actividad reductora de acetileno (ARA) y la actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), malato deshidrogenasa (MDH), isocitrato deshidrogenasa (ICDH) y alcohol deshidrogenasa (ADH) en el citosol nodular y contenido de osmolitos, prolina (PRO) y azúcares solubles totales (AST). Se realizaron cuatro recogidas: a los 3, 6, 9 y 12 días después de la adición del cloruro sódico, que corresponden al período vegetativo para las dos primeras, y al inicio y plena floración para 9 y 12 días respectivamente.

El efecto negativo de la sal en general, se evidenció más en los parámetros de fijación que en los de crecimiento detectándose que a los 30 DAS, el PSP disminuyó en un 27% a 100 mM NaCl, mientras que ARA descendió en un 40 %. El comportamiento de las enzimas estudiadas fue variable, así MDH e ICDH disminuyeron en el control a través del tiempo, mientras que PEPC se mantuvo. El estrés salino incrementó ICDH en la última recogida, mientras que MDH decayó. En el caso de ADH, su actividad se vio favorecida por la sal especialmente en la tercera recogida. El contenido de osmorreguladores PRO y AST aumentaron con el tratamiento salino y con el tiempo del cultivo observándose los mayores valores en plena floración. En PRO, por ejemplo, el incremento fue de 116% y 237% para 50 y 100 mM respectivamente.

Se observaron correlaciones positivas entre las actividades enzimáticas y ARA, mientras que estas se correlacionaron negativamente con la sal. La actividad PEPC está estrechamente relacionada con la efectividad del nódulo y la capacidad para fijar N₂ y en condiciones adversas (estrés salino) el metabolismo nodular se altera,

estimulándose procesos fermentativos como el relacionado con la alcohol deshidrogenasa.

Tabla 1.- Evolución de la actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), malato deshidrogenasa (MDH) en $\mu\text{mol NADH}_{\text{ox}}(\text{g PF})^{-1}$, alcohol deshidrogenasa (ADH) e isocitrato deshidrogenasa (ICDH) en $\mu\text{mol NADP}_{\text{red}}(\text{g PF})^{-1}$, del contenido de prolina en $\mu\text{g}(\text{g PF})^{-1}$ y de azúcares solubles totales (AST) en mg eq. glucosa $(\text{g PF})^{-1}$, en nódulos de *P. Vulgaris* var. Africa durante cuatro recogidas.

Días después del tratamiento					Días después del tratamiento				
NaCl	3	6	9	12	NaCl	3	6	9	12
PEPC					MDH				
0	518.5	473.0	518.5	517.4	0	10144	11012	10302	5374
25	409.3	636.4	238.0	213.7	25	6686	9719	10147	7337
50	248.8	651.5	448.9	148.1	50	7315	11980	7315	5012
100	181.7	173.8	341.8	101.4	100	5509	5344	5749	4174
MDS (0.05) 17.6					MDS(0.05) 312.4				
ADH					ICDH				
0	29.1	48.4	41.6	38.6	0	197.9	169.3	204.8	49.7
25	34.3	44.5	41.4	53.6	25	195.2	206.4	149.3	89.3
50	30.8	36.2	62.5	36.5	50	198.7	180.1	143.5	60.1
100	38.5	32.7	52.6	42.2	100	223.4	153.1	81.4	65.9
MDS (0.05) 3.1					MDS(0.05) 6.9				
PRO					AST				
0	71.8	96.6	93.6	114.2	0	6.5	7.8	11.8	9.2
25	102.8	135.5	125.9	151.4	25	7.2	9.2	12.0	9.1
50	122.6	131.0	131.0	246.9	50	7.1	11.3	14.0	10.5
100	106.9	164.1	157.2	385.8	100	9.8	13.5	12.1	15.9
MDS (0.05) 5.8					MDS (0.05) 0.5				

Referencias

- Delgado M.J., Garrido J.M., Ligeró F. and Lluch C. (1993) *Physiol. Plant.* 89: 824-829
- Wignarajah K. (1990) *Environ. Exp. Bot.* 2: 141-7
- Bordeleau L.M. and Prévost D. (1994) *Plant and Soil* 161: 115-125

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos INCO-95071 (Contract Number 18CT960081) y PB95-1159 de la DGICYT.

CAMBIOS INDUCIDOS POR LA SALINIDAD EN LA ASIMILACIÓN DEL AMONIO Y METABOLISMO DE UREIDOS EN *PHASEOLUS VULGARIS*

Khadri M., Pliego L., Soussi M. y Lluch C.

Dpto. Biología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada. 18071-Granada. clluch@goliat.ugr.es

La asimilación del amonio en nódulos de leguminosas ha sido ampliamente revisada por Vance *et al.* (1994). Esta asimilación tiene lugar mediante la glutamina sintetasa y la glutamato sintasa. En judía, leguminosa de origen tropical, los productos de la asimilación del amonio son incorporados a las purinas (Schuller *et al.*, 1986). La xantina deshidrogenasa y uricasa, enzimas del catabolismo de purinas, producen alantoina y ácido alantoico, compuestos nitrogenados formados en las células del nódulo con el fin de ser transportadas vía xilema a la parte aérea donde serán utilizados como donadores de nitrógeno reducido para la síntesis de aminoácidos y proteínas.

En este trabajo se aborda la influencia de distintas dosis de cloruro sódico aplicadas desde el inicio del cultivo sobre el metabolismo del amonio y de ureidos en nódulos de *Phaseolus vulgaris* en simbiosis con *Rhizobium tropici*.

Se utilizaron plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Coco, inoculadas con la cepa CIAT899 de *Rhizobium tropici*, cultivadas en cámara de ambiente controlado. Los tratamientos fueron 0, 10, 25 y 50 mM de cloruro sódico adicionados a la solución nutritiva al inicio del cultivo. Se realizaron 4 recogidas a los 18, 22, 26 y 30 días de cultivo. Se determinaron los parámetros de crecimiento, peso seco parte aérea (PSPA), peso seco raíz (PSR); fijación, peso seco de nódulos (PSN), actividad nitrogenasa específica (ARA); glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT), xantina deshidrogenasa (XDH), uricasa, contenido de ureidos y aminoácidos en nódulos.

En la primera recogida, el PSPA no se vio afectado significativamente con las distintas dosis de sal. En la segunda y tercera recogida, el crecimiento de la parte aérea se inhibió con 50 mM, mientras que a los 30 días de cultivo, el descenso fue significativo con 25 y 50 mM de sal. El PSR sólo se inhibió significativamente en la última recogida y con 50 mM NaCl, al igual que el PSN descendiendo un 50% con respecto al control. El ARA disminuyó significativamente desde la primera recogida con los distintos tratamientos, inhibiéndose hasta un 90% en los 2 últimos muestreos. La GS y la GOGAT registraron un descenso importante y significativo en todas las recogidas y con todos los niveles de cloruro sódico. La XDH y la uricasa se inhibieron de forma semejante a las 2 anteriores. Todas las enzimas se correlacionaron entre sí y con el ARA positivamente y significativamente. Desde la primera recogida y con todas las dosis de sal, el contenido de ureidos en nódulos descendió progresivamente al igual que los aminoácidos.

La parte aérea se vio más afectada por la sal que la raíz. Esto ha sido descrito por Wignavajah (1990) en judía, explicándose por una posible acumulación de sodio en la

parte aérea (Cordovilla *et al.*, 1995). La reducción del PSN con la sal ya ha sido descrita por Delgado *et al.*, (1994), así como la inhibición de la fijación de nitrógeno, siendo ésta más sensible a la salinidad que el crecimiento. Según Streeter (1993), ésta inhibición durante el estrés puede explicarse por la limitación de la exportación de N₂ reducido. Las enzimas de la asimilación del amonio se afectaron fuertemente por la sal (Cordovilla *et al.*, 1994), al igual que la XDH y la uricasa. Por lo tanto, al ser los ureidos un indicador de la fijación simbiótica de nitrógeno, también disminuyeron significativamente con la sal, correlacionándose con el ARA.

Tabla 1.- ARA en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4$ (g PS)⁻¹ h⁻¹, GS en $\mu\text{mol GH}$ (g PF⁻¹) h⁻¹, GOGAT en $\mu\text{mol NADH}_{\text{ox}}$ (g PF⁻¹) h⁻¹, XDH en $\mu\text{mol NAD}_{\text{red}}$ (g PF⁻¹) h⁻¹, uricasa en $\mu\text{mol ácido úrico}$ (g PF⁻¹) h⁻¹, contenido en ureidos y en aminoácidos solubles totales en μmol (g PF⁻¹), en nódulos de la variedad Coco de *Phaseolus vulgaris* en simbiosis con la cepa CIAT899 de *Rhizobium tropici*, a lo largo de 4 cosechas, tratada con cuatro dosis de NaCl desde la siembra.

DIAS	NaCl(mM)	ARA	GS	GOGAT	XDH	Uricasa	Ureidos	Aminoácidos
18	0	75.6	407.2	35.9	20.9	111.6	2.17	41.5
	10	113.	388.3	37.5	20.2	128.4	1.71	38.5
	25	96.1	308.4	33.9	18.2	99.1	1.59	33.6
	50	34.2	236.2	26.8	13.0	80.2	0.93	22.4
22	0	121.	371.3	41.5	25.1	125.6	2.15	45.3
	10	115.	312.7	33.3	19.9	99.1	1.83	43.9
	25	96.1	246.6	31.4	15.8	88.8	1.27	34.4
	50	34.2	152.1	22.9	12.9	83.6	0.90	30.9
26	0	83.4	302.4	29.5	22.5	126.4	2.07	36.9
	10	88.1	283.5	32.2	17.9	99.6	1.73	38.5
	25	85.7	195.6	26.8	10.5	58.3	1.20	28.4
	50	27.8	148.3	19.1	5.7	47.7	0.83	17.2
30	0	106.	300.5	28.7	19.1	81.4	1.74	35.7
	10	66.9	152.1	17.4	12.1	49.7	1.26	29.4
	25	44.4	98.3	11.1	6.6	35.2	0.65	17.1
	50	3.0	22.7	3.0	0.63	13.0	0.44	13.1
MDS(0.05)		21.2	14.2	2.0	0.9	4.5	0.059	2.17

Referencias

- Delgado M.J., Ligeró F. y Lluch C. (1994) Soil Biol. Biochem. 26: 371-376
 Cordovilla M.P., Ligeró F. and Lluch C. (1994) J. Exp. Bot. 45: 1483-1488.
 Cordovilla M.P., Ocaña A., Ligeró F. and Lluch C. (1995) J.Plant Nut. 18: 1595-1609
 Schuller K.A., Day D.A., Gibson A.H., and Gresshoff P.M. (1986) Plant Physiol. 80: 646-650
 Streeter J.G. (1993) Physiol. Plant. 87: 616-623
 Vance C.P., Gregerson R.G., Robinson D.L., Miller S.S. and Gantt J.S. (1994) Plant Sci. 7: 1-7
 Wignarajah K. (1990) Environ. Exp. Bot. 2: 141-147

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos INCO-950717(Contract Number ERBIC18CT960081) y PB95-1159 de la DGICYT

SECCION 2

GENÉTICA MOLECULAR

**CARACTERIZACIÓN Y REGULACIÓN DE GENES DE
BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM IMPLICADOS EN LA
DESNITRIFICACIÓN**

Velasco L., Bedmar E. J. y Delgado M. J.

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos. Estación Experimental del Zaidín, CSIC. Apdo. 419. 18080-Granada. mdelgado@eez.csic.es

La desnitrificación es un proceso clave en el ciclo biogeoquímico del N en la biosfera ya que es el mecanismo por el que el nitrato, la forma más abundante de N inorgánico en el suelo, se convierte en dinitrógeno molecular (N_2). Los microorganismos capaces de llevar a cabo esta función suelen ser anaerobios facultativos que, en ausencia de oxígeno, emplean el nitrato (NO_3^-) como aceptor final de electrones de la cadena respiratoria. La respiración del nitrato resulta en la formación de nitrito (NO_2^-), a partir del cual se inicia, en sentido estricto, el proceso de desnitrificación, que consiste en la producción de óxidos de nitrógeno, óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N_2O) e, incluso N_2 que volvería de nuevo a la atmósfera.

La reducción anaeróbica del nitrato se lleva a cabo de modo secuencial por las enzimas nitrato reductasa (NR), nitrito reductasa (NIR), óxido nítrico reductasa (NOR) y óxido nitroso reductasa (NOS). El interés en estudiar la desnitrificación radica tanto en que constituye el principal mecanismo para eliminar el exceso de nitrato en suelos y aguas como en que representa la mayor fuente de producción de óxidos de nitrógeno, gases que intervienen en la formación de la lluvia ácida, en el calentamiento global de la atmósfera y en la destrucción de la capa de ozono de la misma. Hay que destacar, además, que la reducción anaeróbica del nitrato representa un proceso alternativo de conservación de la energía, ya que la participación en el mismo de enzimas quimiosmóticas, localizadas en las membranas celulares, resulta en la generación de ATP mediante la creación de un potencial electroquímico asociado a la translocación de protones a través de dichas membranas.

Las bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* son bien conocidas por su capacidad para infectar las células corticales de las raíces de las plantas leguminosas, formar nódulos y diferenciarse en bacteroides que sintetizan la enzima nitrogenasa, responsable de catalizar la reducción de N_2 a amonio (NH_4^+). Las especies de *Bradyrhizobium* son también capaces de respirar y desnitrificar nitrato, mientras que tal capacidad está restringida en las especies de *Rhizobium*. Aunque se han identificado los genes que codifican la enzima óxido nitroso reductasa de *R. meliloti* (Chan y Wheatcroft, 1993; Holloway et al., 1996) y los de la nitrito reductasa de *R. hedysari* (Toffanin et al., 1996), se considera que las especies de *Rhizobium* no son auténticas desnitrificantes. ya que, al contrario que las de *Bradyrhizobium*, no crecen microaeróbicamente con nitrato o nitrito como aceptor final de electrones de la cadena respiratoria. Aunque las causas de este hecho son, hasta el momento,

desconocidas, es posible que las especies de *Rhizobium* sean incapaces de acoplar la reducción de óxidos de nitrógeno a la producción de ATP.

En *B. japonicum* la expresión de los genes *nif* y *fix* responsables de la fijación biológica de N₂ está sujeta a un complejo sistema regulador (Fisher, 1994). En primer lugar, las proteínas FixL y FixJ, producto de los genes *fixLJ*, constituyen un sistema sensor/regulador de respuesta de dos componentes capaz de captar la concentración intracelular de oxígeno. En condiciones limitantes de oxígeno FixL fosforila a FixJ y ésta, activa la transcripción del gen *fixK₂*. La proteína FixK₂ activa, a su vez, a los genes *nif* y *fix*. No hay que olvidar que la respiración del nitrato y la desnitrificación requieren, además de nitrato, condiciones de ausencia de oxígeno, por lo que cabe la posibilidad de que el sistema FixLJ/FixK₂ esté implicado en la regulación de la expresión de los genes de la desnitrificación. De hecho, mutantes *fixL* y *fixJ* son incapaces de crecer microeróbicamente con nitrato. De aquí, que los estudios de expresión de genes de la desnitrificación en fondos genéticos alterados en genes reguladores de la fijación de N₂ sean de gran interés.

La enzima nitrito reductasa es la que inicia el proceso de desnitrificación. Existen dos tipos de nitrito reductasas respiratorias, mutuamente excluyentes, en la naturaleza. Unas contienen citocromos de tipo *c* y *d₁* en el centro activo de la enzima, mientras que las otras contienen cobre (Cu) en su molécula (Zumft, 1997). En contraste con la compleja agrupación de los genes *nirSTBMCFDLGH* que codifican las primeras, las nitrito reductasas de tipo Cu están codificadas por un solo gen, *nirK*, descrito por primera vez en *Achromobacter cycloclastes* e identificado, posteriormente, en *P. aureofaciens*, *P. aeruginosa* G-179, *Alcaligenes faecalis* y *Rhizobium "hedysari"*. En todos los casos, las enzimas son homotrímeros que contienen 6 átomos de Cu en su molécula, de los cuales 3 forman un centro mononuclear de tipo Cu I, y los tres restantes forman centros de tipo Cu II coordinados con residuos de histidina entre subunidades.

El empleo como sonda de hibridación de parte del gen *nirK* de *A. faecalis*, ha permitido la identificación, clonación y secuenciación de un ORF en *Bradyrhizobium japonicum* (Figura 1). De acuerdo con el alineamiento de las secuencias de aminoácidos, dicho ORF de *B. japonicum* tiene un alto grado de homología con enzimas nitrito reductasas respiratorias tipo Cu de *Rhodobacter sphaeroides* (73%), *Achromobacter cycloclastes* (76%), *Rhizobium "hedysari"* (77%), *Pseudomonas aeruginosa* (77%) y *Alcaligenes faecalis* (78 %).

Durante el análisis genético de las regiones de ADN adyacentes al gen *nirK*, para averiguar la posible existencia de otros genes implicados en el proceso de desnitrificación, se pudo identificar un ORF situado a 1,5 kb del sitio de inicio de la traducción del gen *nirK*, y con sentido de transcripción opuesto (Figura 1). El análisis de la secuencia primaria demostró que dicho ORF presentaba homología con la enzima coproporfirinógeno III oxidasa anaeróbica de *Escherichia coli* (47%), *Salmonella typhimurium* (48%) y *Rhodobacter sphaeroides* (53%). Dicha enzima está codificada por el gen *hemN*, e interviene en la ruta biosintética de grupos hemo en condiciones anaeróbicas.

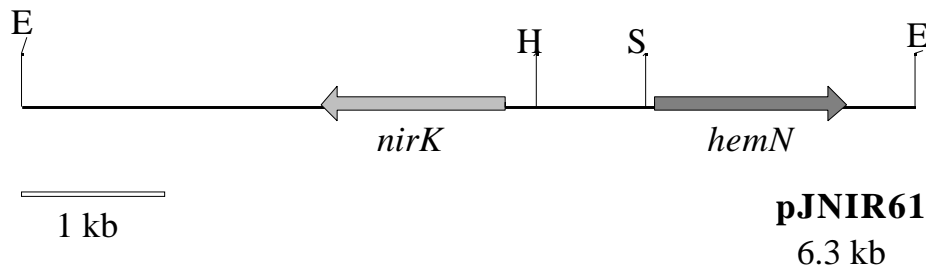


Figura 1. Mapa físico parcial de restricción de la región genética que contiene los genes *nirK* y *hemN* de *B. japonicum*. E, *EcoRI*; H, *HindIII*; S, *SmaI*.

A partir de la cepa parental USDA110, mediante mutágenesis dirigida por inserción de un gen de resistencia a Sm/Spc, se construyeron las mutantes GRK308 (*nirK*⁻) y GRN307 (*hemN*⁻), ambas incapaces de crecer microaeróbicamente con nitrato. Dada la incapacidad de GRK308 y GRN307 de crecer en tales condiciones, las cepas se cultivaron primero en medio completo y, posteriormente, se incubaron en condiciones microaeróbicas (1% O₂) y en presencia de nitrato durante 36 horas. Durante este tiempo de incubación, la cepa GRK308 acumuló 10 veces más nitrito en el medio que la cepa parental. Paralelamente, la actividad nitrito reductasa de la cepa mutante fue 6 veces inferior a la de la cepa parental. La inoculación de GRK308 en plantas de soja no afectó la formación de nódulos ni la capacidad de fijar nitrógeno, en relación con la cepa parental. En contraste, la inoculación de plantas de soja con la cepa GRN307 afectó drásticamente la formación de nódulos que, además, fueron incapaces de fijar nitrógeno.

Dado que la enzima coproporfirinógeno III oxidasa, está implicada en la biosíntesis de grupos hemo en condiciones microaeróbicas, se analizó el contenido en citocromos tipo *c* en las membranas y en la fracción soluble de las cepas parental USDA110 y mutante GRN307 mediante la técnica de tinción de la actividad peroxidasa intrínseca del citocromo *c* (Delgado et al. 1995). Después de la incubación en condiciones microaeróbicas (1% O₂), se pudo detectar un incremento en el contenido de citocromos *c* en las membranas de la cepa parental. Este incremento puede adscribirse a la inducción de las proteínas FixP y FixO, las cuales forman parte de la oxidasa *cbb*₃, codificada por el operon *fixNOQP*, que se expresa en bacteroides y cultivos microaeróbicos de *B. japonicum* (Preisig et al. 1993). Al contrario que ocurrió en la cepa parental, no se observó inducción de estos citocromos *c* en las membranas de la cepa GRN307.

Los estudios de regulación de los genes *nirK* y *hemN* se realizaron mediante la construcción de fusiones transcripcionales *nirK-lacZ* y *hemN-lacZ*. Dichas fusiones se transfirieron de forma independiente a la cepas de *B. japonicum* USDA110, 7403

(*fixL*) y 7360 (*fixJ*). En la cepa USDA110, la actividad β -galactosidasa fue basal cuando las cepas se incubaron en aerobiosis. Dicha actividad incrementó cuando las células, que contenían las fusiones *nirK-lacZ* o *hemN-lacZ* se incubaron en microaerobiosis. En el caso de *nirK-lacZ*, fue necesaria la presencia de nitrato en el medio de incubación para obtener la máxima expresión de *nirK*. Cuando se analizó la expresión de las fusiones *nirK-lacZ* y *hemN-lacZ* en los fondos genéticos *fixL* y *fixJ*, no se observó inducción de la actividad en condiciones microaeróbicas con o sin nitrato. La expresión de *nirK* y *hemN* está, por tanto, sometida a regulación microaeróbica mediada por *fixLJ*.

Este trabajo se ha financiado por la DGICYT, Proyecto PB94-0117 y el Programa de Ayuda a los Grupos de Investigación (CVI 180) de la Junta de Andalucía.

Bibliografía

- Chan, Y. K y Wheatcroft, R.1993. J. Bacteriol. 175,19-26.
Delgado et al. 1995. J. Bacteriol. 177,4927-4934.
Fisher, H.M. 1994. Annu. Rev. Microbiol. 58,352-386.
Holloway et al. 1996. J. Bacteriol. 178,1505-1514.
Preisig et al. 1993. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90,3309-3313.
Toffanin et al. 1996. Appl. Env. Microbiol. 62,4019-4025.
Zumft, W.G. 1997. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61,533-616.

REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE GALACTOGLUCANO EN *SINORHIZOBIUM MELILOTI* EFB1

Lloret J., Martín M., Bonilla I. y Rivilla R.

Departamento de Biología. Facultad de Ciencias Universidad Autónoma de Madrid.

Introducción

Los polisacáridos bacterianos son necesarios para la funcionalidad de la simbiosis *Rhizobium-leguminosa*. Exopolisacáridos (EPSs), lipopolisacárido (LPS), polisacárido capsular (CPS) y glucanos cíclicos tienen papeles esenciales en la formación del canal de infección y en el desarrollo del nódulo, aunque su función exacta no ha sido suficientemente aclarada. Además, estas moléculas han sido implicadas en la adaptación y supervivencia de *Rhizobium* en diversas situaciones ambientales, tanto en vida libre como en simbiosis, ya que cambios ambientales y fisiológicos provocan alteraciones en dichos polisacáridos. Entre estos cambios ambientales, las diferencias en salinidad y/o presión osmótica producen alteraciones en el LPS, EPSs (Lloret y col. 1995, 1997) y glucanos cíclicos en distintas estirpes de *Sinorhizobium meliloti*.

Muchos de los estudios fisiológicos y genéticos sobre la producción de polisacáridos extracelulares en *Sinorhizobium meliloti* han sido llevados a cabo sobre derivados de la estirpe SU47. Esta estirpe tiene la capacidad de producir dos exopolisacáridos distintos: succinoglicano (EPS I) y galactoglucano (EPS II). En condiciones de cultivo normales, SU47 sólo produce EPS I y la producción de este EPS es necesaria para la formación de nódulos funcionales en las plantas huésped. Sin embargo, en condiciones de limitación de fosfato, SU47 produce, además, EPS II que puede reemplazar funcionalmente al EPS I en la simbiosis con alfalfa. La producción de cada uno de estos EPSs puede ser diferenciada en medio TY, ya que las colonias que producen galactoglucano son mucosas y las que producen succinoglicano son fluorescentes en presencia de calcoflúor.

Las regiones génicas de SU47 implicadas en la síntesis de ambos EPSs se encuentran en el segundo megaplásmido aunque no están ligadas. Los genes necesarios para la producción de succinoglicano se denominan *exo* y la mayoría se encuentran en una región de 24 kb. Los 22 genes *exp* implicados en la síntesis de galactoglucano están organizados en 5 operones (Becker y col. 1997). En esta estirpe se conocen tres *loci* implicados en la regulación de la síntesis de galactoglucano. La mutación de cualquiera de dos loci cromosómicos *mucR* y *expR*, resulta en la producción de galactoglucano, por lo que se supone que codifican reguladores negativos; *mucR* ha sido caracterizado y codifica una proteína que reprime la expresión de los genes *exp* (Keller y col. 1995). El tercer *locus* corresponde a *mucS* (*expG*) que se encuentra ligado al resto de los genes *exp* en el megaplásmido. La proteína MucS activa la transcripción de los genes *exp* tanto en limitación de fosfato como en mutantes MucR (Astete y col. 1996).

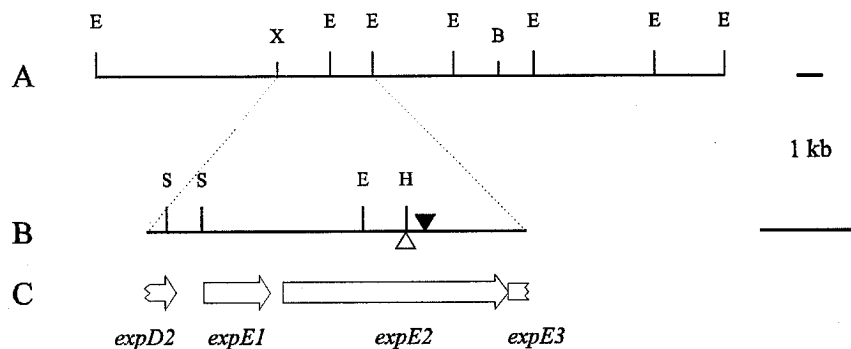
Resultados y Discusión

S. meliloti EFB1 produce simultáneamente succinoglucano y galactoglucano.

Las colonias formadas por EFB1 en medio TY son mucosas y fluorescen tes en presencia de calcoflúor, sugiriendo que las células producen simultáneamente los dos EPSs. Al crecer en medio con sal disminuye la mucosidad de las colonias pero estas conservan la fluorescencia en calcoflúor, indicando que el galactoglucano es el EPS cuya producción se reduce en presencia de sal. Mediante análisis colorimétrico se ha determinado la cantidad de EPSs que secreta la estirpe EFB1 en ambos medios, observándose una reducción del 40% en TY con sal, este resultado se correlaciona con el aspecto menos mucoso de las colonias. Además el espectro de H⁺-RMN correspondiente a los EPSs secretados por EFB1 contiene los picos característicos del galactoglucano como por ejemplo los correspondientes a enlaces a-anoméricos que no se encuentran en el succinoglucano.

Obtención y caracterización de mutantes de EFB1 que no producen galactoglucano.

S. meliloti EFB1 fue mutagenizado con Tn5::lacZ y plaqueado en medio con y sin NaCl, identificándose un mutante que no presentaba mucosidad en ninguno de los dos medios. Este mutante, denominado EFB107 presentaba fluorescencia en calcoflúor por lo que no estaba afectado en la síntesis de EPS I. El mutante era idéntico a EFB1 con respecto al crecimiento (con y sin sal), nodulación, fijación de nitrógeno y perfil de LPS.



EFB107 fue complementado por un cósmido del banco de genes de EFB1. Este cósmido, pBG1000 (Fig. 1), fue utilizado como sonda mostrando que EFB107 presentaba una inserción del transposón en una banda *EcoRI* de 1,6 kb. La banda fue subclonada e interrumpida por un cassette de resistencia a kanamicina. El plásmido resultante se utilizó para construir por homogenización el mutante EFB1011 que presentaba idéntico fenotipo que EFB107. Éste era igualmente complementado por el

cósmido PBG1000, demostrando de esta forma que el fenotipo no mucoso de los mutantes se debía a la inserción del transposón.

El mutante EFB1011 presentaba una reducción del 58% en la producción de EPS y su espectro de H⁺-RMN era idéntico al del succinoglicano indicando que los mutantes estaban afectados en la síntesis del galactoglucano. En presencia de sal la reducción en la producción de EPS por EFB1011 era menor de un 25%. Ambos resultados muestran que la reducción en mucosidad se debía fundamentalmente a una disminución en la producción de galactoglucano.

Las dos mutaciones se localizan en una misma ORF (Fig. 1) contenida en un fragmento *XhoI-EcoRI* de 3,7 kb, cuya secuencia es 85% idéntica a una región de los genes *exp* de SU47. La homología es máxima en las regiones codificantes y en una región intergénica dentro del operón *expE*. Sin embargo la región situada entre los operones *expD* y *expE*, donde se había sugerido la presencia del promotor de *expE* (Becker y col. 1997), presentaba una homología significativamente menor.

La regulación de la producción de galactoglucano es diferente en SU47 y EFB1.

La región situada entre los operones *expD* y *expE* solamente muestra un 68% de homología entre ambas estirpes y contiene una zona rica en A y T (Lloret y col. 1998). Para comprobar si esta región contenía un promotor se construyó una fusión transcripcional con *lacZ* en el plásmido pMP220. La construcción que contenía el promotor en el sentido de la transcripción (pRO1052) producía 8000 unidades Miller en EFB1 crecido en medio TY (Fig. 2), mientras que la misma construcción en sentido contrario producía menos de 200 unidades, demostrando que la expresión de *expE* es constitutiva cuando EFB1 crece en medio TY. Este resultado contrasta con los obtenidos por otros autores en SU47, que en las mismas condiciones no expresa *exp* (Keller y col. 1995). La expresión de los genes *exp* en EFB1 explica el aspecto mucoso de sus colonias, debido por tanto a la producción de galactoglucano. Cuando EFB1 (pRO1052) crecía en medio TY con NaCl se observó que la expresión de *expE* era dependiente de fase de crecimiento y directamente proporcional a la densidad óptica del cultivo, siendo la expresión 10 veces menor en el punto medio de la fase exponencial (Fig. 2). Esta cinética de expresión es similar a la que muestran promotores de otros microorganismos que requieren un factor sigma S y normalmente responden a estrés. En este caso la situación de estrés sería la baja salinidad, dado que la estirpe EFB1 fue aislada de nódulos de una planta crecida en una zona de marisma con una salinidad de aproximadamente 300 mM. Sin embargo se ha comprobado que otras situaciones de estrés tales como choque térmico no afectan a la expresión de dicho promotor.

Mediante la introducción por conjugación de la fusión transcripcional pRO1052 en SU47 se ha comprobado que el promotor de *expE* de EFB1 no es funcional indicando o bien la ausencia de los genes *mucR* o *mucS* en la estirpe EFB1 o bien la existencia de una regulación distintas en ambas estirpes. La secuenciación parcial del cósmido PBG1000 ha mostrado la presencia del gen *mucS* en una situación idéntica a la que presenta dentro del genoma de SU47. Además utilizando cebadores específicos del gen *mucR* de SU47 se ha amplificado el mismo gen de EFB1. Los dos genes *mucR*

presentan el 95% de identidad, mostrando un sólo cambio conservativo (E por D) en su secuencia de aminoácidos y mediante experimentos de transcripción inversa seguida de PCR

hemos demostrado que el gen *mucR* se expresa en EFB1. Mediante análisis de *Northern blot* hemos comprobado que las dos estirpes presentan transcritos *mucR* del mismo tamaño. Por lo tanto *mucR* no reprime la expresión de los genes *exp*, al menos en la estirpe EFB1.

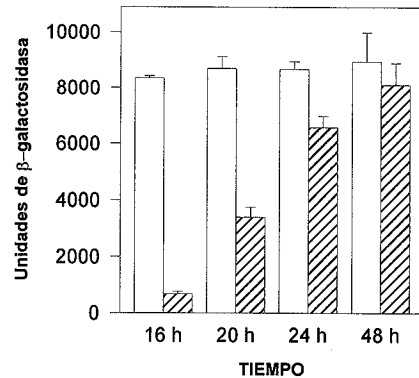


Figura 2. Expresión del promotor *expE* en medio TY (barras blancas) y TY+NaCl (barras rayadas).

Se han realizado detecciones en el extremo 5' del promotor del operón *expE* y se ha analizado la expresión de éstas en EFB1 mediante fusiones transcripcionales con *lacZ*. La detección que elimina los primeros 68 nucleótidos disminuye en un 80% la expresión de *lacZ* aunque se mantiene la regulación por sal.

Los resultados obtenidos muestran que la expresión de los genes *exp* en SU47 y EFB1 depende tanto de diferencias en los promotores como del fondo genético de la bacteria. Asimismo, muestran que estirpes de una misma especie aisladas de distintos ambientes pueden presentar diferente expresión de genes homólogos y esta expresión puede determinar la producción de componentes celulares importantes para la adaptación y supervivencia de la bacteria en diferentes condiciones ambientales.

Financiado por DGICYT PB95-0217-C0201.

Referencias

- Astete y Leigh. *Mol. Plant Microbe Interact.* 9:395-400. 1996
 Becker y col. *J. Bacteriol.* 179:1375-1384. 1997
 Keller y col. *Mol. Plant Microbe Interact.* 8: 267-277. 1995
 Lloret y col. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3701-3704. 1995
 Lloret y col. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1024-1028. 1998

EFECTO PLEIOTRÓPICO DE UNA MUTACIÓN EN EL PLÁSMIDO SIMBIÓTICO DE *SINORHIZOBIUM FREDII* HH103

Buendía-Clavería A.M.¹, Moussaid A.¹, Gil Serrano A.M.², Moreno J.³, Ollero F.¹ y Ruiz Sainz J.E.¹

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Apdo. 1095, 41080-Sevilla. ²Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, Apdo. 553, 41071-Sevilla. ³Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Apdo. 1095, 41080-Sevilla.

La gran mayoría de las estirpes de *Rhizobium* y *Sinorhizobium* estudiadas hasta la fecha contienen un plásmido que alberga los genes de nodulación (genes *nod*, *nol* y *noe*) y de fijación del nitrógeno (genes *fix*). Es por ello que a éste plásmido se le denomina plásmido simbiótico (pSym). El tamaño de los plásmidos simbióticos varía de unos rizobios a otros, pero en general es de gran tamaño (entre 200 y 1700 Kb). Obviamente, estos plásmidos pueden contener otros muchos genes que, en ciertos casos están claramente involucrados en la simbiosis de la bacteria con la leguminosa (como los genes *hup*).

En las dos últimas décadas se ha dedicado una especial atención al estudio de los genes *nod* y *fix* por su clara implicación en los procesos de reconocimiento planta-microorganismo y por su implicación en la morfogénesis nodular y establecimiento de la simbiosis funcional. Sin embargo, desde hace ya tiempo es conocido que otros grupos de genes juegan un papel importante en la relación simbiótica del microorganismo con la planta. Un ejemplo claro son los genes involucrados en la síntesis de exopolisacáridos, lipopolisacáridos y glucanos cíclicos. De igual forma, las mutaciones en las rutas de biosíntesis de algunos aminoácidos y, en especial, de las bases purínicas y pirimidínicas tienen un efecto muy adverso en la capacidad simbiótica de la bacteria. Así, por ejemplo, los mutantes defectivos en la ruta de biosíntesis de las purinas forman pseudonódulos. A menudo las mutaciones en estas rutas de biosíntesis producen fenotipos pleiotrópicos como, por ejemplo, alterar los perfiles de lipopolisacáridos en geles de SDS-poliacrilamida (Djordjevic y col. MPMI 9:114-124.1996).

En los últimos años nuestro grupo de investigación, además del estudio de los genes de nodulación de *Sinorhizobium fredii* HH103, ha buscado mediante mutagénesis otros grupos de genes que tengan una influencia clara en la capacidad simbiótica de la bacteria. Para ello se realizaron varias mutagénesis en la estirpe HH103 con el transposón Tn5-Mob. La búsqueda de mutantes (en la morfología de la colonia) se realizó *de visu* en 80.000 colonias que, presumiblemente, tenían una inserción del transposón. Las características que se tuvieron en cuenta en la primera selección fueron el tamaño de la colonia, su mucosidad, su color, (más transparente o más blanquecina) y las posibles variaciones en la intensidad de la absorción del colorante Rojo Congo. Varias decenas de colonias que mostraban alguna variación con respecto a las características antes mencionadas, fueron investigadas posteriormente en ensayos de nodulación con la soja (variedad Williams), encontrándose mutantes que

formaban pseudonódulos y mutantes cuya capacidad fijadora de nitrógeno era nula o estaba muy reducida.

Uno de estos mutantes, denominado SVQ293 (anteriormente L-105) ha sido objeto de un estudio más detallado. Este mutante forma una colonia más mucosa y blanquecina que su estirpe parental HH103-1 (un derivado Str-r de HH103) y absorbe menos Rojo Congo. Además, el perfil del lipopolisacárido (LPS) del mutante SVQ293 respecto a su estirpe parental muestra una mayor movilidad electroforética de las bandas que, presumiblemente, corresponden al LPS I (lípidio-A + oligosacárido interno o “core” + antígeno-O). También se observan variaciones en la zona denominada LPS II (lípidio-A + oligosacárido interno + una, o ninguna, subunidad del antígeno-O).

Aunque el mutante SVQ293 crece normalmente en medio rico TY, no es capaz de crecer en medio mínimo de Bergensen (MMB) si no se adiciona tiamina. La adición al medio líquido MMB de otras vitaminas normalmente empleadas en los cultivos de *Rhizobium*, como la biotina y el pantoténico, no habilita al mutante SVQ293 para crecer en el medio MMB. Por tanto, aparentemente existe un requerimiento específico de la adición exógena de tiamina para que el mutante SVQ293 pueda crecer en el medio mínimo MMB.

El mutante SVQ293 puede formar nódulos en la soja (*Glycine max*), pero estos nódulos no fijan nitrógeno a los 33 días la inoculación. A este tiempo, el promedio del número de nódulos producidos por el mutante SVQ293 es igual al de HH103-1 (42 y 46, respectivamente). La ausencia de fijación de nitrógeno de los nódulos inducidos por SVQ293 no se debe a que la bacteria no sea capaz de infectar las células vegetales, ya que las preparaciones de secciones de nódulos muestran infecciones intracelulares.

En base a estos resultados se podría considerar que el mutante SVQ293 forma nódulos no fijadores de nitrógeno en la soja (variedad Williams). Sin embargo, cuando se cultivan las plantas inoculadas con SVQ293 durante un tiempo más prolongado se puede detectar el inicio de la fijación del nitrógeno. Así, a los 60 días, los nódulos de las plantas inoculadas con SVQ293 mostraban una actividad nitrogenasa que, aunque era muy débil, era detectable. A este tiempo, es claramente diferente el número de nódulos producido por el mutante (52) del producido por la estirpe parental (154). Por tanto, aunque en las primeras semanas el número de nódulos producidos por SVQ293 y HH103-1 son iguales, en las semanas siguientes se produce una clara descompensación a favor de la estirpe silvestre.

En una fase aún más tardía (88 días), el número de nódulos producido por la estirpe HH103 sigue siendo claramente mayor que el producido por el mutante SVQ293 (176 y 69, respectivamente). Sin embargo, la actividad nitrogenasa de los nódulos producidos por el mutante se ha duplicado con respecto a la que tenían a los 60 días. Esta actividad nitrogenasa sigue siendo débil (un tercio de la de HH103-1 a ese mismo tiempo), pero suficiente para que las plantas adquieran un color verdoso y aumenten de porte. Como resumen de estos resultados podemos concluir que la mutación en SVQ293 afecta de forma clara a su eficiencia de nodulación y a su capacidad para fijar nitrógeno.

Dado que el mutante SVQ293 requiere tiamina para poder crecer en el medio MMB, hemos investigado si la adición exógena de tiamina a la solución nutritiva empleada para el crecimiento de las plantas de soja podía, de alguna forma, paliar el defecto simbiótico de la bacteria. Los resultados obtenidos, indican que se produce una

mejora significativa en la capacidad simbiótica del mutante SVQ293 si la tiamina está presente en la solución nutritiva para la planta (solución nutritiva de Fahraeus). Así, el número de nódulos producido por SVQ293 incrementa de 49 (sin tiamina) a 68 (con tiamina) y la actividad nitrogenasa de las plantas con tiamina es superior (1.940 nmoles etileno/planta x hora) a la de las plantas que han crecido en ausencia de la vitamina (360 nmoles etileno / planta x hora). Este efecto positivo de la tiamina no se aprecia en las plantas inoculadas con HH103, por lo que los efectos positivos de la adición de tiamina deben ser específicos para el mutante SVQ293 y no un efecto general.

Otro aspecto que hemos estudiado es la capacidad competitiva del mutante SVQ293 para nodular en la soja. En un ensayo de competitividad en la variedad Williams de soja la estirpe HH103-1 ocupó todos los nódulos analizados (125) cuando la proporción de los inoculantes (HH103-1 / SVQ293) fue de 1:1. Incluso en proporción 1:10 a favor del mutante, sólo en dos nódulos (de 125 analizados) se pudo detectar la presencia del mutante SVQ293. La adición de tiamina al medio nutritivo de la planta no mejoró la nula capacidad competitiva del mutante SVQ293. De estos resultados se puede concluir que la mutación de SVQ293 ha afectado drásticamente a la capacidad competitiva de la bacteria y que, en contraste con los parámetros de nodulación y fijación de nitrógeno, la adición exógena de tiamina no produce ninguna mejora de la capacidad competitiva de la bacteria.

Dado que las estirpes de *S. fredii* se caracterizan por poseer un amplio rango de nodulación, hemos investigado si la mutación producida en SVQ293 ha afectado también a la capacidad simbiótica de la bacteria con otras leguminosas. Los resultados obtenidos muestran que, en todas las plantas ensayadas (excepto en el caso de *Sophora tomentosa*), la capacidad simbiótica de la bacteria ha sido afectada negativamente. Este efecto negativo varía desde un retraso en el comienzo de la fijación del nitrógeno (*Cajanus cajan*, *Kummerowia stipulacea* y *Macroptilium atropurpureum*) hasta la formación de simbiosis no fijadoras de nitrógeno (*Indigofera tinctoria* y *Desmodium canadense*), o incluso la no aparición de nódulos (*Albizia lebbek* y *Macrotyloma axyllare*). Por tanto, la mutación ocurrida en SVQ293 no tiene el mismo efecto en todas las plantas hospedadoras.

Sorprendentemente, y de forma contraria a lo visto hasta ahora, el mutante SVQ293 es mucho más efectivo que su estirpe parental para nodular en la leguminosa arbórea *Sophora tomentosa*. Así, a los cuatro meses de la inoculación, las plantas inoculadas con HH103-1 mostraban claros síntomas de deficiencia de nitrógeno, mientras que las plantas inoculadas con SVQ293 estaban verdes. A los nueve meses de la inoculación las plantas inoculadas con HH103-1 estaban ya verdes, pero su porte era mucho menor que el de las plantas inoculadas con SVQ293. En los primeros meses el inoculante de HH103-1 es prácticamente incapaz de formar nódulos en *S. tomentosa*, mientras que el mutante SVQ293 nodula, aparentemente, sin mayores problemas. Dado que el mutante SVQ293 presenta un perfil de LPS alterado, hemos investigado si, en una inoculación conjunta, la estirpe HH103-1 es capaz de bloquear la nodulación del mutante SVQ293 en *S. tomentosa*. Los resultados obtenidos indican que, efectivamente, la presencia de la estirpe parental HH103-1 reduce drásticamente la formación de nódulos de su derivado SVQ293. Así, mientras en inoculaciones por separado la estirpe HH103-1 formó sólo un promedio de 16 nódulos /planta (a los seis meses de la inoculación) y el mutante SVQ293 formó 184 nódulos /planta, la inoculación conjunta (8×10^7 bacterias de cada inoculante) produjo sólo un promedio de 39 nódulos/planta. Por tanto, la estirpe HH103-1 bloquea la nodulación de SVQ293. Es posible que la superficie de HH103 contenga elementos que provoquen

incompatibilidad para nodular en *Sophora* y que los cambios ocurridos en el mutante SVQ293 hayan hecho “más compatible” la simbiosis de la bacteria con esta leguminosa. A favor de esta idea está el hecho de que la coinoculación del mutante SVQ293 con el mutante SVQ116 (un derivado de HH103 mutando en el gen *nodA*, por lo que no puede producir factores de nodulación) también muestra una reducción del número de nódulos formados (65 nódulos /planta). Por tanto, el bloqueo de la nodulación es, en cierta medida, independiente de la capacidad de la estirpe bloqueante para formar los factores de nodulación. Sin embargo, la reducción de la capacidad simbiótica que sufre el mutante SVQ293 por la presencia del mutante SVQ116 es menor que la que sufre por la presencia de la estirpe silvestre HH103-1, ya que la inoculación SVQ293 + SVQ116 produce un peso seco de nódulos (1,09 gramos) que es exactamente igual al producido por la inoculación individual con el mutante SVQ293 (1,10 gramos). Este hecho contrasta con la reducción del peso nodular (0,33 gramos) que se observa en la coinoculación SVQ293 + HH103-1. Estos resultados alertan sobre la complejidad del proceso responsable del bloqueo.

A la vista de todos estos resultados, se decidió realizar un análisis químico de la superficie del mutante SVQ293. Siguiendo los protocolos estándar para el aislamiento del LPS, y mediante estudios de análisis de monosacáridos, análisis de metilación, espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear se determinó la estructura de la subunidad trisacáridica de un polisacárido que aparece en las preparaciones obtenidas a partir de las células de SVQ293, pero que no se encuentra en la estirpe silvestre HH103-1. Esta subunidad está compuesta por -D-galactopiranososa, -D-ribofuranosa y -5-O-Metil-KDN (Gil-Serrano y col., enviado para su publicación). La estructura de este polisacárido es nueva, es la primera vez que se describe la presencia del KDN en un polisacárido de *Rhizobium* y es la primera vez que se describe una estructura polisacáridica conteniendo 5-O-Me-KDN. En la estirpe silvestre se detecta la presencia de KDO, pero no de KDN, por lo que es posible que la mutación ocurrida en SVQ293 sea, directa o indirectamente, responsable de la aparición de este polisacárido nuevo.

Mediante el empleo del plásmido pSUP202 se rescató el transposón Tn5-Mob y el ADN del mutante SVQ293 que está adyacente a una de las IS del transposon. La secuenciación parcial de este fragmento dio homología (sólo en un pequeño fragmento) con el gen *psiB* de *R. leguminosarum*. A su vez, se aisló un cósmido de la genoteca de HH103 que complementaba al mutante SVQ293 para crecer en medio sólido MMB carente de tiamina. Empleando como sonda el fragmento de ADN de SVQ293 que está adyacente a la inserción se decidió secuenciar un fragmento *SmaI-EcoRI* de 2,8 Kb. La secuenciación de este fragmento indica que la inserción del transposon Tn5-Mob se encuentra dentro de una posible ORF1 que tiene un tamaño muy reducido (codificaría para una proteína de sólo 41 aa). Solapando con el final de esta posible ORF1 existe el inicio de otra posible ORF2 que, a su vez, solaparía con una posible tercera ORF3. Todas estas posibles ORFs se transcribirían en la misma dirección. Hasta ahora, las comparaciones con los bancos de secuencias no dan una homología clara con ninguna proteína conocida. La ORF1 codificaría para una proteína que tendría una pequeña región muy homologa a la proteína PsiB de la bv. *phaseoli*. Otra pequeña región (29 aa) de la posible proteína codificada por la ORF1 presenta una cierta homología, aunque baja (34,5 identidad), con una región de ThiX, una proteína presuntamente implicada en la biosíntesis de la tiamina en *Corynebacterium glutamicum*. La secuencia de nucleótidos de zona donde se encuentran las posibles ORF1, ORF2 y ORF3 es prácticamente idéntica a una región

del plásmido simbiótico de la estirpe NGR234 (Freiberg y col. Nature 387:394-410. 1997). Los autores de éste trabajo no han asignado ninguna posible ORF a esta zona.

ESTUDIO GENÉTICO Y SIMBIÓTICO DE LOS GENES *NODH*, *NODP* Y *NODQ* DE *RHIZOBIUM TROPICI* CIAT899

Manyani H., Marroquí S., Folch J. L., Sousa, C. y Megías M.

Dpto. de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. Apdo. 874. Sevilla 41080. hamid@cica.es

Las bacterias del genero *Rhizobium* son capaces de establecer una relación simbiótica con leguminosas. En esta interacción la planta cede parte de sus carbohidratos que servirán como fuente de carbono para los rizobios, y la bacteria aporta el nitrógeno atmosférico fijado. En esta interacción simbiótica se produce un intercambio de señales químicas (moléculas señal) entre la bacteria y la planta. La síntesis y la exportación de las moléculas señal están bajo el control de los genes de nodulación, tales como: los genes comunes *nodABC* y los específicos *nodH*, *nodS* y *nodZ* entre otros.

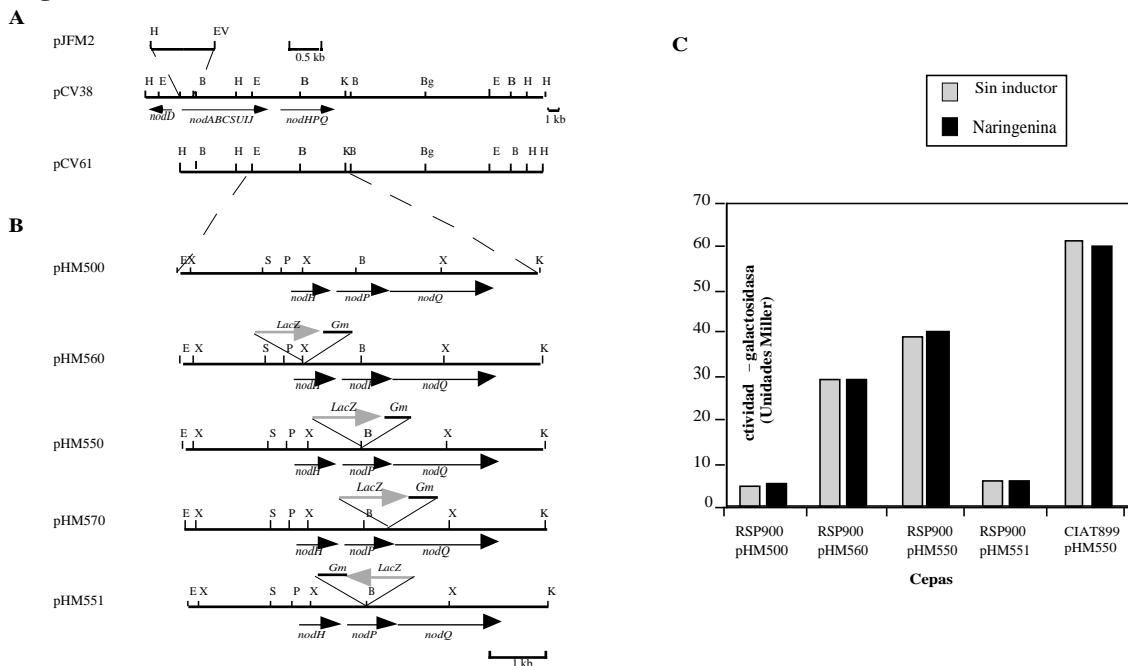
Los genes *nodH*, *nodP* y *nodQ* son los responsables de la sulfatación de la molécula señal. Los genes *nodP* y *nodQ* se encuentran presentes en varias especies de rizobios, tales como *Sinorhizobium meliloti* (Roche y col., 1991), *Azorhizobium* (Vieille y Elmerich, 1990), *Rhizobium* sp N33 (Cloutler y col., 1996), *Rhizobium tropici* CIAT899 (Folch y col., 1996), y *R. tropici* CFN299 (Laermans y col., 1996). El gen *nodH* se encuentra presente, además de en las especies indicadas salvo en *Azorhizobium*, en *Rhizobium "Hedysari"* (Tola y col., 1994) y en *Rhizobium* sp NGR234 que le denominaron *noeE* aunque manteniendo la misma función que el gen *nodH* (Hanin y col., 1997). Los genes *nodH*, *nodP* y *nodQ* se han estudiado ampliamente en *S. meliloti*, en esta especie, los genes *nodPQ* se transcriben juntos y codifican la síntesis de las dos subunidades de la enzima ATP-sulfurilasa, CysD y CysN respectivamente (Schwedock y col., 1990). Sin embargo, el gen *nodH* presenta una ubicación diferente en cada una de las especies estudiadas. En *S. meliloti*, este gen se sitúa próximo a los genes *nodeFG* y se transcribe en dirección opuesta a partir de su propia caja de nodulación. Mientras que, en *R. "Hedysari"* este gen se encuentra en la misma unidad transcripcional que los genes comunes *nodABC*, en *Rhizobium* sp N33, *R. tropici* CIAT899 y CFN299 se sitúa a continuación del operón *nodABC*SUIJ. En *S. meliloti* se ha descrito que este gen codifica una actividad sulfotransferasa (Schulze y col., 1995) siendo el responsable de sulfatar el extremo reductor de la molécula señal.

En nuestro laboratorio, disponemos de diversos cósmidos aislados del banco de genes de *R. tropici* CIAT899. Algunos de estos cósmidos tales como el pCV38 y el pCV61, son capaces de producir molécula señal idéntica a la de la cepa silvestre, y pueden inducir nódulos en todas las plantas hospedadoras de *R. tropici* CIAT899. El análisis de la molécula señal del cósmido pCV61, cósmido que lleva al igual que el pCV38 todos los genes necesarios para la nodulación pero carece del gen regulador *nodD*, demuestra una expresión constitutiva de los genes *nod*, lo que sugiere la presencia de una caja de nodulación delante del gen *nodA*. Sin embargo, los estudios de la actividad -galactosidasa del plásmido pJFM2, plásmido que lleva la fusión transcripcional con el gen *lacZ* de la zona inter *nodD-nodA*, demostraron que las pseudo-cajas de nodulación halladas en esta zona no son funcionales, y por lo tanto, la transcripción de los genes *nodABC*SUIJ está bajo el control del promotor del gen de la kanamicina del plásmido utilizado como vehículo de clonación en la preparación del banco de genes de *R. tropici* CIAT899. Posteriormente, este dato ha sido confirmado mediante la secuenciación del fragmento.

La presencia de sulfato en la molécula señal del transconjugante RSP900/pCV61

sugiere la existencia de los genes *nodH*, *nodP* y *nodQ* en este cósmido. A partir del cósmido pCV61 se subclonaron varios fragmentos que se utilizaron para el aislamiento y la caracterización de los genes *nodH*, *nodP* y *nodQ* (Figura 1.A). El estudio de la secuencia de estos genes demuestra que los marcos abiertos de lectura son de 750 pb, 900 pb y 1899 pb respectivamente. Simultáneamente, se hizo la mutagénesis de los genes *nodH*, *nodP* y *nodQ* mediante la doble recombinación usando el plásmido suicida (pJQ200) con la presencia de sacarosa en el medio. El análisis de los transconjugantes obtenidos indica que el mutante RS200 (inserción en el gen *nodH*) presenta una molécula señal no sulfatada; sin embargo, los mutantes RS400 y RS300 (inserciones en los genes *nodP* y *nodQ* respectivamente) presentan una sulfatación parcial de su molécula señal. Estos resultados sugieren, al igual que en *S. meliloti*, la presencia de al menos una segunda copia de cada uno de los genes *nodP* y *nodQ*. Además, las hibridaciones del ADN total de *R. tropici* CIAT899 y de la cepa curada RSP900 frente a sondas internas de los genes *nodP* y *nodQ* de *S. meliloti*, apoyan la hipótesis de la presencia de las copias cromosómicas. En plantas, los tres mutantes tienen el mismo comportamiento que la cepa silvestre CIAT899 en los ensayos de nodulación en frijol. Sin embargo, en *Leuceana*, el mutante *nodH* presenta un leve retraso y una reducción de aproximadamente del 30% del número de nódulos. Estos datos indican el papel del sulfato en la especificidad de la nodulación, aunque no sucede de una forma tan estricta como es el caso de *S. meliloti*, donde mutantes en la sulfatación son incapaces de inducir la nodulación en alfalfa, hospedador habitual de esta cepa. Así pues, la determinación del rango de hospedador en *R. tropici* está controlada por la combinación de las distintas modificaciones del factor Nod sintetizado por los genes comunes *nodABC*

Figural



El plásmido pHM500 (Figura 1.A), que lleva los genes *nodH*, *nodP* y *nodQ* completos y una región de 2,2 Kb delante del inicio del gen *nodH*, complementó simbiótica y bioquímicamente los mutantes RS200, RS300, y RS400. Este hecho sugiere la presencia de una zona promotora de los genes *nodH*, *nodP*, y *nodQ* independiente del la zona promotora del operón *nodABC*. En estos 2.2 Kb situadas delante del gen *nodH* se localizó una secuencia de 550 pb que separa el codón de terminación del gen *nodJ* y el codón de iniciación del gen *nodH* (Figura 2).

En esta zona no se detectó ninguna región que presente el mismo consenso de las cajas de nodulación típicas más conservadas en *Rhizobium*. Sin embargo, se han localizado dos zonas bastante homólogas a algunas cajas de nodulación (Figura 2.A. zonas subrayadas). La primera zona (posición -210 con respecto al inicio del gen *nodH*) presenta una homología de 53% con la caja de nodulación del gen *noeE* de *Rhizobium* sp NGR234 y la segunda zona (posición -327 con respecto al inicio del gen *nodH*) presenta una homología de 50% con la caja de nodulación de *R. leguminosarum* bv *trifolii*, aunque ninguna de estas dos regiones conserva la estructura de consenso de una caja de nodulación típica. También, dentro de este fragmento se ha localizado una secuencia de 285 pb (Figura 2.A, señalada entre dos asteriscos) que presenta una homología de 63,2 % con el ORF o346 de *E. coli* de función desconocida. De la misma forma, el análisis de la secuencia de la región situada delante del gen *nodP* demuestra la presencia de dos regiones (en la posición -398 y en la posición -173 con respecto al inicio del gen *nodP*) similares a las encontradas en la región promotora de los genes *nodP* de *S. meliloti* y de *A. brasilense* (Vieille y Elmerich., 1990) (Figura 2.B). Esta región es una secuencia de unión a la proteína NtrA características de los promotores *nif*. El motivo GGN₁₀GC se encuentra en todos los promotores reconocidos por el complejo sigma 54-ARN polimerasa de la región -24/-12 del inicio de la transcripción independientemente del inicio de la traducción.

Figura2

A.

```

GTCTGAT GCCCTGAAGC CGTGCCCGCT TACGAGACGG AGTGATTAATGC
AGTATCG CGGACTCGGC CGCAGCGGCC TGAAAGTAAG CGCGTTCGGCTTG
GGTACGA TGGGTGCGGG AGAGCAGAAC ACGGAAGCCGAGGCACGCGCGCA
ACTCGGG GCGGCTCTCG ATGTAGGCGT AAACTTTGTC GACACGGCGGAGA
TGTATCC TGTACCACCG CGCGTCGGGA CGACGGCTCT CGGCGCGCTACGA
TATCGACAGT TGGCTGCGCA AAACCGGCCG CAGGAGGGAT GTGGTGCTTT
CCTGACAG CGCGCTCAG CTACACGCGC GCAAACCTTT TCGAAGCAGTCGA
TGCCAGC CTTCAAAGGC TGCAGACGGA TCATACCGAT CTGTTTCAGCTGC
ACTGGCC AGACCGCAGT ACGAACGTCT TTCAATAGCC TGGCGTAAAGAAC
CAGCCGG AGAGCCCTTA CACTCGTCGG CGCAACGGCG AAGTTCTTGTCG
GGCGCCA TCCCACCTT TGTGATCAAT AACAGT GGAA SD nodH CATGCGCAATG

```

B.

CTGGTCCGCTTCTGCA		
<i>Rhizobium tropici</i>	(-398)	CTGGTGCAGGCAAGGA
<i>Rhizobium tropici</i>	(-173)	CTGGGAGCTCCCGCGCA
<i>Rhizobium meliloti</i>	(-389)	GTGGGCTTGCAATTTGCA
<i>Rhizobium meliloti</i>	(-75)	TTGGGATGCCTTGAGCG
<i>Azospirillum brasilense</i>	(-226)	GTGGAGCCGCTGGTGCC

Para determinar la organización y el modo de regulación de los genes *nodH*, *nodP* y *nodQ*, hemos construido fusiones transcripcionales con el gen *lacZ* en cada uno de los tres genes (*nodH*, *nodP* y *nodQ*) del plásmido pHM500 (Figura 1.B). Los niveles de la actividad β -galactosidasa bajo condiciones normales de crecimiento demuestra un incremento de 6 a 8 veces con respecto a la actividad del plásmido pHM551, donde el gen *lacZ* está insertado en dirección contraria al sentido de la transcripción de los genes *nodH*, *nodP* y *nodQ* (Figura I. C.). Estos resultados indican que los tres genes se transcriben a partir de un promotor localizado delante del gen *nodH*. Además, la comparación de los niveles de la actividad β -galactosidasa de las tres fusiones, pHM560, pHM550 y pHM570 demuestran que no hay diferencias significativas. Los resultados obtenidos, junto con el hecho de que tan sólo 6 pb separan *nodH* de *nodP* y la ausencia de terminadores, podrían apoyar la hipótesis de que estos genes se transcriben a partir del mismo promotor, formando así una única unidad transcripcional. Sin embargo, estudios de complementación a nivel bioquímico han demostrado que los plásmidos pHM5511 (solo el gen *nodH* clonado en el plásmido pMP92) y pHM550 han sido capaces de complementar parcialmente el mutante RS200. Estos datos sugieren una transcripción independiente del gen *nodH* respecto a los genes *nodPQ* o por lo menos una regulación desconocida hasta el momento. Por otro lado, la comparación de la actividad β -galactosidasa de las

fusiones pHM550, pHM560 y pHM570 en la cepa silvestre CIAT899 y en la RSP900, en ausencia y en presencia del inductor, sugiere una transcripción independiente de los genes *nodH*, *nodP* y *nodQ* del gen regulador *nodD*. Igualmente, el incremento (de 6 a 8 veces) de los niveles de actividad de las fusiones de los genes *nodH*, *nodP* y *nodQ* con el gen *lacZ* en *R. tropici* con respecto a la actividad - galactosidas en *E. coli* indican que este promotor es propio de *Rhizobium*, al igual que sucede en los promotores de NtrA típicos de los genes *nif*.

Para estudiar la funcionalidad de los genes *nodH*, *nodP* y *nodQ* en otros fondos genéticos, se transfirió el plásmido pHM500 a otros rizobios, tales como: *S. fredii*, *R. etli*, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* y *S. meliloti*. El análisis de la molécula señal de los transconjugantes demuestra que estos genes sólo han sido capaces de sulfatar las moléculas señal de las cepas cuyos factores de nodulación disponen de un O-C6 libre en su extremo reductor, como sucede en la cepa EK1455 (mutante *nodH* de *S. meliloti*) y en la cepa SVQ287 (mutante en los genes de la fucosilación del factor Nod de *S. fredii*). Estos datos sugieren que los genes *nodH*, *nodP* y *nodQ* están implicados en la sulfatación específica de la molécula señal estando controlada fundamentalmente por la actividad sulfotransferasa codificada por el gen *nodH*, mientras que los genes *nodPQ* determinan la cantidad de molécula señal sulfatada, controlando la síntesis de las formas activas del sulfato, la adenosina-5'-fosfosulfato (APS) y la 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (PAPS) (Poupot y col., 1995).

Referencias

- Cloutler y col., 1996. Mol Plant Microbe Interact 9:720-728
Folch y col., 1996. Mol Plant Microbe Interact 9:151-163
Hanin y col., 1997. Microbiol 24:1119-1129
Laeremans y col., 1996. Plant Microbe Interact 9 :492-500
Poupot y col., 1995. FEBS Lett 368:536-540
Roche y col., 1991. Cell 67:1131-1143
Schultze y col., 1995. Proc Natl Acad Sci 92:2706-2709
Schwedock y col., 1990. Nature 348:644-647
Tola y col., 1994. 7th IS-MPMI, University of Edinburgh, Scotland.

La financiación de estas investigaciones se ha realizado mediante un proyecto de CICYT, nº BIO93-0716-C04-01.

LA ACTIVIDAD HIDROGENASA ES REGULADA POR GENES SIMBIÓTICOS EN *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* BV *VICIAE*

Rey L., Martínez M., Gutiérrez D., Brito B., Hernando Y., Cabrera E., Palacios J. M., Imperial J. y Ruíz-Argüeso T.

Laboratorio de Microbiología. Dpto. Biotecnología, E.T.S.I. Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid y C.S.I.C., 28040 Madrid. lrey@bit.etsia.upm.es

Algunas cepas de *Rhizobium leguminosarum* contienen un sistema enzimático capaz de reciclar el hidrógeno que se produce en los nódulos de leguminosas como subproducto obligado de la fijación de nitrógeno. Este sistema tiene como componente principal una hidrogenasa heterodimérica con níquel y hierro y está codificado por una agrupación de 18 genes, *hupSLCDEFGHIJKhypABFCDEX*, localizados en el plásmido simbiótico. Estudios preliminares demostraron la existencia de un patrón diferencial de la expresión de los genes implicados en la actividad hidrogenasa: los genes *hupSLCDEFGHIJKhypA* sólo se expresan en simbiosis mientras que los genes *hypBFCDEX*, además, se inducen en células vegetativas crecidas en microaerobiosis.

La transcripción de los genes estructurales de la hidrogenasa (*hupSL*) tiene lugar desde un promotor -24/-12 dependiente de RpoN e IHF y situado delante de *hupS* (promotor *hupSp*). Estudios de expresión de este promotor mediante fusiones *hupSL'-lacZ* han permitido delimitar una región de ADN entre las posiciones -173/-87 necesaria para su activación. El análisis de la expresión de la fusión *hupSL'-lacZ* en *Escherichia coli* ha permitido demostrar que las proteínas NifA de *Klebsiella pneumoniae* o *Sinorhizobium meliloti* activan la expresión de *hupSL* (1). Este resultado es consistente con la coexpresión temporal y espacial de *hupSL* y de los genes *nifH* y *nifA* en nódulos de guisante (2). La idea de la activación de *hupSp* por NifA se ve reforzada por la existencia de retardación específica de un fragmento de ADN que incluye la región -173/-87 cuando se incuba en presencia de una proteína de fusión formada por la MBP (proteína que une maltosa) y el extremo C-terminal de NifA de *R. leguminosarum*. Sin embargo, esta región no contiene ninguna secuencia consenso de unión de NifA (UAS, TGT-N10-ACA). La posibilidad de que la acción de NifA fuera indirecta se descartó mediante un ensayo de inhibición de la expresión de los genes *nif* por la presencia de múltiples copias de *hupSp*: la introducción de plásmidos multicopia conteniendo *hupSp* en *K. pneumoniae* ocasionó una drástica disminución de la actividad nitrogenasa, probablemente debido a la titulación de NifA.

Aunque no se han identificado la existencia de UAS en *hupSp* ni en una región de 4 kb delante de *hupS*, sí se han encontrado tres medias secuencias UAS (ACA, ACA y TGT) en la zona -173/-87. Recientemente se ha descrito que la proteína NifA es capaz de unirse a estas medias secuencias en *Rhizobium etli* (3). El estudio de la importancia de estas medias secuencias para la activación de *hupSp* está siendo acometido por delecciones, mutagénesis dirigida y retardaciones en geles. Los primeros resultados apuntan a que las tres cajas están implicadas en la unión de NifA, postulándose un modelo cooperativo donde NifA se uniría débilmente a las medias cajas por separado pero en el que esta unión se vería reforzada por la interacción de unas moléculas de NifA con otras.

La transcripción del operón *hypBFCDEX*, implicado probablemente en la incorporación de níquel a la hidrogenasa, depende de un promotor tipo Fnr localizado dentro del gen *hypA* (P5b). *R. leguminosarum* UPM791 contiene dos genes (*fnrN1* y *fnrN2*) que codifican para proteínas con un 87,5 % de similitud entre ambas, incluyendo el motivo rico en cisteínas característico de las proteínas similares a Fnr (4 y 5). Uno de estos genes (*fnrN2*) se localiza en el plásmido simbiótico y el otro (*fnrN1*) en el cromosoma. Mediante la utilización de fusiones *hypB'-lacZ* se demostró que los genes *fnrN1* y *fnrN2* controlan la expresión del operón *hypBFCDEX*. Además se observó retardación específica de un fragmento de ADN que contenía el promotor P5b por extractos celulares con proteínas FnrN.

Mientras que mutantes sencillos en los genes *fnrN1* y *fnrN2* presentaron en guisantes un fenotipo silvestre, los dobles mutantes en ambos genes exhibieron un fenotipo Hup⁻ y Fix⁻. La incapacidad de sintetizar hidrogenasa por los bacteroides del doble mutante se debe probablemente a la falta de expresión del operón *hypBFCDEX*, ya que dicho mutante no es capaz de activar P5b en células vegetativas microaeróbicas. La razón del fenotipo Fix⁻ parece deberse a la regulación por FnrN del operón *fixNOQP*, esencial para el metabolismo microaeróbico de los bacteroides. Este operón ha sido aislado en la cepa UPM791 de *R. leguminosarum* (5) y basándonos en los estudios realizados en *S. meliloti* y *Bradyrhizobium japonicum*, que contienen operones *fixNOQP* análogos, postulamos que codifica para una citocromo oxidasa terminal de tipo *cbb₃* que es inducible en microaerobiosis. El análisis de una fusión *fixNOQP'-lacZ* demostró que el operón *fixNOQP* de *R. leguminosarum* es inducible en microaerobiosis desde un promotor que contiene una caja anaeróbica, y que su expresión es dependiente de *fnrN* y no ocurre en el doble mutante *fnrN1 fnrN2*. Por otro lado también se ha podido identificar la presencia de dos cajas anaeróbicas en cada una de las regiones promotoras de los genes *fnrN1* y *fnrN2*, y se ha demostrado la existencia de una autorregulación positiva de FnrN sobre sus propios promotores. El papel específico de cada una de las cajas se está estudiando actualmente mediante mutagénesis y análisis de fusiones *fnrN1-lacZ* y *fnrN2-lacZ*.

En su conjunto, los resultados sugieren que el sistema hidrogenasa de *R. leguminosarum* no solamente está ligado a los genes *nif* en el plásmido simbiótico sino que su expresión ha quedado bajo el control de genes reguladores simbióticos, lo que asegura que la síntesis de la hidrogenasa se produzca en un ambiente enriquecido en hidrógeno como ocurre en los nódulos de leguminosas.

Esta investigación está financiada por la DGICYT (PB95-0232) y CICYT (BIO96-0503).

1. Brito *et al.* (1997) PNAS **94**: 6019-6024
2. Brito *et al.* (1995) Mol. Plant Microbe Interact. **8**: 235-240
3. Valderrama *et al.* (1996) J. Bacteriol. **178**: 3119-3126
4. Hernando *et al.* (1995) J. Bacteriol. **177**: 5661-5669
5. Gutiérrez *et al.* (1997) J. Bacteriol. **179**: 5264-5270

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *MSPG3* EN PLANTAS TRANSGÉNICAS MEDIANTE FUSIONES DEL PROMOTOR AL GEN DE LA β -GLUCURONIDASA

Rodríguez-Llorente I.D., Pérez-Hormaeche J., Coronado C., Ratet P.,* Kondorosi A.,* Caviedes M.A. y Palomares A.J.

Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad de Sevilla. 41012 Sevilla.

* Institut des Sciences Végétales. C.N.R.S. 91198 Gif sur Yvette CEDEX. France.

Introducción

Las primeras etapas de la interacción entre bacterias del género *Rhizobium* y las plantas leguminosas presentan numerosos aspectos desconocidos en los que se ha sugerido la participación de enzimas pécticas producidas por la planta, la bacteria o ambos. Así, se ha propuesto la participación de dichas enzimas en procesos tales como la penetración de la bacteria a través de la raíz de la planta, la formación inicial y el crecimiento del cordón de infección y la liberación de las bacterias en las células infectadas.

Fahraeus y Ljunggren (1) propusieron que la raíz de la leguminosa produce la enzima poligalacturonasa (PG) inducida por la cepa homóloga de *Rhizobium*. La capacidad de inducir la producción de PG en la raíz podría estar controlada por un plásmido de la bacteria (2). La PG es una de las enzimas más importantes asociadas con la degradación de la pared celular vegetal y, junto con otras enzimas pécticas, está implicada en numerosos procesos biológicos. Entre otros, se ha demostrado su participación en la maduración del fruto (3) y en la formación del tubo polínico (4).

En nuestro laboratorio hemos clonado, secuenciado y caracterizado un gen de PG de *Medicago sativa* (alfalfa), *MsPG3*, que se expresa específicamente durante la simbiosis con *Rhizobium meliloti*. Este gen es diferente a los genes de PG previamente caracterizados cuya expresión se produce en polen.

Mediante la técnica de RT-PCR se detectó expresión del gen *MsPG3* en raíces de *M. sativa* un día después de ser inoculadas con *R. meliloti*. No se observó la presencia de transcritos del gen en otros órganos de la planta. Posteriores experimentos de hibridación *in situ* confirmaron esta inducción de *MsPG3* en las primeras etapas de la interacción, detectándose expresión del gen en todas las células de primordios nodulares. En nódulos jóvenes la expresión se localizó en células del meristemo, células de la zona de invasión adyacente al meristemo donde crece el cordón de infección y tiene lugar la liberación de la bacteria y en la interzona II-III donde tiene lugar la proliferación de las bacterias y el alargamiento de las células infectadas. En nódulos adultos nunca se encontró expresión en la zona simbiótica (5).

Estos resultados sugieren que esta enzima puede estar implicada en varios aspectos de la interacción simbiótica.

Aislamiento y clonación de la región promotora del gen *MsPG3*

A partir de un clon genómico contenido en el fago 10 (fago empleado en el aislamiento del gen) se aisló un fragmento *HindIII/BamHI* de 3 Kb que contenía la posible región promotora del gen y un fragmento de 300 pb de la región codificante

de dicho gen. Tras la clonación en el vector pBluescript, de este fragmento se eliminó por delección la región codificante del gen y 3 pares de nucleótidos en dirección 5' del inicio de traducción. El resultado fue un fragmento de 2,7 Kb con posible actividad promotora, denominado proPG, que se utilizó en fusiones al gen de la β -glucuronidasa (*gus*) para la transformación de plantas.

Transformación de plantas de *Nicotiana tabacum* (tabaco) con fusiones proPG-*gus*

Existe una amplia bibliografía sobre experimentos de inducción de genes por tratamiento hormonal de plantas transgénicas de tabaco, plantas que contienen fusiones de la región promotora del gen en estudio a algún gen informador, generalmente *gus* (6). Por otro lado, parece existir una gran proximidad filogenética entre la familia de genes de PG de polen de alfalfa y el gen *MsPG3* específico de la nodulación, por lo que podría ser interesante comprobar el comportamiento del gen en un sistema heterólogo carente de dicho proceso. Estos hechos, unidos a la facilidad de transformación de las plantas de tabaco, nos llevaron a realizar estos experimentos.

La transformación de las plantas de tabaco se llevó a cabo con tres construcciones distintas. Para ello, el fragmento promotor proPG anteriormente descrito se clonó en el vector de expresión en plantas pBI101, obteniéndose el plásmido pPG101. Este plásmido contiene una fusión transcripcional proPG-*gus*. Posteriormente, se realizaron delecciones en los puntos de restricción *EcoRI* y *XhoI* contenidos en proPG, obteniéndose fusiones al gen *gus* con fragmentos promotores de 1,4 y 0,6 Kb respectivamente, en los plásmidos pPGE y pPGX. Estas tres construcciones fueron introducidas en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404. El método seguido para la transformación fue el de cocultivación de discos de hojas de tabaco con *A. tumefaciens*, según el protocolo descrito por Horsch y col. (7).

Una vez regeneradas las plantas transgénicas, se realizaron ensayos de actividad Gus según el protocolo descrito por Jefferson et al. (8). Dicha actividad Gus se localizó en las tecas de las anteras y más concretamente en los granos de polen de estas plantas, careciendo de expresión el resto de la planta. No encontramos diferencias significativas entre las distintas construcciones. Este dato sugiere la precisa regulación que parece tener este gen en *M. sativa*, donde *MsPG3* se expresa de forma específica en nódulo. En este sistema heterólogo carente de nodulación sólo se ha descrito una PG en polen (9). Nuestro resultado es consecuente con la cercanía filogenética observada entre las diferentes PGs vegetales.

Asimismo, se realizaron ensayos de actividad Gus sobre plantas de la primera generación filial en diferentes estadios de crecimiento. En plántulas de 2 semanas se localizó actividad Gus en los haces vasculares de los nodos de las hojas, dato que coincide con lo observado anteriormente por Allen y col. (10). Este hecho confiere a estas plantas una gran utilidad en la realización de estudios de inducción de *MsPG3* por tratamientos hormonales y la posterior cuantificación de actividad Gus. Dichos estudios se han llevado a cabo utilizando auxinas, citoquininas, ácido giberélico y jasmonatos como posibles agentes inductores.

Transformación parcial de plantas de *Vicia hirsuta*

Agrobacterium rhizogenes es capaz de inducir la formación de raíces aéreas cuando infecta plantas de *V. hirsuta*. Cuando estas raíces se ponen en contacto con *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* el resultado es la aparición de nódulos de tipo indeterminado, semejantes a los producidos por *M. sativa*. Esta característica fue aprovechada por Quandt y col. (11) para desarrollar un protocolo que permite la obtención de plantas de *V. hirsuta* parcialmente transformadas, ya que en dichas

plantas, las raíces y, posteriormente, los nódulos son transgénicos, permaneciendo inalterada la parte aérea de las mismas. Este protocolo resulta de gran utilidad para los estudios de expresión de genes de la planta implicados en la nodulación.

Para llevar a cabo esta transformación se realizó una fusión transcripcional del fragmento promotor proPG al gen *gusA-int* en el vector binario pPR97. Este gen presenta un intrón que lo hace útil para eliminar la expresión Gus intrínseca que presentan las cepas de *Agrobacterium* empleadas en las transformaciones. El plásmido resultante pPG97, previa introducción en *Agrobacterium rhizogenes*, fue empleado en la obtención de raíces y nódulos transgénicos de *V. hirsuta* según el protocolo anteriormente mencionado.

Los ensayos de actividad Gus realizados sobre nódulos transgénicos de estas plantas revelaron un patrón de expresión que coincide con los datos obtenidos en los experimentos de hibridación *in situ*. De este modo, se detectó expresión en todas las células de primordios nodulares y nódulos jóvenes, mientras que en nódulos maduros se observó actividad Gus en las células de la zona de invasión. Por otro lado, en nódulos maduros no se detectó actividad Gus en la zona simbiótica.

Patrón de expresión del gen *MsPG3* y análisis delecional del fragmento promotor proPG en plantas transgénicas de *Medicago truncatula*

Existen múltiples argumentos para afirmar que la relación simbiótica entre *R. meliloti* y *Medicago* es el sistema más atractivo como modelo para el estudio de la interacción *Rhizobium*-leguminosa (12). Mientras que *M. sativa* no es una planta muy adecuada para los estudios genéticos, ya que es tetraploide, alógama y posee un genomio relativamente grande (13), *M. truncatula* es diploide, autógena y posee un genomio pequeño, por lo que ha sido propuesta como leguminosa modelo para los estudios genéticos y de identificación de eventos moleculares que contribuyen al desarrollo del nódulo (14). Este hecho ha llevado a múltiples grupos a la búsqueda de un protocolo eficiente que permita la transformación de plantas de *M. truncatula*.

Una vez comprobada la validez del fragmento promotor proPG para dirigir la expresión del gen *gus* en el sistema heterólogo, se procedió a la transformación estable de plantas de *Medicago*. El protocolo seguido para dicha transformación ha sido el desarrollado recientemente por Trinh et al. (12). Dicho protocolo permite la obtención de plantas transgénicas de *M. truncatula* en un período de tres meses con una elevada eficacia de transformación. Está basado en la cocultivación de discos de hojas de *M. truncatula* R-108 con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105.

Con objeto de caracterizar el patrón de expresión del gen *MsPG3* en este sistema, se ha llevado a cabo la transformación de *M. truncatula* con el plásmido pPG97 utilizado en la transformación de *V. hirsuta*. Una vez regeneradas, estas plantas carecen de expresión Gus antes de ser inoculadas con *R. meliloti*. Los ensayos de actividad realizados sobre raíces, hojas y flores sin inducir han sido siempre negativos, confirmando la especificidad de expresión que parece tener este gen en *Medicago*. La inoculación de estas plantas con diferentes cepas de *R. meliloti*, tanto salvajes como mutantes, y el estudio posterior de la actividad Gus en los nódulos ayudará a caracterizar mejor el patrón de expresión espacial y temporal del gen *MsPG3* y su regulación durante la nodulación.

Para realizar el análisis delecional de este promotor se han transformado plantas de *M. truncatula* con fusiones transcripcionales de diferentes versiones delecionadas de dicho promotor al gen *gus*. Para ello, se realizaron deleciones en la región 5' del fragmento promotor proPG que posteriormente fueron clonadas en el vector pPR97, en la misma posición que el fragmento promotor entero. Los fragmentos delecionados del promotor utilizados en las transformaciones contienen 600, 413, 306, 205 y 92

pb de proPG respectivamente y los plásmidos que llevan las fusiones se denominan pPG600, pPG413, pPG306, pPG205 y pPG92.

Por otro lado, estas plantas transformadas con las deleciones del fragmento proPG dirigiendo la expresión del gen *gus* servirán para identificar el papel que juegan las distintas zonas del promotor en la expresión espacial y temporal del gen, así como en la regulación del mismo.

Bibliografía

1. Fahraeus, G. and Ljunggren, H. (1959). The possible significance of pectic enzymes in root hair infection by nodule bacteria. *Physiol. Plant* 12: 145-154.
2. Palomares, A.J., Montoya, E. and Olivares, J. (1978). Induction of polygalacturonase production in legumes roots as a consequence of extrachromosomal DNA carried by *Rhizobium meliloti*. *Microbios* 21: 33-39.
3. Fischer, R.L. and Bennett, A.B. (1991). Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. *Plant Mol. Biol.* 42: 675-703.
4. Brown, S.M. and Crouch, M.L. (1990). Characterization of a gene family abundantly expressed in *Oenothera organensis* pollen that shows sequence similarity to polygalacturonase. *Plant Cell* 2: 263-274.
5. Muñoz, J.A., Coronado, C., Pérez-Hormaeche, J., Kondorosi, A., Ratet, P. and Palomares, A.J. (1998). *MsPG3*, a *Medicago sativa* polygalacturonase gene expressed during the alfalfa-*Rhizobium meliloti* interaction. Sometido.
6. Vogeli-Lange, R., Frundt, C., Hart, C.M., Nagy, F. and Meins, F.Jr. (1994). Developmental, hormonal and pathogenesis-related regulation of the tobacco class I β -1,3-glucanase B promoter. *Plant Mol. Biol.* 25: 299-311.
7. Horsch, R., Fry, J., Hoffman, N., Eichholtz, D., Rogers, S. and Fraley, R. (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*. 227: 1229-1231.
8. Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M. W (1987). GUS fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 13: 3901-3907.
9. Tebbutt, S.J., Rogers, H.J. and Lonsdale, D.M. (1994). Characterization of a tobacco gene encoding a pollen-specific polygalacturonase. *Plant Mol. Biol.* 25: 283-297.
10. Allen, R.L. and Lonsdale, D.M. (1993). Molecular characterization of one of the maize polygalacturonase gene family members which are expressed during late pollen development. *Plant J.* 3: 261-271.
11. Quandt, H.-J., Pühler, A. and Broer, Y. (1993). Transgenic root nodules of *Vicia hirsuta*: a fast and efficient system for the study of gene expression in indeterminate-type nodules. *Mol. Plant Microb. Interact.* 6: 699-706.
12. Trinh, T.H., Ratet, P., Kondorosi, E., Durand, P., Kamaté, K., Bauer, P. and Kondorosi, A. (1998). Rapid and efficient transformation of diploid *Medicago truncatula* and *Medicago sativa* ssp. *falcata* lines improved in somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*. 17: 345-355.
13. Blondon, F., Marie, D., Brown, S. and Kondorosi, A. (1994). Genome size and base composition in *Medicago sativa* and *Medicago truncatula* species. *Genome*. 34: 264-270.
14. Barker, D.G., Bianchi, S., Blondon, F., Dateé, Y., Duc, G., Essad, S., Flament, P., Gallusci, P., Génier, G., Guy, P., Muel, X., Tourneur, J., Dénarié, J. and Huget, T. (1990). *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 8: 40-49.

ASPECTOS MOLECULARES Y ECOLÓGICOS DEL PRIMER INTRON DEL GRUPO II DESCRITO EN *SINORHIZOBIUM MELILOTI*

Martínez-Abarca F., Zekri S., Muñoz E. and Toro N.

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, C.S.I.C. C/ Profesor Albareda 1, 18008, Granada Spain. fmabarca @eez.csic.es

Los intrones del grupo II son por un lado elementos capaces de sufrir "splicing" en el ARN y por otro elementos genéticos móviles. Ambas características los relacionan como posibles precursores de los intrones del núcleo Eucariota (Michel y Ferat, 1995; Perlham y Podar, 1996). Los intrones de este grupo se caracterizan por presentar un ARN con una determinada estructura terciaria dividida en seis dominios. En el dominio IV de algunos de ellos se encuentra una fase abierta de lectura que codifica para una proteína relacionada claramente con reverso transcriptasas y que presenta una actividad endonucleasa (Michel y Ferat, 1995). Esta última actividad ha sido asociada a un dominio de dedos de Zinc presente en el extremo carboxilo de la proteína (Zimmerly *et al.* 1995). Los intrones de este grupo se encontraron inicialmente en genes de organelas de eucariotas inferiores y plantas, y sólo recientemente se han descrito en cianobacteria y proteobacteria (Ferat *et al.* 1994; Mills *et al.*, 1996; Mullany *et al.* 1996).

Los mecanismos de movilidad de los intrones del grupo II han sido estudiados en detalle en los intrones *ai1* y *ai2* del ADN mitocondrial de levaduras (Zimmerly *et al.* 1995; Eskes *et al.* 1997; Guo *et al.* 1997) y recientemente en *Lactococcus lactis*, mostrando mecanismos y actividades similares (Matsuura *et al.* 1997). Sin embargo, los intrones encontrados en *E. coli* están a su vez asociados a elementos genéticos móviles como secuencias de inserción (Ferat *et al.* 1994). Estas observaciones han sugerido que estos elementos pueden actuar como "vectores" en el movimiento de los intrones correspondientes.

El análisis de la secuencia del plásmido pRmeGR4b de la cepa GR4 de *Sinorhizobium meliloti* nos ha permitido identificar un intrón del grupo II al que hemos denominado *RmInt1*. Este intrón se encuentra interrumpiendo la secuencia de inserción *ISRm2011-2* perteneciente a la familia *IS630-Tc1* (Martínez-Abarca *et al.* 1998). Al igual que otros intrones pertenecientes al grupo II, *RmInt1* posee la estructura de ribozima conservada dividida en 6 dominios de ARN. El dominio IV posee a su vez una fase abierta de lectura (Proteína Codificada por el Intrón: Intron Encoded Protein) con homología a reverso transcriptasas y al igual que las descritas en *Escherichia coli* esta IEP no codifica un dominio tipo dedos de Zn²⁺. Mediante el uso del sistema de expresión basado en la polimerasa del fago T7 en *Escherichia coli*, demostramos que el intrón es activo en "splicing" *in vivo* y que la eficiencia del "splicing" requiere de la IEP, lo que sugiere que ésta posee una actividad maturasa. La caracterización posterior de la actividad *in vitro* de complejos de Ribo-Núcleo partículas será presentada.

El intrón *Rmint1* es un elemento móvil independiente capaz de insertarse en un vector diana con 650 nt que contenía el lugar de inserción - movimiento conocido como "homing"-. Homing eficiente ha sido sólo observado en cepas de *S. meliloti* que poseían copias de *Rmint1* (como GR4 y LPU119) indicando de esta manera la

especificidad de la secuencia diana. Por otro lado, la capacidad de *Rmint1* como elemento móvil queda restringida en su hospedador homólogo *S. meliloti*. Cuando *Rmint1* era expresado en *E. coli*, no se observó el movimiento sobre el mismo vector diana sugiriendo que el movimiento de este intrón puede ser dependiente de un función aportada por la bacteria homóloga. También es un hecho destacable el que *Rmint1* sea el primer intrón en el que se demuestra movimiento y cuya IEP no posee el dominio descrito con actividad endonucleasa (dominio con dedos de Zinc). Dominio por otro lado imprescindible para el movimiento tanto en los intrones de levaduras como en *L. lactis* (Zimmerly *et al.*, 1995; Matsuura *et al.*, 1997) lo que podría indicar mecanismos diferentes de movilidad a los ya descritos.

El intrón *Rmint1* se encuentra ampliamente distribuido en *S. meliloti*. Su abundancia está directamente relacionada con su asociación con la secuencia de inserción *ISRm2011-2* siendo esta IS la de mayor número de copias y presente virtualmente en todas las *S. meliloti* descritas (Selbitschka *et al.* 1995). El análisis de diversos aislados de campo relacionados con la cepa de *S. meliloti* GR4 sugieren que el intrón posee capacidad de movimiento asociada al elemento *ISRm2011-2*. Sin embargo, algunas cepas de *S. meliloti* presentan copias de *Rmint1* no asociadas a *ISRm2011-2*. El análisis de alguno de estos nuevos fragmentos de ADN asociados a *Rmint1* ("sitios ectópicos") ha revelado la presencia de secuencias con una alta homología con *ISRm2011-2* (2 de ellas) así como de un gen con homología a la gran familia de oxidoreductasas. La comparación de estos nuevos sitios de inserción del intrón muestra las dos cajas conservadas IBS1-2 con pequeños cambios (transiciones) que mantienen la interacción Watson y Crick con el intrón (EBS1-2) y que codifican para un motivo "FIDE" presente en todas ellas.

El hecho de que la mayoría de las copias del intrón *Rmint1* presentes en *S. meliloti* se encuentren asociadas con un grupo particular de secuencias de inserción, puede ser lo que le ha permitido asegurarse su amplia distribución y su permanencia en *S. meliloti*. Consideraciones evolutivas de este hecho serán discutidas.

Referencias:

- Eskes *et al.* (1997) Cell 88: 865-874
Ferat *et al.* (1994) C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/Life Sciences 317: 141-148
Guo *et al.* (1997) EMBO J. 16: 6835-6848
Martínez-Abarca *et al.* (1998) Molecular Microbiology in press.
Matsuura *et al.* (1997) Genes Develop. 11:2910-2924
Michel y Ferat (1995) Ann. Rev. Biochem. 64: 435-461
Mills *et al.* (1996) J. Bacteriol. 178: 3531-3538
Mullany *et al.* (1996) Gene 174: 145-150
Perlham y Podar (1996) Methods in Enzimology 264: 66-86
Selbitschka *et al.* (1995) Gene 163: 59-64.
Zimmerly *et al.* (1995) Cell 83: 529-538

IDENTIFICACIÓN DE GENES *NAR* EN *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*

Mesa Banqueri M.S., Delgado M.J. y Bedmar E.J.

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos. Estación Experimental del Zaidín, CSIC. Apartado Postal 419, 18080-Granada. E mail: smesa@eez.csic.es.

El nitrato es la fuente de nitrógeno más abundante en el suelo y puede utilizarse tanto en procesos biosintéticos como para la obtención de energía. En este caso, el nitrato sustituye al oxígeno como aceptor final de electrones de la cadena respiratoria, de manera que su reducción a nitrito origina un gradiente electroquímico que resulta en la formación de ATP. Las enzimas nitrato reductasa respiratorias de las bacterias de las que se ha aislado son enzimas de membrana codificadas por los genes *narGHJ* (3). *Bradyrhizobium japonicum* es una especie de la familia *Rhizobiaceae* bien conocida por su capacidad para establecer simbiosis fijadoras de dinitrógeno atmosférico con plantas de soja. En vida libre, *B. japonicum* es capaz no sólo de asimilar nitrato sino también de utilizarlo, en condiciones de limitación de oxígeno, como aceptor final de electrones. Hasta la fecha, la presencia y expresión de genes *nar* no se ha descrito en ninguna especie de la familia *Rhizobiaceae*. En este trabajo se describe la identificación de genes *nar* en *B. japonicum* USDA110.

El aislamiento de ADN genómico, preparación de ADN plasmídico, tratamiento con enzimas de restricción, ligación en vectores de clonación, transformación y electroforesis en geles de agarosa se llevó a cabo mediante procedimientos ya descritos (8). Para las pruebas de hibridación ADN-ADN se utilizó el método no radiactivo de la digoxigenina siguiendo las instrucciones del proveedor (Boehringer Mannheim).

Para la identificación en una librería genómica de *B. japonicum* USDA110 de genes homólogos a los estructurales de la enzima nitrato reductasa respiratoria, se utilizó como sonda de hibridación el fragmento *EcoRI* de 6 kb del plásmido pSL962, que contiene los genes *narGHI* de *Escherichia coli* (5). En ningún caso, a pesar de los intentos repetidos, pudo detectarse señal de hibridación. Este hecho sugiere la ausencia de homología a nivel de ADN entre las secuencias que codifican las enzima nitrato reductasa respiratoria de *E. coli* y *B. japonicum*.

Recientemente, se han empleado técnicas de PCR para amplificar secuencias de ADN que codifican enzimas nitrato reductasa respiratorias en *Bacillus subtilis* (4) y *Pseudomonas fluorescens* (6). Basándonos en esta estrategia, a partir del alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la subunidad , codificada por el gen *narH*, de *P. fluorescens* (6), *E. coli* (2) y *B. subtilis* (4), se identificó una zona conservada, entre los aminoácidos 15 y 235 de las secuencias de las proteínas analizadas. Teniendo en cuenta la preferencia de uso de codones de *B. japonicum* (7), se diseñaron cebadores degenerados para la amplificación de dicho polipéptido. Los oligonucleótidos utilizados, deducidos de las secuencias correspondientes a los aminoácidos 15 a 22 y 226 a 235, fueron:

(5')-CGGAATTCAA(GA)TG(TC)AT(ATC)GG(GATC)TG(CC)CA(TC)AC-(3') y

(5')-CGCGGATCCCA(AG)TT(AG)AA(AG)TA(TAG)AT(CT)TT(CT)TT(AG)TA-(3').

Las bases entre paréntesis indican las degeneraciones introducidas. En las secuencias descritas se incluyeron tanto bases protectoras como lugares de reconocimiento de las enzimas de restricción *EcoRI* en el primer cebador y *BamHI* en el segundo oligonucleótido.

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando ADN genómico de *B. japonicum* USDA110 y los cebadores descritos. Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización inicial (5 min, 94°C); desnaturalización (1 min, 94 °C, 35 ciclos), reconocimiento (2 min, 55 °C, 35 ciclos), extensión (2.5 min, 72 °C, 35 ciclos), extensión final (7 min, 72 °C).

El análisis en geles de agarosa de los productos obtenidos después de la amplificación, demostró la existencia de un fragmento de ADN de un tamaño aproximado de 680 pares de bases, coincidente con el tamaño deducido de la zona conservada de la subunidad que se pretendía amplificar.

Después de la extracción y purificación del gel de agarosa, el análisis de la secuencia del ADN obtenido indicó que presentaba homología con el gen *narH* de *Paracoccus denitrificans* (1), *E. coli*. (2), *B. subtilis* (4) y *P. fluorescens* (6). El proceso de secuenciación se llevó a cabo en un secuenciador automático (Applied Biosystem modelo 373 Strecht, Servicio de Secuenciación, Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC, Granada). El análisis de las secuencias de nucleótidos y proteínas se realizó mediante ordenador usando los programas DNA Strider y GCG.

El empleo del fragmento de 680 pares de bases como sonda de hibridación ha permitido la identificación en el ADN genómico de *B. japonicum* digerido con distintas enzimas, de señales de hibridación. Actualmente, se procede a la identificación en una librería genómica de *B. japonicum* USDA110 del cósmido o cósmidos que puedan ser portadores de ADN homólogo a la sonda obtenida de *B. japonicum*.

Dada la habilidad de *B. japonicum* para respirar nitrato y desnitrificar, podría utilizarse como modelo para estudiar a nivel genético-molecular, en un solo microorganismo, todo el metabolismo anaerobio del nitrato, esto es respiración y desnitrificación, así como la relación entre ambos procesos y las que pudieran ocurrir entre los mismos y la fijación de dinitrógeno atmosférico

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto de Investigación DGICYT PB94-0117 y el Programa de Ayuda a los grupos de Investigación de la Junta de Andalucía (CVI 180).

Bibliografía

1. Berks et al. 1995. Mol. Microbiol. 15:310-331.
2. Blasco et al. 1989. Mol. Gen. Genet. 218:249-256.
3. Bonnefoy, V. y DeMoss, J.A. 1994. Antonie van Leeuwenhoek 66:47-56
4. Hoffman et al. 1995. FEMS Microbiol. Lett. 131:219-225.
5. Li, F. y Demoss, J.A. 1987. J. Bacteriol. 169:4614-4620.
6. Philippot et al. 1997. Biochim. Biophys. Acta 1350: 272-276.
7. Ramseier, T.M. y Göttfert, M. 1991. Arch. Microbiol. 156:270-276.
8. Sambrook et al. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN *nirK* DE *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* USDA110

Velasco L., Delgado M.J. y Bedmar E.J.

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos. Estación Experimental del Zaidín, CSIC. Apdo. 419. 18080-Granada. lvelasco@eez.csic.es

Introducción

La desnitrificación es un proceso alternativo de conservación de la energía que implica, en condiciones limitantes de oxígeno, la siguiente secuencia: $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$. Estas reacciones se llevan a cabo por la actuación secuencial de las enzimas nitrato reductasa, nitrito reductasa, óxido nítrico reductasa y óxido nitroso reductasa, respectivamente. En sentido estricto, la primera reacción del proceso de desnitrificación es la catalizada por la nitrito reductasa, ya que determinadas bacterias pueden respirar nitrato, pero carecer de las enzimas necesarias para desnitrificar.

Existen dos tipos de nitrito reductasas respiratorias, mutuamente excluyentes, en la naturaleza, las que contienen: tetrahemo cd_1 en el centro activo (nitrito reductasas de tipo cd_1), y las que contienen cobre en el centro activo (nitrito reductasas tipo Cu). Ambos tipos de enzimas no tienen entre sí ninguna relación estructural ni evolutiva. Los genes que codifican las nitrito reductasas tipo cd_1 se organizan en un complejo operon (*nirSTBM*) que incluye genes implicados tanto en la síntesis de los polipéptidos estructurales como los relacionados con el procesamiento e incorporación de los grupos hemo que forman el centro activo de la enzima. Por el contrario, las nitrito reductasas tipo Cu se encuentran aisladas en el genoma, sin formar parte de ningún operón. En este trabajo se describe la identificación y caracterización del gen que codifica la nitrito reductasa respiratoria de *B. japonicum*. Estas bacterias son especies de la familia *Rhizobiaceae* que se caracterizan por formar simbiosis fijadoras de nitrógeno atmosférico con plantas de soja.

Resultados

Se ha utilizado como sonda de hibridación el fragmento *Pst*I de 2.4 kb del plásmido pNIR201 que incluye parte del gen *nirK* de *Alcaligenes faecalis* (2). El empleo de esta sonda permitió la identificación en una librería genómica de *B. japonicum* de un único cósmido, denominado pJNIR1, que dió señal de hibridación. Este cósmido incluía un fragmento *Eco*RI de 6.3 kb que dió también señal de hibridación, y cuya clonación en el vector pBlueScript KS(-) (Stratagene) dió lugar al plásmido pJNIR61. El análisis de la secuencia del plásmido pJNIR61 demostró la existencia de un ORF que presentaba elevada homología con la secuencia de aminoácidos de las enzimas nitrito reductasa respiratorias de *Rhodobacter sphaeroides*, *Achromobacter cycloclastes*, *Rhizobium "hedysari"*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Alcaligenes faecalis*.

En todos los casos se trata de enzimas que contienen cobre en su centro activo y están codificadas por el gen *nirK* de las bacterias donde se ha identificado. Dada la homología de la proteína codificada por el ORF de *B. japonicum* con estas enzimas, se le ha denominado también NirK, y al gen que la codifica *nirK*.

Una vez identificado y clonado el gen *nirK*, se ha llevado a cabo su inactivación mediante mutagénesis dirigida por inserción de un gen de resistencia a estreptomycin/espectinomycin. La posterior transferencia del gen mutado a la cepa parental y la selección de transconjugantes incapaces de crecer microaeróbicamente con nitrato permitió el aislamiento de la cepa GRK308.

Mientras que no se han detectado diferencias en la actividad nitrato reductasa de las cepas USDA110 y GRK308, la actividad nitrito reductasa de la mutante fue 6 veces inferior a la de la cepa parental. Por otra parte, cuando las células se cultivaron en condiciones microaeróbicas (1% oxígeno) con nitrato, la cepa GRK308 acumuló 10 veces más nitrito en el medio de incubación que la cepa parental. Estos resultados indican que la incapacidad de la mutante GRK308 para crecer microaeróbicamente con nitrato puede deberse a la toxicidad del nitrito que se acumula en el medio. Cuando las células se incubaron microaeróbicamente en presencia de nitrito, no se observaron diferencias en la utilización de nitrito entre la cepa parental y la mutante. Este hecho sugiere que la cepa GRK308 es incapaz de utilizar el nitrito exógeno para su reducción a óxido nítrico, y que tal proceso sólo puede llevarse a cabo a partir del nitrito procedente de la reducción del nitrato.

En la región promotora del gen *nirK* de *B. japonicum* se localiza la secuencia TTGTT-N₄-CGCAA, similar a la descrita como motivo de unión de las proteínas activadoras de la transcripción de la familia Fnr/Crp (3), incluyendo la proteína FixK₂ de *B. japonicum*, a la que se considera responsable de activar la transcripción de los genes *nif* y *fix* (1).

Para analizar la expresión del gen *nirK* se construyó una fusión transcripcional *nirK-lacZ* que se transfirió a la cepas de *B. japonicum* USDA110, 7403 (*fixL*) y 7360 (*fixJ*) (3). En la cepa USDA110, la actividad β -galactosidasa fue basal cuando las cepas se incubaron en aerobiosis. Dicha actividad incrementó cuando las células se incubaron en microaerobiosis y fue aún mayor después de la incubación en condiciones microaeróbicas con nitrato. Cuando se analizó la expresión de la fusión *nirK-lacZ* en las cepas 7403 y 7360 se comprobó la ausencia de actividad en las tres condiciones analizadas. La expresión de *nirK* está, por tanto, sometida a regulación microaeróbica mediada por *fixLJ*.

La formación de nódulos, el peso fresco y el peso seco de plantas de soja inoculadas con la cepa GRK308 fue similar a los de las inoculadas con la cepa parental. No parece, por tanto, que la mutación en el gen *nirK* afecte el establecimiento y funcionamiento de la simbiosis *B. japonicum* USDA110-*Glycine max*.

Este trabajo se ha financiado por la DGICYT, Proyecto PB94-0117 y el Programa de Ayuda a los Grupos de Investigación (CVI 180) de la Junta de Andalucía.

Bibliografía.

1. Fisher, H.M. 1994. Microbiol Rev. 58: 352-386.
2. Nishiyama et al. 1993. J Gen Microbiol. 139: 725-733.
3. Spiro, S. 1994. Antonie Van Leeuwenhoek. 66: 23-36.

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN GEN NECESARIO PARA LA ASIMILACIÓN DE NITRITO EN *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*

Xu C-A., Lorite M.J., Delgado M.J. y Bedmar E.J.

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos. Estación Experimental del Zaidín, CSIC. Apartado 419. E-18080-Granada. ejbedmar@eez.csic.es

La respiración del nitrato es un proceso alternativo de conservación de la energía ya que, en ausencia de O₂, el nitrato puede actuar como aceptor final de electrones de la cadena respiratoria. Enzimas con actividad nitrato reductasa (NR) respiratoria se han aislado de diversas bacterias, incluyendo Gram-positivas, Gram-negativas y microorganismos fotosintéticos. En *B. japonicum* se ha descrito la existencia de dos enzimas, NR_I y NR_{II}, con actividad NR cuya presencia simultánea es necesaria para la utilización microaeróbica del nitrato. La cepa mutante GRF110, obtenida mediante inserción del transposón Tn5 en el genoma de la cepa parental PJ17 no expresa la actividad correspondiente a NR_{II} y es incapaz de crecer cuando se cultiva en tales condiciones (1). En este trabajo se describe la identificación, clonación y caracterización del ADN implicado en la ausencia de expresión de actividad de la enzima NR_{II}.

Manipulación y secuenciación del ADN

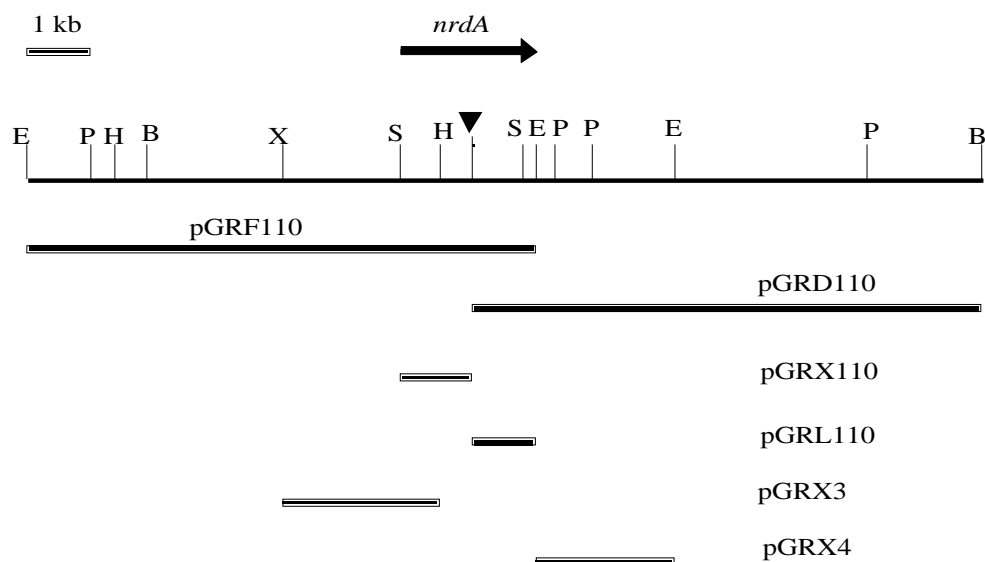
El aislamiento de ADN genómico, preparación de ADN plasmídico, tratamiento con enzimas de restricción, ligación en vectores de clonación, transformación y electroforesis en geles de agarosa se llevó a cabo mediante procedimientos ya descritos (2). Para las pruebas de hibridación ADN-ADN se utilizó el método no radiactivo de la digoxigenina (Boehringer Mannheim). Para la secuenciación de ADN se obtuvieron fragmentos solapados (a 200 pares de bases) mediante el empleo de ADN polimerasa III y exonucleasa S1, según el protocolo de Erase a Base System (Promega). Los fragmentos de delección se ligaron con el plásmido pBSKS+ (pBS) y se clonaron, mediante transformación, en células competentes de *Escherichia coli* DH5. La determinación de la secuencia de nucleótidos de ambas cadenas se realizó mediante el sistema de terminadores marcados con fluorocromos. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo mediante PCR utilizando como cebadores las secuencias del fago M13 (-40)-5'GTTTTCCAGTCACGAC-(3') y (-20)-5'-AACAGCTATGACCATG-(3'). El proceso se llevó a cabo en un secuenciador automático (Applied Biosystem modelo 373 Strecht, Servicio de Secuenciación, Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC, Granada). El análisis de las secuencias de nucleótidos y proteínas se realizó mediante ordenador usando los programas DNA Strider y GCG.

Clonación, secuenciación e identificación del gen *nrda*

El empleo del ADN del transposón Tn5 como sonda de hibridación permitió identificar en el ADN genómico de la cepa GRF110 de *B. japonicum* (1) un fragmento *EcoRI* de 17.5 kb y otro *BamHI* de 13.8-kb que se ligaron con el vector pUC18 para obtener los plásmidos pGRF110 y pGRD110 (Fig. 1). El fragmento de 3-kb *SacI/PstI* y el de 7.5-kb *BamHI/EcoRI* de pGRF110, que contienen las secuencias de inserción de Tn5, se subclonaron en pBS para obtener los plásmidos pGRX110 y pGRL110, respectivamente (Fig. 1). Las regiones de 3-kb *XhoI/HindIII*

de pGRF110 y de 2.3-kb *Eco*RI de pGRD110 también se subclonaron en pBS para obtener los plásmidos pGRX3 y pGRX4, respectivamente (Fig. 1). El análisis de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos obtenidas indicó que el ADN mutado en GRF110 codifica una proteína homóloga a otras enzimas tales como la nitrilotriacetato (NTA) monooxigenasa de *Chelatobacter heintzii*, implicada en la oxidación de nitrilotriacetato a iminodiacetato y glioxilato, la pristinamicina sintasa de *Streptomyces pristinaespiralis* que convierte la pristinamicina II_B en pristinamicina II_A, y la de *Rhodococcus* sp. IGTS8 que lleva a cabo la desulfurización de dibenzotiofeno.

Las células de la cepa GRF110 crecieron utilizando amonio como fuente de nitrógeno y, aunque expresan actividad nitrato reductasa y nitrito reductasa, son incapaces de crecer a expensas de nitrato y nitrito como única fuente de nitrógeno, tanto en condiciones aeróbicas como microaeróbicas. Aunque los valores de actividad nitrito reductasa de la cepa mutante GRF110 fueron superiores a los de la cepa parental PJ17, el contenido intracelular de amonio fue siempre mayor en las células de la cepa PJ17. Estos resultados, junto con el hecho de que las enzimas citadas arriba pertenecen a la familia de las monooxigenasas, sugiere que el gen mutado en GRF110 podría estar implicado en la reducción de nitrito a amonio; de aquí, que al gen identificado en este estudio se la haya designado *nrdA* (de reducción de nitrito).



Este trabajo se ha subvencionado por la DGICYT (Proyecto PB94-0117) y Junta de Andalucía (Grupo CVI 180)

Bibliografía

1. Fernández-López et al. 1994. Arch. Microbiol. 162:310-315.
2. Sambrook et al. 1989. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES *COX* QUE CODIFICAN LA ENZIMA MONÓXIDO DE CARBONO DESHIDROGENASA DE *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*

Lorite M.J., Sanjuán J. y Bedmar E.J.

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos. Estación Experimental del Zaidín, CSIC. Apartado 419. E-18080-Granada. Mjlorite@eez.csic.es

Introducción

Las bacterias carboxidotrofas son microorganismos quimiolitotrofos que se caracterizan por ser capaces, en condiciones aeróbicas, de utilizar monóxido de carbono (CO) como única fuente de carbono y energía para su crecimiento. La enzima CO deshidrogenasa (CODH) cataliza la oxidación de CO a CO₂, que previa reducción por la enzima 1,5-ribulosa-bifosfato carboxilasa, se asimila a través del ciclo de las pentosas fosfato (2). La enzima CODH de *Oligotropha carboxidovorans* es la mejor caracterizada y está codificada por los genes *cox* (4). Genes implicados en la síntesis de enzimas capaces de oxidar CO en aerobiosis se han descrito también en *Pseudomonas thermocarboxidovorans* (genes *cut*, 3). En este trabajo se describe la caracterización de los genes que codifican la enzima CODH de *B. japonicum*.

Resultados

El empleo del ADN del transposón Tn5 como sonda de hibridación permitió identificar en el ADN genómico de la cepa GRF3 de *B. japonicum* (1) un fragmento *EcoRI* de 15 kb que se ligó con el vector pUC18 para obtener el plásmido pGRF3. El empleo, a su vez, del fragmento *HpaI/EcoRI* de 1.9 kb del ADN de *B. japonicum* contenido en pGRF3 como sonda, permitió la identificación, en un banco de genes de la cepa silvestre USDA110 de *B. japonicum*, de un único clon que mostraba homología con el ADN de la sonda utilizada, al que se le denominó pML1. A partir del mapa físico de restricción del ADN de pML1 pudo identificarse un fragmento *HindIII* de 9 kb que clonado en el vector pUC18 dió lugar al plásmido pML12 (Fig. 1). A partir de pML12, por subclonación, se obtuvieron los plásmidos pMLEX, pML124, pML125 y pML126, que se utilizaron para preparar los clones de delección para secuenciación (Fig. 1).

La secuencia de nucleótidos obtenida incluyó 4 ORFs que, por su homología con los genes *cox* de *O. carboxidovorans* (4), se denominaron de igual manera. Los genes *cox* de *B. japonicum* parecen organizados en un operón, siguiendo el orden transcripcional (5')-*coxS*--> *coxM*-->*orf4* --> *orf5*-(3'). Los genes *cox* de *O. carboxidovorans* codifican la enzima CODH, proteína cuya secuencia de aminoácidos es muy similar a la de otras molibdohidrolasas, entre las que cabe destacar la enzima CODH de *P. thermocarboxidovorans*, la nicotina deshidrogenasa de *Arthrobacter nicotinovorans* y la xantina deshidrogenasa de diversos organismos, tanto procariotas como eucariotas. En todos los casos se trata de flavoproteínas que contienen Fe, S y Mo (Ferry, 1995). A diferencia del operon *cox* de *O. carboxidovorans*, formado por

los genes *coxMSLorf4*, no se ha identificado en *B. japonicum* el *orf* correspondiente al gen *coxL*.

Hay que indicar que *coxS* de *B. japonicum* posee en su secuencia los motivos C-X₄-C-X₂-C-X₁₁ y H-X₃-C-X₂-C-X_n-C-X-C, representativos de los sitios de unión de los tipos I y II, respectivamente, de los agrupamientos [2Fe-2S]. En *coxM* se localiza la secuencia G-X-G-X₂-G/A, típica de los lugares de unión de FAD/NAD. Aunque la función del *orf4* no se ha descrito hasta la fecha, el producto de este *orf* podría actuar como represor de la transcripción de los genes *cox* de *O. carboxidovorans* (O. Meyer, comunicación personal). Una secuencia homóloga a *orf5* de *B. japonicum*, donde se localizó la inserción del transposón Tn5 también se encuentra presente en la región *cox* de *O. carboxidovorans* y *M. tuberculosis*, aunque la función de la proteína codificada por este ORF es también desconocida.

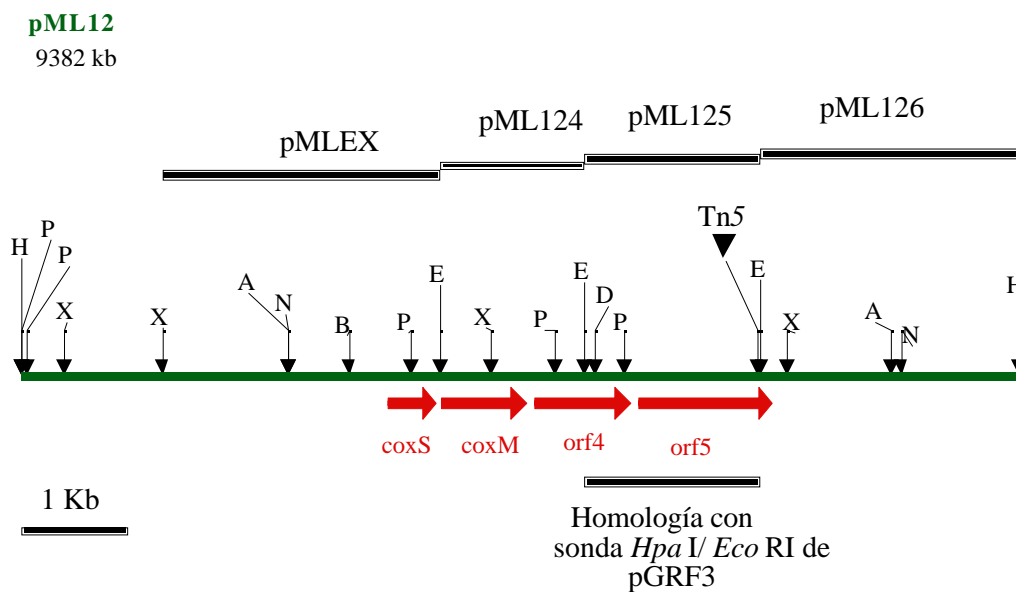


Figura 1. Mapa físico y genético del plásmido pML12. Se indica la localización de los genes *coxS*, *coxM*, *orf4* y *orf5*, así como el lugar de inserción del transposón Tn5 y la zona de homología con la sonda *HpaI/EcoRI* de 1.9 kb del plásmido pGRF3. H, *Hind* III; P, *Pst* I; X, *Xho* I; A, *Apa* I; N, *Not* I; B, *Bgl* I; E, *Eco* RI; D, *Dra* I.

Este trabajo se ha subvencionado por la DGICYT (Proyecto PB94-0117) y Junta de Andalucía (Grupo CVI 180)

Bibliografía

1. Fernández-López et al. 1994 Arch. Microbiol. 162:310-315.
2. Ferry, J.G. 1995. Annu. Rev. Microbiol. 49:305-333.
3. Pearson et al. 1994. Biochim. Biophys. Acta 1188:432-438.
4. Schübel et al. 1995. J. Bacteriol. 177:2197-2203.

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA SÍNTESIS DE LIPOOLIGOSACÁRIDOS EN LA ESTIRPE HH103 DE *SINORHIZOBIUM FREDII*

Lamrabet Y^{1.}, Vinardell J.M.^{2.}, Ollero F.J.^{2.}, Ruíz-Sainz J.E.² y Megías M.¹

1 Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. Apartado 874. 41012 Sevilla.

2 Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Sevilla. Apdo 1095. 41080-Sevilla.

Una de las características de la interacción simbiótica entre los rizobios y las leguminosas es el intercambio de señales. La planta excreta flavonoides, que junto con la proteína NodD, inducen la transcripción de los genes de nodulación, a su vez, responsables de la producción y secreción de lipooligosacáridos (LCOs), también llamados factores de nodulación o molécula señal.

El objetivo de nuestro trabajo es la caracterización de distintos genes de nodulación en la estirpe HH103 de *Sinorhizobium fredii*. Con este propósito se realizaron mutagénesis con el transposón *Tn5-lacZ*, y se seleccionaron aquellas colonias que inducían la expresión del gen de la β -galactosidasa en presencia de un flavonoide inductor.

Con este procedimiento se han aislado distintos mutantes. Uno de ellos, denominado SVQ287, es el objeto de la presente comunicación.

Este mutante fue Fix⁺ en soja, al igual que la estirpe parental HH103, sin embargo fue mucho menos competitivo que ésta.

Cuando se determinó por cromatografía en capa fina (CCF), utilizando N-acetil glucosamina radiactiva, los factores de nodulación producidos por el mutante, se comprobó que estaban alterados con respecto a la estirpe HH103. Así, frente a las cinco bandas presentes en HH103, la estirpe SVQ287, sólo presentó dos. Por otra parte, utilizando ¹⁴C-metil-metionina no se marcaron los LCOs del mutante y sí los de la estirpe HH103.

Todas las alteraciones presentadas por SVQ287, se corrigieron cuando se introdujo el cósmido pMUS283, cósmido donde también se localiza el gen *nodD1* de la estirpe HH103. En distintos experimentos de subclonación, se comprobó que un fragmento de 9,6Kb del cósmido portaba todos los genes necesarios para complementar al mutante.

Igualmente, se construyó un banco de genes del mutante y así se aislaron distintos cósmidos kanamicina resistentes, donde se localizaría el transposón. Subclonando este fragmento y secuenciándolo parcialmente, utilizando como cebador parte de la secuencia de la IS50R, se localizó la posición del transposón dentro del fragmento de 9,6Kb. Posteriormente, se secuenció una región de alrededor de *HindIII* de 3,7Kb, donde se debía localizar el gen mutado.

La secuencia obtenida indicó que el transposón afecta al gen *noeL*, que codifica para una GDP-D-4, 6-manosa-dehidratasa, responsable de la transformación de manosa en fucosa.

Estos resultados indican, que la alteración en los LCOs de SVQ287, es debida a que estas moléculas no están fucosiladas. Así mismo, se explica por qué no se marcan con metil-metionina, ya que el metilo se incorpora a los LCOs de la estirpe HH103 en la molécula de fucosa (Gil-Serrano y col., 1997).

En el fragmento secuenciado, además de *noeL*, se localiza *nodZ* (fucosil transferasa) y parcialmente los genes *noeK* (actividad de fosfomanomutasa) y *nolK* (actividad de dehidrogenasa). Todos estos genes presentan una elevada homología con los genes de la estirpe NGR234 de *Rhizobium sp.* (Freiberg y col., 1997), que también se encuentran igualmente organizados.

La única diferencia detectada en la secuencia de HH103 con respecto a la de NGR234 es la presencia de una posible fase abierta de lectura de alrededor de 66 pares de bases, localizados en la región intergénica entre *nolK* y *nodZ*, y justo corriente abajo de una caja de nodulación. El posible péptido codificado, de 22 aminoácidos, presenta una homología del 50% con los primeros 20 aminoácidos de la proteína NifW.

Ha parecido interesante generar nuevos mutantes afectados en los distintos genes detectados en la secuencia y estudiar su fenotipo simbiótico y su producción de LCOs.

Así, se han subclonado los distintos genes y se han mutagenizados con el transposón *lacZ-Gm^R*, presente en el plásmido pAB2001.

Para generar un mutante en el gen *nolK*, se subclonó un fragmento *SmaI-ApaI* de alrededor de 2Kb, del fragmento de 9,6 Kb, que transporta parte del gen *noeL* y el gen *nolK* completo. El gen se deletó con la enzima *XhoI*, y en ese punto se introdujo el transposón *lacZ-Gm^R*, cortado con *SalI*, y clonándose en el plásmido pJQ200 (*Spc^R*) y que porta los genes *sacB-sacR*, generándose el plásmido pYL203, donde el gen *lacZ* presente en el transposón se lee en la misma dirección que el gen mutado. Posteriormente, el plásmido pYL203 se introdujo en la estirpe HH103, y los transconjugantes obtenidos se sembraron en medio con un 5% de sacarosa en presencia de gentamicina, donde sólo pueden crecer aquellas colonias en las que se ha producido una doble recombinación, sustituyéndose la copia silvestre del gen por la copia mutada.

Para obtener el mutante en el gen *nodZ* se subclonó un fragmento *ClaI-ApaI* de alrededor de 1,1Kb y se introdujo el transposón en un punto *Pst I* interno al gen. La construcción se clonó igualmente en el plásmido pJQ200, generándose el plásmido pYL206, donde el gen *lacZ* se lee en dirección opuesta a la lectura del gen. Posteriormente se homogenizó la mutación en la estirpe HH103, como se explica más arriba.

A ambos mutantes se les ha estudiado su fenotipo simbiótico en soja y los LCOs que producen. Los dos mutantes fueron *Fix⁺* en soja y en ambos casos los LCOs que producen fueron similares a los que produce el mutante SVQ287, afectado en el gen *noeL*.

Bibliografía:

- Gil-Serrano y col., 1997. Carbohydrate Res. 303:435-443.
- Freiberg y col., 1997. Nature 387:394-401.

La financiación de este trabajo ha sido realizada por CICYT, proyecto nº BIO 96- 1469- CO3.

CARACTERIZACIÓN DE UN MUTANTE DE LA ESTIRPE HH103 DE *SINORHIZOBIUM FREDII* ALTERADO EN SU CAPACIDAD FIJADORA DE NITRÓGENO

Espuny M.R.¹, Bellogín R.A.¹, Cubo T.¹, Lamrabet Y.³, Madinabeitia N.¹, Ollero F.J.¹, Ruiz-Sainz J.E.¹ y Temprano, F.²

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Apartado 1095, 41080 Sevilla. Espuny@cica.es

²CIFA “Las Torres y Tomejil”. Apartado Oficial, Alcalá del Río, Sevilla.

³Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. 41012-Sevilla

Entre los objetivos de nuestro grupo de investigación se encuentra el de la localización y estudio de los genes implicados en la nodulación y fijación de nitrógeno de la estirpe HH103 de *Sinorhizobium fredii* en sus hospedadores. Para ello se obtuvieron una serie de mutantes de esta estirpe mediante mutagénesis del transposón Tn5-*lacZ*, buscando aquellos clones transconjugantes resistentes a la kanamicina que dieran una mayor actividad -galactosidasa en presencia del flavonoide inductor naringenina. Posteriormente se estudiaron los fenotipos simbióticos de estos mutantes, en la soja, para detectar posibles alteraciones respecto de su estirpe parental HH103, y se rescataron las regiones del genomio adyacentes a la inserción del transposón.

En uno de los mutantes obtenidos (SVQ124), la estrategia seguida para aislar el fragmento de ADN con la inserción de Tn5-*lacZ* fue el empleo del plásmido pMUS436. Este plásmido se construyó, expresamente para este fin, clonando el gen *lacZ* (3 kb) en el punto *EcoRI* de pSUP202, un plásmido que porta los genes de resistencia a la tetraciclina y a la ampicilina (1). El plásmido pMUS436 no es replicable en *Rhizobium* y, por tanto, tras ser introducido en el mutante SVQ124, sólo los clones transconjugantes en los que pMUS436 se haya integrado en su genomio (por recombinación entre las copias de *lacZ* del plásmido y del transposón) sobrevivirán en presencia de la tetraciclina. El ADN genómico de estos clones recombinantes, se digirió con *ApaI* (que no corta a pMUS436) se religó y transformó a la estirpe HB101 de *E. coli*. Con este procedimiento de clonación *in vivo* se obtuvo el plásmido pMUS453, que porta el origen de replicación de pSUP202 (por lo que es replicable en *E. coli*, el gen de la resistencia a la tetraciclina (lo que permite su selección) y un fragmento de ADN de *Rhizobium* donde se encuentra insertado el transposón. Posteriormente, pMUS453 fue caracterizado y, a partir de él, se subclonó un fragmento de 9 kb, portador de Tn5, en el plásmido pBluescript SKII y se secuenció parcialmente utilizando como cebador un oligonucleótido específico que se localiza en el extremo de la IS de Tn5.

La inserción de Tn5-*lacZ* en el mutante SVQ124 se localiza en un fragmento que presenta una alta homología con la ORF y4vC del plásmido simbiótico de *Rhizobium* sp NGR234 (2), del que se predice una proteína de la familia HesB/YadR/YfhF. El gen *hesB* de la estirpe PCC7120 de *Anabaena* sp parece estar implicado en la fijación de nitrógeno puesto que un mutante de esta estirpe, construido por inserción del gen de la resistencia a la neomicina en éste gen, presenta una disminución clara (45%) de su actividad fijadora de nitrógeno molecular frente a su estirpe silvestre, en condiciones de ausencia de N combinado (2).

El mutante SVQ124 no presentó alteración en el perfil en cromatografía en capa fina de la molécula señal producida tras la inducción con el flavonoide naringenina, ni en la cinética de nodulación en soja Williams; pero, sí se detectó una caída en la eficacia simbiótica en el cultivar Williams de soja. Esta alteración simbiótica se tradujo en unas disminuciones significativas en el número de nódulos desarrollados, en la masa nodular, así como en el peso seco de la parte aérea de las plantas y en la actividad reductora de acetileno, resultado que concuerda con el obtenido con el mutante *hesB* de *Anabaena*.

Es interesante resaltar que, dado que se obtiene un incremento de la actividad α -galactosidasa del mutante en presencia de flavonoides inductores de los genes de nodulación, el gen mutado en SVQ124 presenta una activación de su transcripción igual a la de los genes de nodulación. De hecho, el gen homólogo (y4vC) en *Rhizobium* sp NGR234 contiene una caja de nodulación (nod-box) en su posible secuencia promotora. Estos resultados inducen a pensar que, en base al tipo de regulación transcripcional, el gen mutado en SVQ124 debería considerarse un gen de nodulación.

(1) Simon, R. y col. *Biotechnology*, noviembre, 1983.

(2) Freiberg, C. y col. *Nature* 387, 394-401, (1997)

(3) Borthakur, D. y col., *Mol. Gen. Genet.* 221, 227-234 (1990)

ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN *EXOF* DE *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* BV. *TRIFOLII*. OBTENCIÓN DE UN MUTANTE MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE UN CASETE DE LUCIFERASA

Dary M. y Palomares A.J.

Dpto de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.
41012 Sevilla.
dary@cica.es

Hasta el momento se han identificado un total de 22 genes *exo*, en *R. meliloti*, que intervienen de alguna manera en la biosíntesis del exopolisacárido. Los exopolisacáridos (EPSs) son productos extracelulares que bien, se acumulan en la superficie de la célula como una cápsula, o bien se desprenden de la superficie celular y se encuentran rodeándola. Tradicionalmente se ha pensado que funcionan de un modo no específico en la reunión o acúmulo de nutrientes, como agentes protectores frente a condiciones ambientales adversas, y en la patogénesis. Sin embargo, trabajos recientes han demostrado que desempeñan papeles más específicos en la simbiosis entre los rizobios y las leguminosas, y de forma muy particular en la invasión del nódulo.

Los mutantes de distintas especies de rizobios defectuosos en la síntesis de EPS, están afectados en el proceso de infección y formación del nódulo, por eso se ha propuesto un papel biológico para el exopolisacárido ácido en la interacción rizobio-leguminosa.

En nuestro laboratorio nos planteamos estudiar los genes *exo* de la cepa *R.leguminosarum*. bv. *trifolii* RS800 y realizar la caracterización del fenotipo simbiótico de los mutantes *exo* , lo que nos permitiría conocer mejor la posible implicación del EPS en el proceso de la nodulación entre *R. leguminosarum* bv. *trifolii* y las plantas de trébol.

La presente comunicación aborda el estudio del gen *exoF* puesto que puede tener un papel regulatorio en la síntesis del EPS. Anteriormente se ha identificado por complementación heteróloga del mutante *exoF* de *R.meliloti* un fragmento EcoRI de 3,8Kb portador de ADN de RS800 que contiene el locus homólogo a *exoF*. Para conocer el mapa físico de restricción del fragmento EcoRI de 3,8 Kb se subclonó en el plásmido pBluescriptI IKS+/-, el plásmido construido se denominó pKF38 y sera la base de los clones que se han utilizado para la secuenciación de ADN. El análisis comparativo de las secuencias nucleotídicas, los ORFs y aminoácidos correspondientes se realizó mediante el programa GCG Sequence Analysis Software Package (Genetics Computer Group, Biotechnology Center, University of Wisconsin, Madison, USA) y DNA Strider (C.Mark. Dept. Biologie, Centre d'Etudes Nucleaires de Saclay, Francia).

Otro objetivo del presente trabajo ha sido la obtención de mutantes *exoF* como paso previo en la determinación de la funcionalidad de este gen y para conocer su

implicación en la simbiosis. La técnica de mutagenesis que utilizamos es la de interrupción genica, se clonó el gen de la luciferasa, como fragmento *HindIII* de 2Kb procedente del plásmido pWK101 en el punto único *HindIII* del locus *exoF*. El fragmento resultante en donde el gen informador de luciferasa nos puede indicar mediante la aparición de luz en que clones se ha insertado y por tanto determinado la interrupción genica, se usa para complementar la estirpe mutante y para hacer el marcador de cambio.

Antes de realizar la doble recombinación para pasar la región mutada desde el plásmido hasta el genoma, se comprobó la interrupción genica por complementación de los fenotipos, que ahora no se debería dar, del mutante *exoF* de *R. meliloti*. La homogenización de la secuencia mutagenizada al genoma de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* se ha realizado siguiendo la técnica del plásmido suicida que contiene el gen letal condicional *sacB*.

VARIABILIDAD GENÉTICA DEL SISTEMA HUP EN RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM BV VICIAE

Fernández-Parra D., Toffanin A., Ruíz-Argüeso T. e Imperial J.

Laboratorio de Microbiología. Dpto. Biotecnología, E.T.S.I. Agrónomos,
Universidad Politécnica de Madrid y C.S.I.C., 28040 Madrid.
dfernandez@bit.etsia.upm.es

En el proceso de fijación biológica de nitrógeno se genera H₂ como subproducto obligado de la actividad de la nitrogenasa. La pérdida de este H₂ como gas incrementa el requerimiento de poder reductor para la fijación de nitrógeno en al menos un 25%, y representa una de las mayores fuentes de ineficiencia energética del sistema nitrogenasa en la simbiosis diazotrófica entre leguminosas y bacterias del género *Rhizobium*. Algunas cepas de *Rhizobium* poseen un sistema enzimático (sistema *hup*) que les permite reoxidar el H₂ y, al menos potencialmente, incrementar la eficiencia energética de la simbiosis. Nuestro laboratorio se ha centrado en el estudio del sistema *hup* de *R. leguminosarum* bv *viciae* UPM791 y de su papel en la simbiosis con guisantes. Los determinantes génicos de este sistema se agrupan en una región de unas 20 kb del plásmido simbiótico. Esta región contiene 18 genes, denominados *hupSLCDEFGHIJKhypABFCDEX*. Los dos primeros genes (*hupSL*) codifican las subunidades estructurales de una hidrogenasa de membrana que contiene Ni y Fe, y es el principal componente del sistema *hup*. El resto de genes codifica proteínas accesorias y necesarias para la síntesis y ensamblaje de una hidrogenasa activa. En otras bacterias (*Alcaligenes eutrophus*, *Rhodobacter capsulatus*, *Azotobacter vinelandii*, *Bradyrhizobium japonicum*) se han descrito sistemas hidrogenasa similares al de *R. leguminosarum* UPM791, aunque con peculiaridades estructurales y funcionales en cada uno de los sistemas. En el caso de *R. leguminosarum* UPM791, las más importantes son: a) el gen *hupE* no se encuentra en otros sistemas hidrogenasa (1); b) el activador específico de la transcripción codificado por el gen *hoxA* en otros sistemas está ausente en *R. leguminosarum* UPM791, donde sólo se encuentran restos de un gen tipo *hoxA* a continuación del gen *hypX* (2); c) el sistema *hup* se expresa exclusivamente en simbiosis (2,3).

La posesión del sistema *hup* en *R. leguminosarum* es poco común y la gran mayoría de cepas de colección o prospectadas en diferentes zonas del mundo son Hup⁻. En la actualidad disponemos de 10 cepas Hup⁺ de *R. leguminosarum* bv *viciae* de al menos tres orígenes geográficos distintos. Experimentos preliminares con algunas de las cepas sugirieron que los genes *hup* estaban altamente conservados en *R. leguminosarum*. Con el fin de llegar a comprender las razones para la extremada rareza y conservación del carácter Hup⁺ en *R. leguminosarum*, decidimos estudiar la variabilidad genética del sistema *hup* en estas cepas mediante la amplificación y secuenciación de zonas de la región *hup* para las que no debería existir una presión funcional extrema y en las que, *a priori*, se podría manifestar una mayor variabilidad.

Estas zonas fueron: a) el promotor de los genes estructurales, incluyendo una zona que no es absolutamente requerida para su funcionamiento; b) el gen *hupE* y la región intergénica entre *hupE* y *hupF*; c) parte del pseudogen *hoxA*. Los resultados obtenidos demuestran un grado de conservación de secuencia en la región *hup* totalmente atípico en aislamientos de orígenes geográficos diferentes y que no es fácilmente explicable en términos evolutivos. La variabilidad en el sistema *hup* se ha relacionado con la variabilidad de marcadores genéticos del plásmido simbiótico (*nodD*) y del cromosoma (genes *ure* y de síntesis de flagelos). Los resultados obtenidos demuestran una mayor variabilidad de los marcadores cromosómicos y una variabilidad intermedia del marcador simbiótico. Esto sugiere que el sistema *hup* se distribuye en fondos genéticos (cromosoma) diversos pero en plásmidos simbióticos muy similares. Esta distribución puede explicarse o bien por una única adquisición de los genes *hup* desde un huésped no determinado y por una rápida diseminación geográfica de este plásmido, o bien por repetidas adquisiciones de los genes *hup* desde el mismo huésped al mismo tipo de plásmido en localizaciones geográficas diferentes.

- (1) Hidalgo *et al.* (1992) J. Bacteriol. **174**: 4130-4139
- (2) Brito *et al.* (1997) PNAS **94**: 6019-6024
- (3) Palacios *et al.* (1990) Mol Gen Genet. **221**: 363-370

INDUCCIÓN DE LOS GENES *RHI* EN *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* BV. *VICIAE* EN RESPUESTA A LA DENSIDAD CELULAR

Rodelas B., Lithgow J., Wilkinson A., Wisniewski-Dyé F. y Downie J.A.

Department of Genetics, John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney Lane, NR4 7UH Norwich, United Kingdom.

Son numerosas las especies bacterianas capaces de monitorizar la densidad de sus poblaciones mediante sistemas de comunicación intercelular. Este mecanismo regulador, conocido como quorum sensing, requiere la acumulación en el medio de compuestos señal que son permeables a través de la membrana celular de las bacterias. Cuando se alcanza un nivel umbral de concentración, estas moléculas interaccionan con proteínas activadoras de la transcripción y se induce la expresión de genes en respuesta a la densidad celular. Las moléculas señal son compuestos difusibles de bajo peso molecular pertenecientes a la familia de las *N*-acil-homoserina lactonas (AHLs). Este sistema de comunicación fue descrito por primera vez implicado en la regulación de la bioluminiscencia en la bacteria marina *Vibrio fischeri*, y los genes involucrados en este proceso se denominan *luxI* y *luxR*. Las AHLs son generalmente sintetizadas por homólogos de LuxI e interaccionan con activadores de la transcripción homólogos de LuxR. Sistemas análogos a LuxI/LuxR se han identificado con frecuencia en relación con procesos de interacción de las bacterias con sus huéspedes, tanto en asociaciones patogénicas como simbióticas.

El plásmido simbiótico de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, pRL1JI, porta el gen *rhiR* cuyo producto es un activador de la transcripción homólogo a LuxR. RhiR activa la expresión del operón *rhiABC*, el cual se expresa en la rizosfera y cumple un papel en el proceso de nodulación (1). Las cepas Sym⁻ de *R. leguminosarum* bv. *viciae* producen *N*-(3*R*-hidroxi-7-*cis*-tetradecanoil)-*L*-homoserina lactona (HtDeHL), la cual se ha demostrado que está involucrada en la regulación del operón *rhiABC* (2). Sin embargo, la presencia de múltiples AHLs además de HtDeHL sugiere la posibilidad de que en lugar de una regulación directa mediante HtDeHL (es decir, el reconocimiento directo de esta señal por RhiR) la respuesta esté indirectamente mediada por otras AHLs cuya síntesis es afectada por HtDeHL.

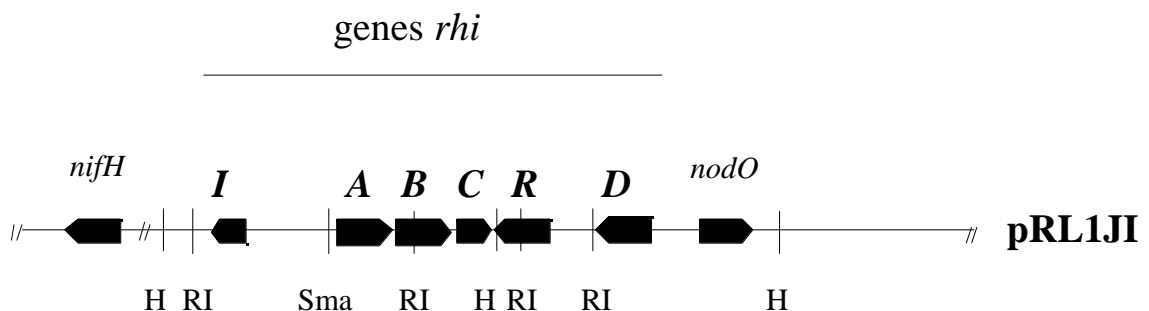
El análisis de la región adyacente a los genes *rhiABCR* en pRL1JI ha conducido a la clonación y secuenciación de dos nuevos genes, *rhiI* y *rhiD* (Fig. 1). El gen *rhiI* es un homólogo de *luxI* y está involucrado en la producción de cinco AHLs diferentes reconocidas por la cepa indicadora *Chromobacterium violaceum* CV026. Dos de los compuestos han sido identificados como *N*-octanoil homoserina lactona (OHL) y *N*-hexanoil homoserina lactona, en función de su co-migración con compuestos estándar en cromatografías en capa fina (TLC). Cuando se analizó la expresión de las

fusiones *rhiI-lacZ* y *rhiA-lacZ* en *R. leguminosarum* cepa 8401 pRLJI, los niveles obtenidos experimentaron una fuerte inducción a mediados de la fase exponencial del crecimiento, cuando se alcanzó una densidad optica (OD₆₀₀) en torno a 0.350-0.400. Sin embargo, ensayando ambas fusiones en la cepa 8401 curada del plasmido simbiótico pRL1JI tal activación de la expresión no tuvo lugar, y resultados similares se obtuvieron con un derivado *rhiR*::Tn5 de pRL1JI. Cuando las fusiones se ensayaron en una mutante derivada de la cepa 8401 defectiva en la producción de HtDeHL, los niveles de expresión obtenidos también fueron similares a los observados en ausencia del plásmido pRL1JI. Estos resultados demuestran que tanto el gen *rhiR* como la presencia de HtDeHL juegan un papel en la activación de la expresión del gen *rhiI*, y confirman los resultados previos obtenidos con respecto a la regulación del gen *rhiA*.

Se dispuso igualmente de un sistema que permitió analizar la influencia de distintas AHLs puras sobre la activación dependiente de RhiR de la expresión de las fusiones *rhiI-lacZ* y *rhiA-lacZ*. Los resultados de estos experimentos demostraron que HtDeHL no activa directamente la expresión de *rhiI* y *rhiA*, mientras que sí se observó inducción directa empleando OHL ó HHL. Estos resultados sugieren que la inducción de *rhiI* o *rhiA* en respuesta a la HtDeHL es probablemente debida a un efecto indirecto que requiere una estimulación de la síntesis de OHL y HHL por la HtDeHL. Por tanto, la regulación de la expresión de los genes *rhi* mediada por AHLs parece estar bajo el control de más de un sistema del tipo *luxI/luxR*, formando parte de una cascada jerarquizada.

El segundo ORF, *rhiD*, se ha identificado en la región por encima del inicio de *rhiR* (Fig. 1), y su expresión esta igualmente bajo el control del sistema *rhiI/rhiR*. Las posibles funciones de *rhiD* o su papel en el proceso de nodulación aún han de ser esclarecidas.

Fig. 1. Mapa de la región *rhi* en pRL1JI (Actualizado de Cubo *et al.*, 1992).



Referencias:

- 1) Cubo M.T. *et al.* (1992) J. Bacteriol. **174**:4026-4035
- 2) Gray K. *et al.* (1996) J. Bacteriol. **178**:372-376.

CONSTRUCCIÓN DE CEPAS DE *SINORHIZOBIUM MELILOTI* ALTAMENTE COMPETITIVAS POR LA NODULACIÓN DE ALFALFA (*MEDICAGO SATIVA*)

van Dillewijn P., Soto M.J., Villadas P. y Toro N.

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Profesor Albareda 1, 18008 Granada, Spain. pieter@eez.csic.es.

Los resultados de la liberación de cepas de *Rhizobium* más eficientes en la fijación de nitrógeno en suelos donde existen poblaciones nativas, con frecuencia han sido poco exitosos debido a que las poblaciones nativas suelen estar mejor adaptadas a su nicho ecológico y son capaces de ocupar más nódulos que la cepa introducida (Maier y Triplett, 1996; Toro, 1996). Hay varias estrategias posibles para solucionar el problema de competitividad por la nodulación. Una de ellas consiste en introducir en la cepa inoculante genes que puedan incrementar su capacidad para competir por la formación de nódulos.

Entre estos genes se encuentran los genes *nfe* (Sanjuan y Olivares 1991; Soto *et al.*, 1993, 1994) y *putA*. (Jiménez-Zurdo *et al.*, 1995, 1997). Los genes *nfe* (*nfeA*, *nfeB* y *nfeD*) identificados en el plásmido no simbiótico pRmeGR4b de la cepa GR4 de *S. meliloti*, precedidos por promotores tipo *nif*, afectan a la eficiencia en la nodulación y competitividad de las cepas que los portan. El gen cromosómico *putA* interviene en la degradación de prolina a glutamato y se ha demostrado que tiene un papel importante en el proceso de colonización de la raíz y competitividad por la formación de nódulos. Esencialmente, se modificará el patrón de expresión de los genes anteriormente mencionados.

Como cepa base para la introducción de estos genes se utilizará *S. meliloti* M4 (Selbitschka *et al.*, 1995). Esta cepa, derivada de 2011, está marcada con el gen *gusA* lo cual permite su identificación en el suelo. Los genes anteriormente mencionados se introducirán en el cromosoma utilizando el vector pK18*mobsac* (Schäfer *et al.*, 1994) en el cual hemos clonado una parte del elemento de inserción *ISRm10-1* (este laboratorio) junto con un cassette de resistencia a espectinomicina y estreptomycin (Prentki and Krisch, 1984). El elemento *ISRm10-1* está presente en una sola copia en el cromosoma de M4. Esto nos permite utilizar dicha secuencia de inserción como una diana para conseguir el intercambio alélico mediante doble recombinación.

Una vez construídas las cepas, se analizará su capacidad competitiva y persistencia en el suelo en estudios de microcosmos. El derivado que muestre el mejor comportamiento, así como la cepa M4 que se utilizará como control, serán posteriormente liberados en campo (Marzo 1999), tanto en suelos con baja (León) como con alta (Granada) población de *S. meliloti*, previamente analizados. La persistencia y porcentaje de ocupancia en nódulos serán evaluados y comparados 1, 3 y 6 meses después de su liberación. Adicionalmente y de forma continua se analizará el impacto de la introducción de las cepas en la ecología del suelo.

En relación con el último punto, se determinará el tamaño y composición de las poblaciones rizobianas mediante técnicas clásicas como i) el aislamiento de rizobios a partir de nódulos de plantas crecidas en suelo y ii) aislamiento de la bacteria directamente del suelo utilizando medios selectivos. Posteriormente, los distintos aislados se analizarán mediante “fingerprint” o análisis del patrón genético. Sin embargo, estas técnicas no permiten la identificación de todas las cepas rizobianas existentes en el suelo, ya que existen bacterias que no llegan a formar nódulos y/o bacterias que no pueden crecer en medio de laboratorio. Es por ello, que estamos intentando poner a punto la técnica basada en PCR cuantitativo (Leser, 1995). Esta técnica se basa en la utilización de un estándar interno fácilmente distinguible por tamaño del gen marcador. Ambos ADNs van a competir en la reacción de la polimerasa por los mismos oligonucleótidos específicos. Comparando el rendimiento de cada uno de los productos con una curva patrón previamente elaborada, se puede determinar la cantidad de gen marcador presente en la muestra de suelo.

Referencias

- Jiménez-Zurdo, J. I., van Dillewijn, P., Soto, M. J., de Felipe, M. R., Olivares, J., and Toro, N. (1995) *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8: 492-498.
- Jiménez-Zurdo, J. I., Garcia-Rodriguez, F. M., and Toro, N. (1997) *Mol. Microbiol.* 23: 85-93.
- Leser, T. D. (1995) *J. Microbiol. Methods.* 22: 249-262.
- Maier, R. J., and Triplett, E. W. (1996) *Critical Rev. Plant Sci.* 15: 191-234.
- Prentki, P. and Krisch, H. M. (1984) *Gene* 29: 303-313.
- Sanjuan, J., and Olivares, J. (1991) *Arch. Microbiol.* 155: 543-548.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. and Pühler, A. (1994) *Gene.* 145: 69-73.
- Selbitschka, W., Dresing, U., Hagen, M., Niemann, S., and Pühler, A. (1995) *FEMS Microbiol. Ecol.* 16: 223-232.
- Soto, M. J., Zorzano, A., Mercado-Blanco, J., Lepek, V., Olivares, J., and Toro, N. (1993) *J. Mol. Biol.* 229: 570-576.
- Soto, M. J., Zorzano, A., García-Rodriguez, F. M., Mercado-Blanco, J., López-Lara, I. M., Olivares, J., and Toro, N. (1994) *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7: 703-707.
- Toro, N. (1996) *World J. Microbiol. and Biotech.* 12:157-162.

EL GEN *LEUA* DE *RHIZOBIUM MELILOTI* ES NECESARIO PARA LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LA NODULACIÓN

Sanjuan-Pinilla J.M., Olivares J. y Sanjuan J.

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas simbióticos. Estacion Experimental del Zaidin-CSIC. Profesor Albareda, 1 E-18008 GRANADA.

Las bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Azorhizobium* y *Bradyrhizobium* poseen la capacidad de establecer simbiosis con plantas leguminosas. La formación del nódulo es inducida por la bacteria, la cual se diferencia en bacteroide en el interior de este nuevo órgano vegetal. Durante la interacción inicial entre *Rhizobium* y su leguminosa hospedadora, operones de genes bacterianos *nod* son inducidos en respuesta a señales secretadas por la planta y, en consecuencia, para sintetizar los factores Nod que inducen la formación del nódulo en la raíz. Además de los genes simbióticos, se han identificado un número de genes rizobianos que son necesarios en condiciones de vida libre y también son necesarios para la infección de la leguminosa hospedadora. Mutaciones en estos genes afectan, en distinto grado, al establecimiento de la simbiosis fijadora de nitrógeno.

Los estudios iniciales sobre la relación entre propiedades simbióticas y requerimientos nutritivos de *Rhizobium* demostraron que mutantes auxótrofos para adenina, uracilo, riboflavina, histidina y leucina mostraban de forma sistemática defectos en sus características simbióticas (1, 2). En todos los casos la adición del factor nutritivo correspondiente restauraba el fenotipo silvestre, indicando una relación bioquímica directa entre la alteración nutritiva y el defecto simbiótico. El caso de los mutantes *leu* de *R. meliloti* es llamativo ya que inducían nódulos Fix⁻ en los que las bacterias no habían sido liberadas del canal de infección. La adición de leucina o precursores de leucina al medio restauraba el fenotipo silvestre. (3)

Se han obtenido 2 mutantes de *Rhizobium meliloti* GR4 auxotrofos para leucina mediante mutagénesis con Tn5. La caracterización de la inserción de Tn5 demostró que la mutación había ocurrido dentro del gen *leuA*, el cual codifica para la -isopropilmalato sintasa, enzima que cataliza el primer paso en la ruta biosintética de la leucina. Uno de los mutantes caracterizados posee la inserción de Tn5 dentro de la primera mitad del gen *leuA* y es incapaz de nodular alfalfa (Nod⁻), mientras que el mutante que lleva la inserción en el extremo 3' del gen muestran una nodulación muy retrasada y además sus nódulos no son fijadores.

Se ha construido un mutante derivado de *R. meliloti* GR4 al cual se le ha deletado el gen *leuA* y se ha sustituido por un cassette de kanamicina. Este mutante es incapaz de nodular, lo cual indica que el fenotipo simbiótico de estos es Nod⁻.

El gen *leuA* de *R. meliloti*, el cual parece no estar ligado a otros genes *leu*, codifica para una proteína de unos 589 aa altamente homóloga a -isopropilmalato sintasa de *Corynebacterium glutamicum* (55.3% de identidad), *Mycobacterium*

tuberculosis (54.4%) y *Saccharomyces cerevisiae* (46.3%). Sin embargo presenta una homología bastante menor frente a bacterias Gram-negativas .

Los mutantes *leuA* muestran muy bajo nivel de expresión de fusiones *nodC:lacZ* y *nodH:lacZ* en presencia de luteolina, si bien la expresión de *nodD1* y *nodD3* no está afectada. La adición de leucina al medio restaura el defecto simbiótico de los mutantes *leuA* , pero no la inducción de *nodC* y *nodH*.

Análisis químicos realizados demuestran que exudados radicales de alfalfa contienen cantidades discretas de leucina, las cuales parecen ser suficientes para permitir el crecimiento de los mutantes, pero insuficientes para soportar el desarrollo de la simbiosis.

El hecho de que los mutantes *leuA* sean capaces de crecer con exudados radicales de alfalfa como única fuente de nitrógeno y que la interrupción del gen *leuA* disminuye la expresión flavonoide dependiente de los genes de la nodulación puede indicar que la auxotrofia para la leucina no es la única causa del defecto simbiótico de los mutantes. Nuestros resultados demuestran que bien la proteína -isopropilmalato sintasa, o bien el producto de su actividad, el -isopropilmalato, son necesarios para la inducción por flavonoides de los genes de la nodulación.

1. Denarié, J., Truchet, G. and B. Bergeron. 1976. Symbiotic nitrogen fixation in plants. 47-63.
2. Kerppola, T. K. and Khan, M. L. 1988. J. of General Microbiology. 134: 913-919.
3. Truchet, G., Michel, M. and Denarié, J. 1980. Differentiation 16: 163-172.

Trabajo realizado con el apoyo del proyecto PB95-0083 de la DGICYT.

PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-HYDROXY KINASE IN THE LEGUME-RHIZOBIUM INTERFACE

Hernández L.E., Escobar C., Drøbak B.K., Brewin N.J.

The John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney Lane, NORWICH NR4 7UH,
United Kingdom. hernand@bbsrc.ac.uk

Relatively recently, a novel family of phosphoinositides has been characterized in several eukaryotes. These lipids all possess a phosphomonoester group in the D-3 position of the inositol ring (1). It has been proposed that these lipids may act as intracellular mediators in signalling events and substantial evidence suggests that they are involved in processes such as the control of cell mobility, signalling via the Ras pathway, apoptosis, vesicle trafficking and secretion (2). Several enzymes responsible for 3-phosphorylation of phosphoinositides have been identified; the first phosphoinositide 3-kinase to be purified and characterized was the mammalian p85-p110 dimeric enzyme which associates with activated tyrosine kinase receptors (3). The yeast protein, Vps34p has been identified as another phosphatidylinositol (PtdIns) 3-kinase. In contrast to the mammalian p85-p110 enzyme, Vps34 only phosphorylates PtdIns in the D-3 position but it is incapable of D-3 phosphorylating PtdIns(4)P and PtdIns(4,5)P₂ (4). Recently, a mammalian enzyme with considerable homology to Vps34p was cloned and it seems likely that this enzyme, like its yeast homolog, is involved in vesicle trafficking (5).

It is now clear that several classes of PtdIns 3-kinases are present in a wide variety of eukaryotic organisms. However, in lower eukaryotes such as the slime mould, *Dictyostelium discoideum* (6), the alga *Chlamydomonas reinhardtii* (7) and plants (*Daucus carota*, 8) only Vps34p-related PtdIns 3-kinases have so far been identified. Two cDNAs with high homology to *VPS34* have been cloned from the plants *Arabidopsis thaliana* (*AtVPS34*, 9) and *Glycine max* (*pSPI3K*, 10). These cDNA sequences have significant homology to the cDNAs encoding for both bovine PtdIns 3-kinase and yeast PtdIns 4-kinase. The importance of PtdIns 3-kinase activity for normal cell development in plants has been demonstrated using transgenic *A. thaliana* plants expressing antisense *AtVPS34*. The growth of *AtVPS34* antisense transgenic plants was found to be severely impaired (9). Furthermore, in young soybean nodules at a developmental stage characterised by high rate of cell proliferation, it was observed an accumulation of transcripts of the *pSPI3K-1* gene encoding a PtdIns 3-kinase (10). In this stage of the symbiotic process, there is particular need for a high level of vesicle production and membrane biogenesis (11).

An Expressed Sequence Tag (EST) cDNA library of *Medicago truncatula* root hairs treated with Nod factor is available (prepared by Prof. S.R. Long and co-workers, Stanford, USA; <http://bio-srl8.stanford.edu>). From this database, we have identified and sequenced one EST (accession number: 00356) with a high homology (70%) to the protein product encoded by the *pSPI3K-1* gene which is overexpressed in young soybean nodules (10). To study the role of PtdIns 3-kinase during the

establishment of the *Rhizobium*-legume symbiosis we have analysed the expression of the gene encoding for this putative PtdIns 3-kinase by northern blot. Preliminary data indicated that levels of transcripts accumulation were similar in all tissues studied (shoot meristem, leaves, stem, roots and nodules of four week old *Medicago* plants infected with *Rhizobium melilotii*). Furthermore, southern blot analysis suggested that one or more homolog genes might be also present in very related legume species.

Acknowledgements. L.E.H. and N.J.B. gratefully acknowledge financial support from the EU HCM Programme: Signals in Symbiosis (CHRX-CR94-0699). Work in the B.K.D. laboratory was supported by the B.B.S.R.C. Intracellular Signalling Initiative. We are grateful to Prof. S.K. Long (Stanford, USA) for the donation of the 00356 EST clone.

References

1. Kapeller, R., & Cantley, L.C. (1994) *BioEssays* **16**, 565-576.
2. Carpenter, C.L., & Cantley, L.C. (1996) *Current Opinion Cell Biol.* **8**, 153-158.
3. Carpenter, C.L., Duckworth, B.C., Auger, K.R., Cohen, B., Schaffhausen, B.S., & Cantley, L.C. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 19704-19708.
4. Schu, P.V., Takegawa, K., Fry, M.J., Stack, J.H., Waterfield, M.D., & Emr, S.D. (1993) *Science* **260**, 88-91.
5. Volinia, S., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Macdougall, L., Stein, R., Zvelebil, M.L., Domin, J., Panaretou, C., & Waterfield, M.D. (1995) *EMBO J.* **14**, 3339-3348.
6. Zhou, K., Takegawa, K., Emr, S.D., & Firtel, R.A. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 5645-5656.
7. Munnik, T., Irvine, R.F., & Musgrave, A. (1994) *Biochem. J.* **298**, 269-286.
8. Dove, S.K., Lloyd, C.W., & Dr bak, B.K. (1994) *Biochemical J.* **303**, 347-350.
9. Welters, P., Takegawa, K., Emr, S.D., & Chrispeels, M.J. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11398-11402.
10. Hong, Z., & Verma, D.P.S. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 9617-9621.
11. Brewin, N.J. (1991) *Ann. Rev. Cell Biol.* **7**, 191-226.

ESTRATEGIAS PARA CLONAR SYM 8: UN GEN CLAVE EN LA INTERACCIÓN RHIZOBIUM-LEGUMINOSAS

González E.M.^{1,2}, Koulikova O.², Geurts R.², Ellis N.³ y Bisseling T.².

¹Departamento de Ciencias del Medio Natural, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona. e-mail: esther.gonzalez@upna.es

²Wageningen Agricultural University. Molecular Biology Department. Dreijenlaan 3, 6703 HA Wageningen, Países Bajos.

³Department of Applied Genetics, John Innes Centre, Colney Lane, Norwich NR4 7UH, UK.

Introducción

La interacción simbiótica entre plantas de la familia de las leguminosas y las bacterias del género *Rhizobium* comienza con el intercambio de señales entre ambos simbiontes. Las raíces producen flavonoides, que activan la expresión de los genes de nodulación bacterianos (*nod*). Estos genes *nod* dan lugar a la producción de lipo-oligosacáridos, conocidos como factores Nod. El reconocimiento de la planta de un determinado factor Nod es el punto de partida para que se produzcan las primeras respuestas en la planta que darán lugar a la formación de un nódulo (Vijn et al, 1993). Estos compuestos producen la deformación de los pelos radicales y la expresión génica en la epidermis radical (Horvath et al, 1993), así como la reactivación mitótica de las células corticales que resulta en la formación de un primordio nodular. Los canales de infección son unas estructuras tubulares que conducen la bacteria desde la superficie radical hasta el primordio nodular y aunque los factores Nod no inducen la formación de estas estructuras, sí son los responsables de la reorganización citoplásmica que ocurre en las células corticales antes de que el canal de infección atraviese esta zona de la raíz (Vijn et al, 1993).

En base a estudios mutagénicos llevados a cabo en *Pisum sativum* L., han sido descritos alrededor de 30 genes esenciales para que *Rhizobium* pueda inducir una nodulación normal en la planta, que se conocen como genes simbióticos (*sym*) (Weeden et al., 1990; Brewin et al., 1993). Nuestro objetivo es identificar el gen *sym* 8, para lo cual se dispone de tres líneas mutantes de *Pisum sativum* L. cv. Sparkle: E140, producido por EMS, y R19 y R25, producidos por radiación gamma. Estos mutantes presentan un fenotipo *Nod*⁻ que se caracteriza por no presentar división de las células corticales, ni iniciación del primordio nodular, ni deformación de los pelos radicales y ausencia de canales de infección (Markwei y LaRue, 1992). Markwei y LaRue (1992) observaron que la línea mutante R25 presentaba un crecimiento similar a la línea parental Sparkle, cuando se le suministraba una fuente exógena de nitrógeno, lo cual sugiere que la incapacidad de la planta para formar nódulos es la responsable de la limitación del crecimiento que se produce en estos mutantes cuando crecen en condiciones simbióticas. Las bacterias se ven atraídas por las raíces de la línea mutante en la misma medida que por la línea parental, produciéndose en ambos casos una inducción similar de la expresión de los genes *nod* bacterianos (Markwei y LaRue, 1992). Estos resultados sugieren que la mutación en el gen *sym* 8 bloquea el proceso de nodulación en las primeras etapas del mismo, siendo afectada la percepción de factores Nod o etapas intermedias en la ruta que conduce a la división de las células corticales. La caracterización de este gen puede resultar de gran importancia a la hora de conocer de qué forma los factores Nod son reconocidos por la planta y qué tipo de señal se activa a partir de este reconocimiento.

Resultados y Discusión

Para identificar posibles clones del gen sym 8 se utilizó la técnica Differential Display Reverse Transcriptase PCR (Liang y Pardee, 1992). Esta estrategia se llevó a cabo comparando ARN mensajero de pelos radicales de las líneas Sparkle, R25 y E140 con 114 combinaciones diferentes de primers.

Puesto que estos mutantes presentan un crecimiento normal cuando crecen a expensas de nitrógeno suministrado exógenamente, la mutación que presentan no debe afectar a muchos genes sino principalmente a un gen relacionado con la interacción planta-bacteria. A pesar de esta primera hipótesis y por lo tanto de un número reducido de diferencias esperadas, se observaron 75 diferencias entre la línea parental y uno o ambos de los mutantes. Se debe considerar que esta técnica se desarrolla a nivel de expresión génica y por lo tanto las diferencias observadas pueden ser debidas al gen mutado en sí o a genes regulados por este. Por este motivo, el análisis incluye un mutante EMS (E140) y uno de radiación gamma (R25). La hipótesis inicial fue que las diferencias debidas al gen mutado en sí, aparecerían en Sparkle y en E140 y no aparecerían en R25, puesto que la mutagénesis por EMS (E140) da lugar a mutaciones puntuales que difícilmente serían detectadas. Por otra parte, las diferencias que aparecerían en Sparkle pero en ninguno de los mutantes o viceversa, corresponderían a genes regulados por el gen mutado.

Del total de diferencias observadas, 25 de ellas fueron mapeadas en una pequeña población de plantas que presentaban fenotipo Nod⁻ y que fueron obtenidas del cruce entre Sparkle R25 y la línea control 1238. Sin embargo, no fueron observados RFLPs ligados al gen sym 8 con ninguno de los clones analizados.

El gen sym 8 se encuentra localizado en el cromosoma 6. Actualmente no se conocen marcadores moleculares ligados a este gen. Tres marcadores moleculares, pcD7, cDNA48 y cDNA324, descritos por Noel Ellis (UK) se encuentran en la zona donde sym 8 está localizado y fueron mapeados en la misma población de plantas Nod⁻.

La caracterización de los clones analizados y una evaluación de los métodos serán presentados.

Bibliografía

- Brewin NJ, Ambrose MJ y Downie JA. 1993. Casey R y Davies DR Eds. CAB International, Wallingford, UK.
- Horvath B, Heidstra R, Lados M, Moerman M, Spaik HP, Promé JC, van Kamen A y Bisseling T. 1993. *Plant Journal*, 4: 727-733.
- Liang P y Pardee AB. 1992. *Science*, 257: 967-971.
- Markwei CM y LaRue TA. 1992. *Canadian Journal of Microbiology*, 38: 548-554.
- Vijn I, das Neves L, van Kamen A, Franssen H y Bisseling T. 1993. *Science*, 260: 1764-1765.
- Weeden NF, Kneen BE y LaRue TA. 1990. Gresshoff PM, Roth ST, Stacey G y Newton WE Eds. Chapman and Hall, New York-London.

SISTEMA PARA EL ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE NODULINAS EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *LUPINUS ALBUS*

Peregrín Alvarez J.M. y Chamber Pérez M.A.

C.I.F.A. “Las Torres”. Dpto. Fijación de Nitrógeno.
Apdo. Oficial, Alcalá del Río, 41200 Sevilla.
E-Mail: cifatorr@cap.caan.es

De entre las numerosas especies del género *Lupinus*, sólo cuatro de ellas, *L. albus*, *L. luteus*, *L. angustifolius* y *L. mutabilis*, son consideradas como especies cultivadas. De ellas, *L. albus* suele proporcionar las mejores producciones de grano. Dado que los estudios de transformación genética con *Lupinus* han sido escasos y los éxitos obtenidos son aún muy limitados, hemos creído conveniente, poner a punto una técnica rápida y eficiente para la obtención de *Lupinus* transformados genéticamente, y disponer de una metodología para el estudio de la expresión de genes de nodulinas tardías.

Para llevar a cabo estos estudios, se ha utilizado una construcción de diferentes cepas de *Agrobacterium rhizogenes*, AHTC24, Biovar 2, ATCC 15834 y L.Moore A4 (portadoras del plásmido Ri) con el vector “reporter” pBI121 (portador del gen GUS y gen Km^R). Las semillas de *L.albus* cv. LA-26, una vez germinadas, fueron infectadas con dichas bacterias, llevando en paralelo los debidos controles. Durante la 1ª - 2ª semana de infección comenzaron a desarrollar las primeras raíces transgénicas, y tras su desarrollo fue cortada la raíz principal de la planta, obligándola de esta forma a desarrollarse a partir de las raíces transgénicas. La zona radicular de la planta fue inoculada con *Bradyrhizobium sp.* (*Lupinus*) y a las dos semanas ya comenzaron a apreciarse los primeros nódulos.

Se ha realizado un estudio comparativo entre las diferentes construcciones, analizando la expresión del gen GUS a lo largo de las diferentes etapas de desarrollo radicular y nodular, con el objeto de determinar cual o cuales de estas variedades es la más adecuada para nuestros fines. Los parámetros analizados a lo largo del tiempo fueron los siguientes: 1) En zona radicular: a) “Hairy root (h.r)”: % plantas con h.r, nº h.r/planta, % h.r GUS +, nivel de desarrollo de h.r; b) Nódulos: peso nodular (gr)/planta, nº nod/planta, % nod. GUS +, actividad Nitrato-reductasa. 2) En zona aérea: peso (gr.).

Los resultados obtenidos muestran como si bien la cepa de *A.rhizogenes* Biovar 2 destaca en lo referente a eficiencia y desarrollo de raíces que expresan el gen GUS, es la cepa *A. rhizogenes* L.Moore A4 la que destaca en cuanto a eficiencia y desarrollo de nódulos que expresan el gen GUS. Por lo tanto, para el estudio de la expresión de genes de nodulinas en plantas transgénicas de *L. albus* mediante sistema heterólogo seleccionamos a L.Moore A4, mientras que para futuros experimentos de transformación genética por sistema homólogo elegimos al Biovar 2 al ser esta, con la que obtenemos un mayor número de raíces transformadas, con las cuales se está intentando la regeneración de la planta transgénica completa.

En la actualidad se está realizando este mismo estudio en otros *Lupinus* de interés agronómico (*L.luteus*). Todos estos experimentos se están llevando en paralelo a la obtención de las principales nodulinas tardías de interés de *L. albus* (Sacarosa Sintasa, Glutamina Sintetasa, Aspartato Aminotransferasa, L-Asparragina, etc), utilizando para ello una genoteca de cDNA sintetizado a partir de ARN poliadenilados extraídos de nódulos de entre dos y cuatro semanas, y determinadas sondas marcadas (obtenidas por RT-PCR o cedidas por investigadores), las cuales una vez obtenidas nos servirán para estudiar su expresión en nódulos transgénicos de *L. albus* salvajes y otras plantas mutantes alteradas en sus características fijadoras de Nitrógeno.

SECCION 3

ECOLOGÍA Y AGRONOMÍA

LA SIMBIOSIS *SINORHIZOBIUM MELILOTI*-ALFALFA EN CONDICIONES ÁCIDAS

Soto M.J., Segundo E., Martínez-Abarca F., van Dillewijn P. y Toro N.

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Profesor Albareda 1, 18008 Granada. soto@eez.csic.es.

La acidificación del suelo, acelerada por ciertas prácticas agrícolas y la lluvia ácida, afecta a casi un 40% de la tierra cultivable en el mundo. El crecimiento y persistencia de alfalfa (*Medicago sativa*) se ven limitados en condiciones de acidez moderada. Esto se debe a que tanto la planta, la población nativa de rizobios como la interacción simbiótica que se establece entre ambos se encuentran afectados por el bajo pH y los desbalances iónicos que llevan asociados los suelos ácidos (deficiencias en P, Ca, Mg, K y niveles tóxicos de Al, Mn y Fe) (Graham, 1991; Glenn y Dilworth, 1994). En general, la existencia de un pH ácido moderado provoca un retraso en la nodulación y una reducción en el número de nódulos que la leguminosa es capaz de formar.

La tolerancia a la acidez es variable entre los distintos rizobios. Así, las bacterias pertenecientes al género *Bradyrhizobium* y las del grupo de *Rhizobium leguminosarum* son moderadamente ácido-tolerantes (pueden crecer hasta un pH 4-4.5), mientras que *S. meliloti* es la más ácido-sensible, presentando problemas en su crecimiento a pHs inferiores a 5.5. Poco se conoce sobre cuáles son los mecanismos que permiten la tolerancia a la acidez, aunque se ha sugerido que un gran número de genes deben estar implicados.

El éxito conseguido en Australia en el establecimiento de leguminosas en suelos ácidos gracias a la utilización de cepas ácido-tolerantes aisladas de Sardinia, pone de manifiesto que la selección de cepas rizobianas más tolerantes a la acidez puede ser una medida efectiva para incrementar la productividad de algunas leguminosas en suelos ácidos. Por otro lado, es importante determinar qué factor/es contribuyen a la restricción de la nodulación en la simbiosis *S. meliloti*-alfalfa, con objeto de buscar posibles soluciones a este problema.

En relación con el primer punto, se ha llevado a cabo un estudio de distintas poblaciones nativas rizobianas capaces de nodular alfalfa, aisladas de distintos suelos ácidos de Argentina y Uruguay. La caracterización de estos aislados ha permitido distinguir dos tipos de cepas: cepas de *S. meliloti*, incapaces de crecer a pHs inferiores a 5,5, y cepas ácido-tolerantes capaces de crecer a pH 5,2. El posterior análisis de la secuencia del ADN que codifica para el ARN ribosómico de 16S mostró que las cepas ácido-tolerantes pertenecen al grupo de *Rhizobium* spp. Or 191 (Eardly *et al.*, 1985). Desgraciadamente, estas cepas tipo Oregón capaces también de nodular judía, forman nódulos inefectivos en alfalfa. Una caracterización preliminar de los distintos aislados ha permitido obtener las siguientes conclusiones:

- 1.- En medio definido, los aislados de suelos ácidos de *S. meliloti* no muestran características especiales en su crecimiento a bajo pH, comportándose de forma similar a como lo hacen cepas aisladas de suelos neutros.
- 2.- A pH 5,6 todos los aislados muestran un retraso en la nodulación y una reducción en el número de nódulos de aproximadamente un 50%, por lo que parece que el

efecto negativo de la acidez es independiente de la tolerancia a la acidez del microsimbionte.

3.- La cepa tipo Oregón LPU83 es capaz de competir eficientemente por la formación de nódulos a pH ácido pero no a pH neutro donde es desplazada por cualquier cepa de *S. meliloti* (Fig. 1). Puesto que esta cepa es ineficiente en fijación de nitrógeno, el resultado de su alto grado de competitividad a pH ácido es una reducción en la productividad de alfalfa. La presencia pues de estas cepas en suelos ácidos plantea un nuevo problema al rendimiento de alfalfa en condiciones ácidas.

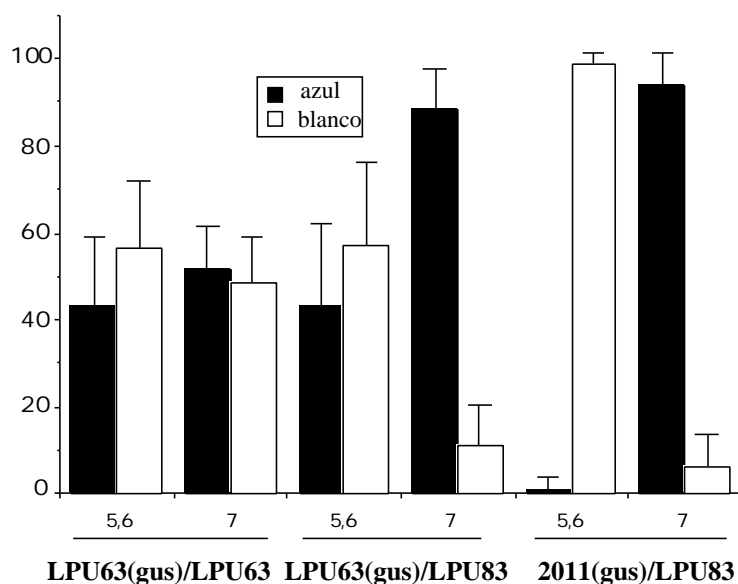


Fig. 1.- Efecto del pH sobre la competitividad de las cepas de *S. meliloti* LPU63 y 2011 y la cepa *Rhizobium* spp. tipo Or 191, LPU83.

Con objeto de idear estrategias que ayuden a solventar la baja productividad de los cultivos de alfalfa en suelos ácidos, se ha hecho un estudio detallado de los distintos aspectos de la simbiosis que puedan verse negativamente afectados como consecuencia de la acidez.

Estudios realizados por Munns en 1968 ya indicaban que la etapa ácido-sensible en la nodulación de *M. sativa* ocurría dentro de las primeras 12 horas tras la inoculación, coincidiendo con el período de mayor requerimiento de calcio para la formación del nódulo. Se sabe que los iones de calcio y los protones interaccionan en la nodulación de alfalfa y que los requerimientos de calcio para el proceso de nodulación se incrementan al bajar el pH (Munns, 1970). Existen varias etapas durante el proceso de nodulación que pueden verse influenciados por el pH y la concentración de calcio y que podrían explicar la dependencia de la nodulación de alfalfa por estos dos factores: 1) El crecimiento y la supervivencia de *S. meliloti* (Barnet, 1991) 2) la adhesión de los rizobios a la raíz (Caetano-Anollés *et al.*, 1989) y 3) la inducción de los genes *nod* (Richardson *et al.*, 1988). Comparando dos cepas de *S. meliloti* (2011 y GR4) y la cepa ácido tolerante *Rhizobium* spp. LPU83, hemos analizado la influencia que tienen el pH y el Ca durante esas distintas etapas.

Tanto el crecimiento, la adhesión a la raíz como la inducción de los genes *nod* se hallan fuertemente reducidos en las cepas de *S. meliloti* en condiciones de acidez. La adición de calcio consigue recuperar los dos primeros pero no así la inducción de los genes *nod*. Por otro lado, la actividad de los exudados producidos por alfalfa no parece estar alterada como consecuencia del pH ácido, por lo que la reducción observada en la expresión de los genes *nod* en las cepas de *S. meliloti* puede ser el

resultado de una deficiencia en el reconocimiento de los inductores. En el caso de la cepa ácido-tolerante LPU83, ninguna de las etapas tempranas de la simbiosis se encuentra influenciada por pH o calcio. Asimismo, cuando se analizan las cinéticas de nodulación a pH 5,6, mientras que en las cepas de *S. meliloti* se observa una recuperación tras la adición de calcio, en el caso de la cepa LPU83, su cinética de nodulación no se ve afectada.

No se conoce cuál es la contribución de la planta a la restricción de la nodulación en condiciones ácidas, aunque en general el crecimiento de la leguminosa es menos sensible a la acidez que otros aspectos de la simbiosis. Existen especies de *Medicago* (*M. polymorpha* y *M. murex*) con mejor capacidad para nodular a bajo pH, lo cual se ha relacionado con su capacidad para producir exudados que son capaces de inducir los genes *nod* de las poblaciones rizobianas. Por otro lado, los mutantes *nts* de soja, alterados en la respuesta de autoregulación y capaces de formar muchos nódulos incluso en presencia de nitrato, son parcialmente tolerantes a la acidez. Estos mutantes parecen ser menos sensibles al efecto inhibitor en la nodulación del etileno.

El estrés producido por la acidez podría desencadenar una respuesta similar a la que ha sido descrita que es producida por la luz y el nitrato (Ligero et al., 1991; Lee and LaRue, 1992), incrementando los niveles de etileno endógeno y limitando así la nodulación. Con objeto de determinar si una respuesta de hipersensibilidad de la planta disparada por la acidez, es responsable de la limitación de la nodulación en estas condiciones, hemos realizado tres tipos de estudio: 1) un análisis de los aspectos morfológicos del proceso infectivo mediante el uso de la proteína verde fluorescente (GFP) de *Aequorea victoria* para comprobar si la reducción en el número de nódulos es consecuencia de una reducción en el número de infecciones o un aumento en el número de canales de infección que llegan a abortar; 2) medidas de la producción de etileno en plantas no inoculadas y 24 horas después de la inoculación y 3) Cinéticas de nodulación en las que se ha adicionado plata que es un inhibidor de la acción del etileno.

Nuestros resultados sugieren que la restricción en la nodulación en la simbiosis *S. meliloti*-alfalfa en condiciones ácidas no se debe a una reacción de hipersensibilidad por parte de la planta. Por otro lado, el análisis del proceso infectivo revela que a pH ácido las cepas de *S. meliloti* pierden una gran capacidad de colonizar la raíz, lo cual puede suponer una gran restricción en todo el proceso de posterior nodulación.

Durante la formación de un nódulo, se inducen genes específicos de la planta a cuyos productos se les conoce como nodulinas. Se ha postulado que las nodulinas tempranas podrían estar implicadas en la infección bacteriana y/o el desarrollo del nódulo. Eliminando el factor bacteria, hemos analizado el efecto de la acidez en otro de los procesos que tienen lugar muy pronto durante el desarrollo de la simbiosis: la expresión de nodulinas tempranas en respuesta a factores Nod aislados de *S. meliloti*. Nuestros resultados indican que la percepción y/o la transmisión de la señal desencadenada por los factores Nod se encuentra alterada en plantas que se hallan en condiciones de pH ácido. Sorprendentemente, la adición de calcio recupera esta respuesta.

Referencias

- 1.- Barnett, Y.P. (1991) The Biology and Biochemistry of Nitrogen Fixation. (Dilworth, M.J. and Glenn, A.R. Eds) pp 199-208. Elsevier. Amsterdam.
- 2.- Caetano-Anollés, G., Lagares, A. and Favelukes, G. (1989) Plant and soil 117, 67-74.

- 3.- Eardly, B.D., Hannaway, D.B. and Bottomley, P.J. (1985) *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 1422-1427.
- 4.- Glenn, A.R. and Dilworth, M.J. (1994) *FEMS Microbiol. Lett.* 123, 1-10.
- 5.- Graham, P.H. (1991). *Can. J. Microbiol.* 38, 475-484.
- 6.- Lee, K.H. and LaRue, T.A. (1992) *Plant Physiol.* 100, 1334-1338.
- 7.- Ligeró, F., Caba, J.M., Lluch, C. and Olivares, J. (1991) *Plant Physiol.* 97, 1221-1225.
- 8.- Munns, D.N. (1968) *Plant and Soil* 28, 129-146.
- 9.- Munns, D.N. (1970) *Plant and Soil* 32, 90-102.
- 10.- Richardson, A.E., Simpson, R.J., Djordjevic, M.A. and Rolfe, M.G. (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2541-2548

PERFILES DE RNA ESTABLES DE BAJO PESO MOLECULAR COMO MARCADORES MOLECULARES EN ESTUDIOS TAXONOMICOS

Mateos González P., Velázquez Pérez E. y Martínez Molina E.

Dpto. Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca. 37007 Salamanca.
pfmg@gugu.usal.es

Existen millones de organismos vivos en la Naturaleza, siendo algo característico del hombre su afán por ordenar esa gran variedad de organismos. Con esa necesidad de ordenamiento surge la Taxonomía como la ciencia de la clasificación, nomenclatura e identificación. Comprende, por tanto, las labores de ordenamiento de los individuos según unos parámetros o características previamente establecidos, la labor de denominación de los grupos resultantes del ordenamiento anterior, y la labor de reconocimiento de un individuo como igual o distinto a otro ya clasificado y denominado.

Los caracteres utilizados para establecer las clasificaciones microbianas han ido cambiando a medida que se han desarrollado nuevas técnicas, o mejorado las existentes, y han aumentado los conocimientos disponibles sobre los microorganismos. Se comenzó utilizando las características morfológicas y fisiológicas hasta que el desarrollo de la biología molecular permitió utilizar los constituyentes moleculares de las bacterias, principalmente proteínas y ácidos nucleicos, como nuevos criterios de clasificación, obviando así las limitaciones de los métodos iniciales.

Debido al tamaño y estructura celular de los microorganismos, su relación filogenética ha emergido sólo a partir de los análisis genotípicos. Sin embargo, los análisis fenotípicos han jugado tradicionalmente un papel importante en la identificación de los microorganismos, especialmente en aquellas situaciones prácticas donde el fin último es la propia identificación de los microorganismos. No obstante, algunos métodos genotípicos se están introduciendo en la identificación debido a su sensibilidad, rapidez y especificidad.

El material genético es el depositario de toda la información de cada individuo lo que convierte a estas moléculas en las ideales para conocer las relaciones que puedan existir entre los distintos organismos. El estudio del material genético se ha realizado con todos los tipos de ácidos nucleicos estables mediante diferentes técnicas. No obstante, el rRNA presenta ciertas características que lo convierten en un tipo de moléculas muy adecuado para estudios filogenéticos. Estas moléculas están presentes en todas las células, con un alto grado de conservación por la baja velocidad de cambio en sus secuencias, su función es la misma en todas las células y su aislamiento, así como el del DNA que codifica las moléculas de rRNA, es relativamente fiable. Sin embargo, la secuenciación de estas moléculas es una técnica

compleja que difícilmente puede introducirse como técnica de identificación en un laboratorio. La situación ideal sería elaborar una clasificación basada en la filogenia pero que al mismo tiempo posibilitara una identificación sencilla y rápida. Esta situación se puede conseguir utilizando las propias moléculas de RNA pero aplicando técnicas más rápidas y sencillas que la secuenciación.

En 1988, Höfle (1) describió una técnica electroforética que permitía la separación de moléculas de RNA de pequeño tamaño que permanecen estables a lo largo del crecimiento de las células. Este conjunto de moléculas denominadas LMW RNA está constituido por el 5S rRNA y los tRNA. En 1990, el mismo autor (2) propuso la utilización de los perfiles de LMW RNA como marcadores moleculares en bacterias postulando que el número y la disposición de las bandas que integran estos perfiles constituyen un criterio taxonómico en la identificación de bacterias desde un punto de vista genotípico. Sin embargo, el mayor inconveniente de la técnica era el pequeño número de bandas individuales que se lograban separar debido a la baja resolución de la técnica electroforética utilizada. A pesar de este inconveniente diversos autores han utilizado estos perfiles en la identificación bacteriana (1-6) así como en estudios de poblaciones microbianas (7-9).

Recientemente nuestro grupo de investigación ha desarrollado una nueva técnica electroforética (staircase electrophoresis: SCE) en geles de poliacrilamida que permite obtener una mejor resolución en los perfiles de LMW RNA (10) lo que incrementa su utilidad.

El análisis de los perfiles obtenidos aplicando la SCE nos ha permitido realizar estudios taxonómicos sobre los distintos miembros de la familia *Rhizobiaceae* (11). Estos estudios ponen de manifiesto la necesidad de cambios en la estructura taxonómica de este grupo. Algunos de estos cambios ya han sido aceptados (Género *Mesorhizobium*) mientras que otros, posiblemente más radicales, no tarden en aceptarse. Este es el caso de las especies incluidas dentro del Género *Bradyrhizobium*. Nuestros datos muestran una variabilidad interespecífica en la zona 5S rRNA por lo que su agrupamiento dentro del mismo género debería ser revisado, especialmente en el caso de *B. liaoningense*.

Estos datos junto con los obtenidos con otros grupos microbianos (*Frankia*, *Clavibacter*, *Bacillus*, levaduras) nos permiten concluir que:

- (i) Es posible distinguir el Dominio Bacteria del Dominio Eukarya en base a la ausencia o presencia de la zona 5,8S rRNA.
- (ii) Cada uno de los Géneros de bacterias analizados hasta la fecha presenta un perfil característico en la zona del 5S rRNA por lo que puede considerarse un criterio útil para asignar Géneros bacterianos.
- (iii) Cada uno de los Géneros de levaduras analizados hasta la fecha presenta un perfil característico en las zonas del 5,8S y 5S rRNA por lo que puede considerarse un criterio útil para asignar Géneros de levaduras.
- (iv) Los perfiles de LMW RNA en su conjunto son un criterio útil para diferenciar y definir especies.

Independientemente de consideraciones taxonómicas, es indudable la versatilidad de la técnica para el análisis de poblaciones microbianas por:

- (a) La universalidad, importancia biológica y número de moléculas diferentes que componen el material analizado (5,8S rRNA, 5S rRNA, tRNA).
- (b) La fiabilidad y repetitividad de la técnica de análisis (SCE).
- (c) La posibilidad de realizar análisis simultáneos de un gran número de aislados.

Debido a estas características, los perfiles de los LMW RNA obtenidos al aplicar la SCE nos permite el estudio en un corto espacio de tiempo de numerosos aislados no sólo de especies ya descritas, sino también de otras especies bacterianas que nodulan leguminosas aún sin estudiar y también a aquellas especies de otros grupos microbianos que comparten con ellas la rizosfera. Por consiguiente, la utilización de esta técnica posibilita estudios de biodiversidad e impacto ambiental; estudios de gran interés y actualidad debido a la importancia tanto ecológica como económica de las leguminosas.

Bibliografía

1. Höfle, M.G. (1988). *J. Microbiol. Methods* **8**: 235-248.
2. Höfle, M.G. (1990). *Arch. Microbiol.* **153**: 299-304.
3. Demezas, D., Bell, J. (1995). *Syst. Appl. Microbiol.* **18**: 582-589.
4. Collins, D., Slade, P., Goethals, M. (1991). *Int. J. Food Microbiol.* **14**: 135-144.
5. Höfle, M.G., Ruger, H. (1992). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**: 133-143.
6. Slade, P., Collins, D. (1991). *J. Appl. Bacteriol.* **70**: 355-360.
7. Bidle, K., Fletcher, M. (1995). *Appl. Environm. Microbiol.* **61**: 944-952.
8. Höfle, M.G. (1992). *Appl. Environm. Microbiol.* **58**: 3387-3394.
9. Höfle, M.G., Brettar, I. (1996). *Appl. Environm. Microbiol.* **62**: 1383-1390.
10. Cruz-Sánchez, J.M., Velázquez, E., Mateos, P., Velázquez, E., Martínez-Molina, E. (1997). *Electrophoresis* **18**: 1909-1911.
11. Velázquez, E., Cruz-Sánchez, J.M., Mateos, P., Martínez-Molina, E. (1998). *Appl. Environm. Microbiol.* **64**: 1555-1559.

INFLUENCIA DE RIZOBACTERIAS PERTENECIENTES AL GÉNERO *PSEUDOMONAS* EN EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE DOS VARIEDADES COMERCIALES DE *VICIA VILLOSA* ROTH

Acero N., Probanza A., Lucas J.A., Ramos B., Barrientos M.L. y Gutiérrez Mañero F.J.

Dpto. Biología, Fac. CC Experimentales y Técnicas, Universidad San Pablo CEU. Urb. Montepríncipe, 28660 Boadilla del Monte. Madrid. nacemes@ceu.es

El deterioro ambiental causado por el empleo de sustancias sintéticas para la mejora de la producción vegetal (biocidas, abonos químicos etc.), ha generado la necesidad de poner a punto nuevos sistemas que permitan un incremento de los rendimientos agrícolas y forestales, junto con el desarrollo de una agricultura sostenible (Swaminathan 1991). Entre los sistemas biotecnológicos empleados en la mejora de la producción vegetal cabe destacar el empleo de inóculos fúngicos y bacterianos sobre el sustrato edáfico en el que se desarrollan las plantas o sobre las semillas antes de la siembra. El empleo de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs), se muestra como uno de los sistemas más prometedores para mejorar los rendimientos de la producción de biomasa vegetal, evitando los efectos secundarios de los métodos actuales de fertilización y protección frente a plagas.

El objetivo del presente estudio es seleccionar cepas bacterianas promotoras del crecimiento de la rizosfera de tres poblaciones naturales de *Vicia villosa*, ya que según la mayoría de los autores, las rizobacterias de poblaciones naturales son características de la especie vegetal y aparecen en dicho sistema como resultado de un proceso de selección encaminado a mejorar el crecimiento de las plantas y reducir los síntomas causados por diversos patógenos (Kloepper *et al.*, 1992).

Realizamos tres muestreos en cada una de las poblaciones, en tres estados del ciclo fenológico de las plantas (vegetativo, floración y fructificación), aislándose un total de 120 cepas por población. Para la determinación de las colonias hasta el nivel de género se siguió el esquema diagnóstico de Acero *et al.* (1994). Los géneros mayoritarios en todos los casos resultaron ser *Bacillus* y *Pseudomonas*, siendo este último género el que predominaba en la mayor parte de los muestreos. Por ello centramos nuestro trabajo en las cepas pertenecientes al mismo. Con las cepas seleccionadas se hizo un análisis de variabilidad genética mediante amplificación del ADN con PCR-RAPDs (4 primers por cepa, de 10 nucleótidos de longitud), los

datos se procesaron mediante los programas Lane Manager 2.1 y ADA 1.0 (Nei y Miller, 1990; Clark y Lanigan, 1993). Este análisis nos permitió hacer una nueva selección en base a su divergencia genética, obteniendo 23 cepas con una divergencia genética superior al 10%, con dichas cepas se llevaron a cabo pruebas biológicas de crecimiento y desarrollo sobre las dos variedades de *V. villosa* más utilizadas comercialmente en España (Namoi y Látigo).

Para llevar a cabo las pruebas biológicas, las cepas seleccionadas se cultivaron en medio líquido durante 24 h, tras lo cual se centrifugó y filtró a través de 0.2 μ para eliminar las células. Este medio se ensayó al 20% en Crone sin N, sobre plantas de ambas variedades, noduladas y con una longitud de 17.5 cm, utilizando como soporte vermiculita. Las plantas se crecieron durante 10 días en condiciones controladas de luz, temperatura y humedad en una cámara de cultivo vegetal. Transcurrido este tiempo, se prensaron para su posterior análisis. Paralelamente se hizo un control con medio de cultivo estéril. Una vez prensadas y secas las plantas, se pesaron y midieron longitud y superficie aérea y radical por separado. Así mismo se midió la cantidad de N total de la planta.

Los resultados indican un claro efecto del medio en el que habían crecido ciertas cepas sobre el desarrollo de la planta. Las cepas Ps 2, 4, 7, 8, 12, 16 y 17 provocan un aumento significativo de la longitud radical en ambas variedades, Ps 6 y 19 de la superficie radical y Ps 6, 17 y 23 de la superficie aérea. Sólo bajo el efecto del medio de cultivo en el que creció la cepa Ps 7 se aprecia un significativo aumento de la cantidad de N total por planta.

El incremento de la superficie radical, bajo el efecto de las cepas mencionadas nos sugiere la presencia de algún compuesto en los medios de cultivo bacterianos que induce la formación de raíces laterales. La familia de compuestos con mayor probabilidad de ser responsables de estos efectos son las auxinas. La capacidad de síntesis de auxinas ha sido descrita en diferentes bacterias (Libbert y Rich, 1969) y microorganismos edáficos (Prikryl *et al.*, 1985).

El aumento de la longitud radical puede ser el resultado de una dificultad por parte de la planta para absorber nutrientes. La producción de cianhídrico puede ser una de las causas de esta respuesta. Este compuesto ha sido detectado en los medios de cultivo de numerosas cepas del género *Pseudomonas* y su acción negativa sobre el metabolismo vegetal se debe a su capacidad para bloquear el funcionamiento de enzimas implicadas en la respiración celular y, por lo tanto, en la obtención de energía.

Excepto bajo el efecto del medio de cultivo en el que creció la cepa Ps7, encontramos bajas concentraciones de nitrógeno en las plantas ensayadas con los medios de crecimiento de *Pseudomonas* lo que puede estar en relación con un aumento del peso de la planta. Estos resultados indican que la mayor demanda de nutrientes por la planta, que permiten el aumento de peso de la misma, no va acompañado de un aumento de la actividad fijadora de nitrógeno. Este hecho induce a pensar en una pérdida de rendimiento de la actividad nitrogenásica por la presencia de inhibidores que actúen directa o indirectamente.

Este estudio constituye la fase de “screening” en la búsqueda de nuevas PGPRs. A partir de estos resultados podemos concretar nuestro trabajo en aquellas cepas que han demostrado efecto biológico sobre el crecimiento de las plantas, estudiando los posibles mecanismos directos de promoción: producción de hormonas, inhibición de la síntesis de etileno, aumento de la capacidad de intercambio de nutrientes por el sistema radical y fijación de nitrógeno en asociación rizosférica.

LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO EN SOJA Y FRIJOL EN BRASIL

Hungria M.¹, Vargas M.A.T.², Andrade D.S.³ y Megías M.⁴

¹Embrapa-Soja, C.P. 231, 86001-970, Londrina, PR, Brasil; ²Embrapa-Cerrados, C.P. 08223, 73301-970, Planaltina, DF, Brasil; ³IAPAR, C.P. 481, 86001-970, Londrina; ⁴Dpt. Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, A.P. 874, 41080.

Fijación de nitrógeno con la soja (*Glycine max*)

La soja fue probablemente introducida en Brasil en 1882 como *Soja hispida*, sin embargo el cultivo comercial de la especie *Glycine max* ha empezado sólo en los años 40 de este siglo, en la Región Sur del país. En los años setenta el cultivo se ha expandido para la Región de los Cerrados, en la zona central del país y hoy la soja es cultivada en más de diez provincias que distan casi 8.000 km entre sí. Los suelos brasileños se caracterizan por un contenido bajo de nitrógeno y son, originalmente, libres de *Bradyrhizobium* capaz de formar nódulos efectivos con la soja. En consecuencia, las semillas de soja tuvieron que ser comercializadas en conjunto con inoculantes conteniendo bradirrizobio. Las primeras estirpes fueron traídas de los EE UU, pero pronto, se inició un programa de selección de estirpes adaptadas a las condiciones brasileñas. Hoy en día, el suceso del cultivo de soja en el país reside principalmente en la eficiencia de la fijación biológica del nitrógeno (FBN), pues para alcanzar los índices de rendimiento actuales de cosecha, de 2,500 kg/ha, serían necesarios añadir de 300 a 400 kg de N/ha, no viable económicamente por el costo elevado de los fertilizantes en Brasil. Desde luego, con la introducción de nuevas variedades de soja más productivas y con el establecimiento de estirpes en el suelo que no son las más eficientes que se disponen actualmente, pero que fueron introducidas con los primeros inoculantes, se hace necesario obtener microsimbiontes con mayor capacidad de FBN.

Actualmente, el programa establecido en Embrapa-Cerrados para obtención de bradirrizobio para la soja es el más exitoso del país y emplea dos metodologías: 1) Las propiedades simbióticas de decenas de colonias individuales en cultivo puro son evaluadas en plantas crecidas en jarras de Leonard, eligiendo las cepas variantes con mayor competitividad y eficiencia de FBN. Posteriormente, las estirpes más prometedoras son llevadas a experimentos de campo seleccionando, después de algunos cultivos, aquellas más eficaces; 2) Se realizan aislamientos de un suelo inoculado hace varios años con un cepa altamente competitiva; en ese caso, se buscan estirpes adaptadas y con mayor eficiencia de FBN.

La primera metodología viene siendo empleada para la obtención de variantes más competitivas a partir de una estirpe muy eficiente, por ejemplo, la CB 1809, recibida de Australia en 1966, que ha mostrado baja capacidad competitiva en los suelos brasileños. Sin embargo, algunas variantes obtenidas, como la CPAC 7 (Fig. 1, columna 2), que hoy es recomendada para la utilización en inoculantes comerciales, mantuvieron la tasas elevadas de FBN características de CB 1809 e incrementaron la competitividad. En la Fig. 1 se puede también observar la mayor capacidad competitiva de otras ocho variantes, verificándose un incremento de hasta 108% en la ocupación de los nódulos para los aislados 3 y 8.

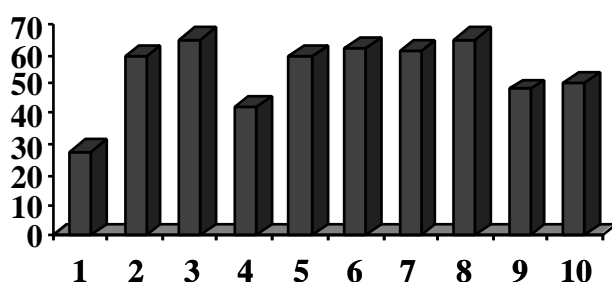


Figura 1. Porcentaje de ocupación de nódulos de soja variedad BR-16 por la estirpe parental CB 1809 (columna 1), la variante CPAC 7 (columna 2) y otras ocho variantes de ese serogrupo, cuando fueron inoculadas con una mezcla de 1:1 (v/v, 10^9 células/ml) con la cepa 29w (también recomendada comercialmente). La ocupación fue evaluada por el análisis de 60 nódulos a los 45 días. Todas las variantes han diferido estadísticamente de la parental (Tukey, $p < 0,05$). (M.A. Santos, M.A.T. Vargas y M. Hungria, datos no publicados).

La segunda metodología está siendo utilizada para la obtención, a partir de una cepa altamente competitiva y adaptada a los suelos brasileños, de estirpes con tasas más elevadas de FBN. Diversas variantes fueron obtenidas a partir de la estirpe competitiva SEMIA 566, utilizada en los inoculantes brasileños entre los años 60 y 70 y establecida en la gran mayoría de los suelos brasileños cultivados con soja. No obstante, las tasas obtenidas por esa estirpe no consiguen suplir las necesidades de las variedades modernas. Aislados de suelos que presentaron reacción serológica con la SEMIA 566 fueron ensayados para identificar variantes con mayor capacidad de FBN y uno de ellos, CPAC 15 (Fig.2, columna 2), está actualmente recomendado para el uso comercial.

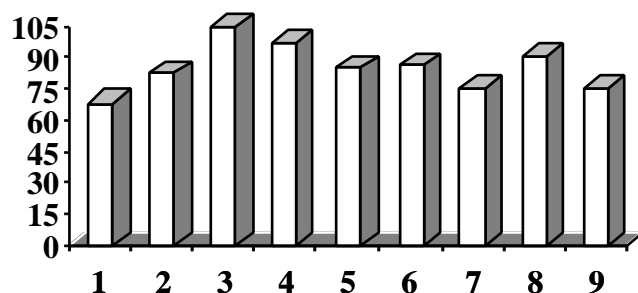


Figura 2. N total acumulado (mg N/pl) en los tejidos de soja variedad BR-16 inoculada con la estirpe parental SEMIA 566 (columna 1), la variante CPAC 15 (columna 2) y otras siete variantes

pertencientes a ese serogrupo. Todas las variantes han sido estadísticamente diferentes de la parental (Tukey, $p < 0,05$). (M.A. Santos, M.A.T. Vargas y M. Hungria, datos no publicados).

Cuando las propiedades morfológicas, fisiológicas y genéticas de esas estirpes variantes fueron comparadas con las de sus respectivos genotipos parentales, se manifestaron diferencias morfológicas (las variantes producen más mucosidad), alteraciones en el fenotipo Hai, así como alteraciones genéticas, detectadas por amplificación del ADN por PCR con "primers" cortos y aleatorios (RAPD) o con los "primers" específicos ERIC y REP. Sin embargo, las propiedades serológicas contra antígenos de células totales o de los lipopolisacáridos de la pared celular no fueron alteradas. En relación a las variantes más competitivas del serogrupo CB 1809, se constataron también alteraciones en los perfiles de factores Nod. En otros serogrupos investigados (532C, SEMIA 5020), algunas variantes aisladas del suelo, varios años después de la última inoculación, presentaron un grado elevado de divergencia genética en relación a la posible estirpe parental. La utilización de técnicas avanzadas de biología molecular permitirá identificar que esa divergencia se debe a las condiciones estresantes de los suelos o si esas estirpes son contaminantes introducidas con los primeros inoculantes importados y que no constan del banco de germoplasma brasileño.

La soja es un cultivo muy importante también en los EE UU, pero al contrario de Brasil (Tabla 1), frecuentemente hay reportes que indican la falta de respuesta a la inoculación en suelos con algunas células establecidas. Es posible que los bradirrízobios establecidos en los suelos norteamericanos sean más competitivos y no permitan la introducción de nuevas estirpes eficientes. Puede ser también que las condiciones estresantes que ocurren más frecuentemente en suelos brasileños impliquen la necesidad de añadir estirpes en un estado fisiológico adecuado durante la siembra. Sin embargo, es posible que las respuestas obtenidas en Brasil sean el resultado de un intenso programa de búsqueda por estirpes más eficientes y competitivas.

Tabla 1. Resultados de un experimento de campo realizado en Ponta Grossa, PR, Brasil, con una población establecida de 10^3 células de *Bradyrhizobium*/g de suelo.

Tratamiento	Masa nodular (mg/pl)	Rendimiento (kg/ha)	N en grano (kg N/ha)
No inoculado	78 bc ¹	1.834 d	110 d
No inoculado + N (200 kg N/ha)	25 c	2.925 ab	189 ab
CB 1809 + CPAC 7	140 a	3.215 a	209 a
S-370 + S-372	162 a	3.200 a	198 a
29w + SEMIA 587	149 a	2.850 b	174 bc

¹ Medias de seis repeticiones y valores seguidos por letras iguales no difieren estadísticamente (Tukey, $p < 0,05$). Constan aquí sólo algunos tratamientos del experimento. (M. Hungria, L.H. Boddey, M.A. Santos y M.A.T. Vargas. Biol. Fert. Soils, en prensa).

Fijación de nitrógeno con el frijol (*Phaseolus vulgaris*)

Una falta de respuesta a la inoculación del frijol en experimentos de campo es frecuentemente referida en diversos países. En Brasil, fueron perdidos varios años de investigación en la selección de estirpes que no eran estables genéticamente, lo que se

esclareció después de los estudios que llevaron a la definición de la especie *Rhizobium tropici*. Un nuevo programa de selección se comenzó, esperando identificar estirpes eficientes y competitivas de *R. tropici*. Estos estudios concluyeron con la identificación de tres estirpes: PRF 35, PRF 54 y PRF 81 (Tabla 2). La caracterización de esas estirpes ha indicado que la morfología de colonias, habilidad de crecimiento *in vitro* en bajo pH y temperaturas elevadas y los productos de PCR con los "primers" Y1 y Y2 son semejantes a la CIAT 899 (*R. tropici* IIB), pero las estirpes no son capaces de crecer en medio LB o PY-Ca, de modo semejante a CFN 299 (*R. tropici* IIA). La respuesta a la inoculación con la cepa PRF 81 en diversos locales de Brasil condujeron a su recomendación como inoculantes comerciales y incentivan la búsqueda de estirpes eficientes y competitivas para el cultivo del frijol.

Tabla 2. Efectos de la inoculación en la masa nodular y rendimiento de frijol, variedad Aporé (Londrina) o IAPAR-14 (Ponta Grossa)

Tratamiento	Londrina		Ponta Grossa	
	Nodulación (mg/pl)	Rendimiento (kg/ha)	Nodulación (mg/pl)	Rendimiento (kg/ha)
No inoculado	20 c ¹	2.519 c	21 d	2.519 c
No inoculado + N (60 kg de N/ha)	3 ²	3.519 a	2 ²	3.519 a
PRF 81	94 a	3.425 a	92 a	3.425 a
CIAT 899	87 a	3.271 ab	80 ab	3.271 ab

¹ Medias de seis repeticiones y valores seguidos por letras iguales no difieren estadísticamente.

Constan aquí sólo algunos tratamientos del experimento. (M. Hungria, D.S. Andrade, L.M. de O. Chueire; A. Probanza, F.J. Gutierrez-Mañero y M. Megías, datos no publicados).

² Valores no considerados en el análisis estadístico.

Manejo adecuado del suelo

En la nueva filosofía de agricultura sostenible, la conservación de los restos de cosecha y el uso de leguminosas, entre otras prácticas, son recomendables y pueden influir en la simbiosis. De suelos con siembra directa o preparación convencional durante 17 años, y con rotaciones de cultura con o sin soja, fueron aisladas 142 estirpes de *Bradyrhizobium*. Esas estirpes fueron agrupadas en 16 grupos genómicos por el análisis del ADN amplificado por RAPD, cinco perfiles de proteína e tres perfiles de factores Nod. La siembra directa y la presencia de la leguminosa resultaron en mayor número de células de *Bradyrhizobium* y estimularon la diversidad. Algunas de las estirpes aisladas de los tratamientos más sostenibles fueron altamente eficientes y competitivas. Resultados semejantes fueron obtenidos también en otro experimento con frijol en monocultivo o consorcio con gramíneas.

Conclusiones

Una gran variabilidad puede ser detectada después de la adaptación de *Bradyrhizobium* y *Rhizobium* a los suelos o por la búsqueda de colonias individuales con propiedades específicas. No obstante, dentro de esa variabilidad es posible seleccionar estirpes con mayor capacidad de fijación de nitrógeno y mayor capacidad competitiva.

Agradecimientos

M. Hungria ha recibido una beca de CNPq-Brasil (202821-87) para una estancia de un año en Sevilla.

DOS DÉCADAS DE ESTUDIOS SOBRE LA RESPUESTA A LA INOCULACIÓN EN ANDALUCÍA

Rodríguez-Navarro D.N., Santamaría C., Camacho M., Daza A. y Temprano F.

CIFA “Las Torres y Tomejil”. Apto. Oficial, 41200-Alcalá del Río (Sevilla). E-mail: cifatorr@cap.caan.es

En esta conferencia se realizará una revisión de los estudios sobre la respuesta a la inoculación de diferentes leguminosas, tanto pratenses (tréboles, medicagos y zulla) como de grano (habas, garbanzo, altramuz, judías y soja) llevados a cabo, en su mayoría, por el grupo de inoculantes del CIFA-Las Torres y Tomejil (Sevilla).

En algunas ocasiones los datos disponibles son sólo resultado de ensayos controlados en invernadero, pero en la mayoría de los casos se expondrán resultados de experimentos de campo, donde el diseño de los mismos respondía a planteamientos tendentes a resolver la diferente problemática de cada cultivo en su respuesta a la inoculación con estirpes específicas de *Rhizobium/Bradyrhizobium*.

En tréboles y medicagos se ha realizado una exhaustiva tarea de selección de estirpes en diferentes especies y/o cultivares, bajo condiciones controladas. De estos estudios se seleccionaron las mejores estirpes para la producción comercial de inoculantes, que durante años se han elaborado de manera específica para cada especie y, en ocasiones, para cada cultivar/variedad, dada la alta interacción estirpe x planta hospedadora observada en estas leguminosas.

La zulla (*Hedysarum coronarium* L.) es una leguminosa originaria de la región mediterránea en donde se encuentra espontánea en varios países (Italia, Túnez, Malta, etc.). En España se encuentra únicamente en dos zonas, la isla de Menorca y la provincia de Cádiz. La idea general, hasta los años 70, era que las principales limitaciones para la difusión de esta leguminosa eran de tipo edáfico y climático. Diversas experiencias han demostrado que es posible su cultivo fuera de las áreas naturales donde vegeta, siempre que esté presente el rizobio específico.

La problemática de otras leguminosas como garbanzo, haba y altramuz, en determinadas áreas, es bien diferente, puesto que en los suelos existen poblaciones nativas de rizobios que, aún en los casos de no ser muy abundantes, son relativamente efectivas. En estos casos, se han estudiado distintas estrategias para conseguir una mayor implantación de los inóculos; así, incrementando 10 veces la dosis normal de inoculación en una zona con una alta población nativa (10^4 rizobios/g de suelo) de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) se obtuvo una ocupación del 25% de los nódulos, frente al 6% alcanzado con la dosis normal de inoculante (10^6 rizobios/semilla). Cuando la densidad de las poblaciones naturales era baja, aumentando el inoculante sobre la semilla se logra alcanzar un 73% de ocupación de los nódulos frente al 50% obtenido a las dosis normales.

En experimentos con habas se siguió otra estrategia con el fin de incrementar la ocupación de nódulos por las cepas inoculadas, mediante la reinoculación de las mismas cepas en las parcelas del año anterior. No se obtuvieron mejoras, respecto a los controles no reinoculados, probablemente porque las poblaciones naturales del suelo fueron estimuladas por el cultivo sucesivo de habas. Por tanto los resultados sólo reflejaron el diferente grado de competitividad de las distintas estirpes de los inóculos.

El cultivo del garbanzo se desarrolla normalmente en seco, de manera que en ensayos de campo se obtuvieron respuestas positivas en rendimientos, debidas más a dosis crecientes de riego que a la inoculación. No obstante, en parcelas no inoculadas en ausencia de poblaciones naturales de rizobios específicos, los incrementos en producción por efecto del riego fueron del orden del 50% , mientras que en las parcelas inoculadas, según la estirpe y el cultivar empleado, éstos alcanzaron el 70% respecto a los controles en seco. Se presentarán otros resultados de respuesta a diferentes elementos nutritivos (fósforo y potasio) tanto en parcelas control como inoculadas.

En ocasiones, aún teniendo resuelto el problema de la inoculación, otras limitaciones de tipo edáfico pueden condicionar la respuesta a los inoculantes, como en el caso de suelos calcáreos que claramente limitan la extensión del altramuz a otras áreas de cultivo, o por el contrario los suelos ácidos restringen el cultivo de la alfalfa. Relacionadas con estas limitaciones de tipo edafológico, la disponibilidad de determinados nutrientes puede ser la causa determinante de la ausencia de respuesta a los inoculantes. Actualmente estos aspectos están siendo objeto de estudio en judías.

En ausencia de poblaciones nativas de rizobios específicos en el suelo, la respuesta positiva a la inoculación suele estar, en líneas generales, garantizada, es el caso de la soja en España. No obstante, los trabajos de selección de estirpes siguen estando justificados; así, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que en terrenos ácidos *Bradyrhizobium japonicum* está mejor adaptado, mientras que en suelos alcalinos los inoculantes a base de estirpes de *Rhizobium fredii* estarían más recomendados. Así mismo, pese a la idea generalizada en contra, hemos demostrado en condiciones de campo, la efectividad de estirpes de *Rhizobium fredii* con cultivares de soja de origen occidental.

En el caso de las judías, puede afirmarse que las poblaciones nativas, al menos en suelos andaluces, no son abundantes. Recientemente los resultados positivos, obtenidos con cultivares para consumo en fresco, nos indican que, a pesar de las condiciones edáficas de los campos de ensayo y las constricciones climáticas de Andalucía, el empleo de inoculantes está suficientemente justificado. Así, en condiciones de baja concentración de nitrato en el suelo, la inoculación de estirpes efectivas dio lugar a rendimientos del orden del 70% respecto a los obtenidos en los controles fertilizados (200 UF/ha) y duplicaron los de los controles no inoculados y no fertilizados.

Otro factor limitante de la respuesta positiva a la inoculación lo constituye la presencia de nitrógeno mineral (sobre todo nitrato) en los suelos agrícolas; en este sentido hay que destacar la distinta sensibilidad simbiótica de las diferentes leguminosas, así el altramuz es prácticamente insensible a la presencia de niveles medios-altos de nitrato, mientras que la judía es muy sensible a su presencia.

Para finalizar este resumen, se relaciona la colección de estirpes de *Rhizobium/Bradyrhizobium* de nuestro Laboratorio, destacando el hecho de que en su mayor parte se trata de aislamientos propios (el porcentaje se indica entre paréntesis), es decir, realizados por miembros de nuestro equipo de trabajo, sobre todo en nuestra región:

Medicagos (*R. meliloti*) : 78 cepas (54%).
Tréboles (*R. trifolii*) : 71 cepas (87%).
Zulla (*R. hedysari*) : 81 cepas (83%).
Garbanzo (*Bradyrhizobium sp. Cicer*) : 50 cepas (50%).
Judía (*R. leguminosarum bv. phaseoli* etc.) : 68 cepas (79%).
Soja (*B. japonicum/R. fredii*) : >800 cepas (90%).
Altramuz (*Bradyrhizobium sp. Lupinus*) : 300 cepas (>90%).
Habas, guisante, lenteja... (*R. leguminosarum bv. viceae*) : 60 cepas (68%).
Lotus (*R. loti*) : 10 cepas (50%).

Bibliografía

- Temprano, F. Tesis Doctoral, E.T.S.I.A., Madrid (1990).
- Rodríguez-Navarro, D.N., Temprano, F., Orive, R. Soil Biol. Biochem. **23**, 375-379 (1991).
- Buendía-Clavería, A.M., Rodríguez-Navarro, D.N., Santamaría-Linaza, C. Ruíz-Saínz, J.E. & Temprano-Vera, F. System. Appl. Microbiol. **17**, 155-160 (1994).
- Temprano-Vera, F., Santamaría-Linaza, C., Daza-Ortega, A., Leidi, E.O. & Rodríguez-Navarro, D.N. En: Nutrición mineral de las plantas en la Agricultura sostenible. Sevilla (1997), pp. 41-47.

CONTRIBUCIÓN DE LA FIJACIÓN DE N₂ A LA FERTILIDAD DEL SUELO Y A LA PRODUCTIVIDAD DEL ARROZ

Fernández Valiente E.¹, Ucha A.¹, Quesada A.¹, Leganés F.¹ y Carreres R.²

¹ Dpto. Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco 28049-Madrid. eduardo.fernandez@uam.es

² Dpto. del Arroz, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Ronda del País Valenciá 42. Sueca, 46410-Valencia.

El arroz constituye el alimento básico para más de la mitad de la población mundial. Alrededor de 148 millones de hectáreas en todo el mundo están dedicadas a este cultivo. En un 90 % de los casos, el arroz se cultiva en condiciones de inundación temporal o permanente del terreno con una capa de agua que normalmente presenta unos 5-15 cm de profundidad. La inundación del suelo va a cambiar las propiedades físico-químicas y microbiológicas del mismo, dando origen a un ecosistema agrario de características únicas, en el que abundan los microorganismos fijadores de N₂ (Roger 1996).

La inundación, sin embargo, va a incidir negativamente en la eficiencia de los fertilizantes químicos, lo que se atribuye a las pérdidas que experimentan en el terreno inundado, debidas a los procesos de lixiviación, desnitrificación y volatilización del NH₃ (De Datta y Buresh 1989). Estos procesos, no sólo afectan a la eficiencia de la fertilización, sino que, además tienen un claro efecto contaminante en el agua y en la atmósfera.

Estimaciones realizadas en distintos países asiáticos indican que, en presencia de fertilizantes nitrogenados, más del 60 % del nitrógeno utilizado por la planta de arroz procede del nitrógeno del suelo (Georges y col. 1992; Kundu y Ladha 1995). En estas condiciones, la fijación biológica del N₂ es la que permite reponer al suelo el nitrógeno incorporado por la planta de arroz, que es exportado del campo con la cosecha (Peoples y Craswell 1992; Roger 1995). Los estudios realizados indican que la fijación de N₂ dependiente de luz, -desarrollada fundamentalmente por las cianobacterias-, contribuye con algo más de los 2/3 del total de nitrógeno fijado en el arrozal (Roger 1995). Este nitrógeno se incorpora al suelo en forma de biomasa microbiana y se hace accesible a la planta de arroz después de los procesos de descomposición y mineralización de la materia orgánica.

En los arrozales europeos, y en particular en los arrozales de Valencia que forman parte del Parque Natural de la Albufera, el elevado uso de los fertilizantes nitrogenados produce una contaminación del agua (Ballesteros y col., 1988) y causa una pérdida progresiva de la calidad del suelo como consecuencia del efecto perjudicial sobre los microorganismos del suelo, en particular sobre las cianobacterias fijadoras de N₂ (Carreres y col., 1996; Fernández Valiente y col., 1996). Por consiguiente parece necesario una mejora del sistema de cultivo en términos de estabilidad, sostenibilidad y respeto al medio ambiente; basada en la potenciación de

la fijación de N_2 , en la reducción del abonado nitrogenado, y en la mejora de su eficiencia.

El arrozal valenciano presenta unas características idóneas para el desarrollo de las cianobacterias (Quesada y col. 1995a,b). Las cianobacterias son más abundantes en el suelo que en el agua, y presentan valores semejantes a los de los arrozales asiáticos (Quesada y Fernández Valiente 1996). La fijación de N_2 , estimada “in situ” por la técnica de reducción del acetileno (Quesada y col. 1989), presenta correlación positiva con la dureza, conductividad y contenido en calcio del agua y correlación negativa con el nitrógeno inorgánico disuelto en el agua (Quesada y col. 1997). Así mismo, la presencia de fertilizantes nitrogenados en el suelo inhibe la actividad nitrogenasa (Carreres y col. 1996), si bien las diferencias no son siempre estadísticamente significativas (Fernández Valiente y col. 1997).

La intensidad de luz es otro factor que se correlaciona positivamente con la fijación de N_2 (Quesada y col. 1997), lo que concuerda con el carácter fotodependiente de la actividad nitrogenasa en cianobacterias. Sin embargo, experimentos realizados en campo, en los que las comunidades naturales de cianobacterias se vieron expuestas durante un mes a distintas intensidades de luz (100%, 43%, 26% y 13% de la luz incidente), pusieron de manifiesto una mayor complejidad de la relación entre la intensidad de luz y la fijación de N_2 . Al cabo del mes se observaron cambios en las poblaciones de los tres principales géneros de cianobacterias fijadoras de N_2 : *Anabaena*, *Nostoc* y *Calothrix*, en función de la intensidad de luz a la que estuvieron expuestas las comunidades. Así, *Calothrix* y *Anabaena* eran dominantes en las comunidades expuestas a las intensidades de luz intermedias, mientras que *Nostoc* era dominante a altas y bajas intensidades. En todas las comunidades, la óptima intensidad de luz para la actividad nitrogenasa correspondió a la intensidad de luz a la que habían estado expuestas durante el periodo de crecimiento. Los ensayos realizados con intensidades de luz mayores o menores de las de crecimiento dieron en todos los casos valores de nitrogenasa más bajos que los obtenidos con la intensidad de luz a la que crecieron (Quesada y col. 1998).

Además, observaciones preliminares indican que no sólo la intensidad de luz, sino también la calidad de la luz puede incidir de forma notoria en la magnitud de la fijación de N_2 en el arrozal, dependiendo de la capacidad de adaptación del aparato fotosintético de las cianobacterias al tipo de luz que atraviesa la cubierta vegetal (Quesada y col. 1998). El efecto de la calidad de luz puede ser particularmente importante en las etapas finales del cultivo, cuando la cubierta vegetal es más densa, y la escasa luz que llega a la superficie del suelo debe estar formada básicamente por luces de longitudes de onda de la zona verde del espectro de luz visible. Esta circunstancia puede ser determinante de la distribución espacial y temporal de las cianobacterias, ya que no todas las especies presentan las mismas posibilidades de adaptación.

La gran variabilidad espacio-temporal de la fijación de N_2 en el arrozal hace difícil la estimación de la cantidad total de nitrógeno fijado. Cálculos basados en los estudios de los ciclos diarios y estacionales de la fijación de N_2 dan valores de alrededor de 34 kg N/ha y año, en parcelas no abonadas. La cantidad de nitrógeno aportada al campo por la fijación de N_2 disminuye hasta 13 kg N/ha y año en presencia de 140 kg N/ha

de fertilizante nitrogenado (Carreres y col. 1996). Estos datos deben considerarse como valores mínimos, ya que no toman en consideración el nitrógeno aportado por los afloramientos de cianobacterias. La presencia de estos afloramientos es difícil de predecir, generalmente empiezan a aparecer a finales de Junio, coincidiendo con el ahijamiento de la planta de arroz, y se van sucediendo hasta el final del cultivo. Inicialmente se forman afloramientos de *Gloeotrichia* y *Cylindrospermum*, seguidos posteriormente por afloramientos de *Scytonema*, *Nostoc* y *Anabaena*. El área cubierta por estos afloramientos es muy variable, pudiendo llegar hasta el 45% del total del campo a finales del cultivo (Fernández Valiente y col. 1996). La cantidad de N que pueden aportar estos afloramientos varía entre 0,680 y 5,902 kg N/ha y día, con un valor medio de 2,104 kg N/ha y día.

La evidencia más clara de que el nitrógeno fijado por las cianobacterias es utilizado por la planta de arroz se obtuvo en los estudios agronómicos realizados con cianobacterias marcadas con ^{15}N . Los resultados obtenidos indican que 20 días después del transplante, la planta de arroz incorpora el ^{15}N de las cianobacterias en la misma proporción que el ^{15}N de los fertilizantes, lo que indica una rápida mineralización del nitrógeno orgánico, y por tanto que el nitrógeno procedente de la fijación del N_2 puede ser incorporado rápidamente por la planta.

Los estudios agronómicos indican que la cantidad de fertilizante nitrogenado incorporada al suelo por los agricultores (alrededor de 140 kg N/ha) es excesiva, pudiéndose reducir en un 30-50%, ya que los máximos rendimientos, de alrededor de 7500 kg grano/ha, se obtienen con 70-100 kg N/ha de fertilizante nitrogenado, dependiendo del contenido en materia orgánica del suelo. En las parcelas no abonadas el rendimiento es de alrededor de 6000 kg grano/ha (Carreres y col. 1996). El fraccionamiento del abonado no mejora la productividad con respecto al abonado de base.

La eficiencia del abonado disminuye de forma lineal al aumentar la cantidad de fertilizante nitrogenado. Hasta 70-100 kg N/ha de fertilizante aplicado, la cantidad de nitrógeno absorbido por la planta es mayor o similar a la que se incorpora al suelo con el abono. La diferencia entre el nitrógeno absorbido por la planta y el incorporado como fertilizante presenta una correlación positiva con la fijación de N_2 , lo que sugiere la utilización del nitrógeno fijado como una fuente complementaria de nitrógeno por la planta (Fernández Valiente y col. 1996).

Estos resultados se han visto confirmados en experimentos de campo en los que se ha utilizado fertilizantes marcados con ^{15}N . Estos experimentos han puesto de manifiesto que la mayor parte del nitrógeno incorporado por la planta procede del nitrógeno del suelo. El porcentaje de ^{15}N del fertilizante recuperado por el sistema suelo/planta es del orden del 50%, lo que implica unas pérdidas cercanas al 50%. Estas pérdidas deben atribuirse a la volatilización del NH_3 , ya que la desnitrificación presenta valores muy bajos.

En conjunto los resultados obtenidos han puesto de manifiesto la importancia de la fijación de N_2 en el mantenimiento de la fertilidad del suelo, del cual procede la mayor parte del nitrógeno utilizado por la planta. Así mismo han puesto de manifiesto la necesidad de mejorar la eficiencia del proceso de abonado, que no pasa por un

aumento de la cantidad del mismo, sino por la búsqueda de nuevas técnicas de fertilización y de nuevos fertilizantes de liberación lenta del amonio.

Referencias

- Ballesteros, L., de la Guardia, M. y Vicente, E. (1988). La presencia de nitratos en las aguas del ecosistema de la Albufera de Valencia. *Rev. Agro. Tecnol. Alim* 28, 574-580.
- Carreres R., González Tomé R., Sendra J., Ballesteros R., Fernández Valiente E., Quesada A., Nieva M. Y Leganés F. (1996) Effect of nitrogen rates on rice growth and biological nitrogen fixation. *J.Agric.Sci.* 127: 295-302.
- De Datta SK., y Buresh RJ (1989) Integrated nitrogen management in irrigated rice. *Adv. Soil. Sci.* 10: 143-169.
- Fernández Valiente E., Quesada A., Prospero C., Nieva M., Leganés F., Ucha A. (1997) Short-term and long-term effect of ammonium on photodependent nitrogen fixation in rice-fields. *Biol. Fertil. Soil* 24:353-357.
- Fernández Valiente E., Quesada A., Nieva M., Leganés F., Prospero C., Martín Trillo M. Carreres R. y González Tomé R. (1996) Contribution of biological nitrogen fixation to rice production in a mediterranean rice-field. En: *Nitrogen fixation Associated with Rice Production*. M.Rahman (Ed). Kluwer Acad. Publish. pp147-157.
- George T., Ladha JK., Buresh RJ., y Garrity DP. (1992) Managing native and legume-fixed nitrogen in lowland rice-based cropping systems. *Plant Soil* 141: 69-91.
- Kundu DK y Ladha JK (1995) Efficient management of soil and biologically fixed N₂ in intensively-cultivated rice fields. *Soil Biol. Biochem.* 27:431-439.
- Peoples MB y Craswell ET (1992) Biological nitrogen fixation: investments, expectations and actual contribution to agriculture. *Plant Soil* 141:13-39.
- Quesada A., Sánchez Maeso E. y Fernández Valiente E. 1989. New incubation device for in situ measurement of acetylene-reducing activity in ricefields. *J. Appl. Phycol.* 1:195-200.
- Quesada, A. Sánchez Maeso E. y Fernández Valiente E. (1995a) Seasonal variations in the physical and chemical characteristics of a shallow water ecosystem, the ricefields of Valencia, Spain. *Arch. Hydrobiol.* 132:495-511
- Quesada A. Sánchez Maeso E. y Fernández Valiente E. (1995b) Seasonal variation of chemical properties of rice field soils from Valencia, Spain. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 26:1-19
- Quesada A. y Fernández Valiente E. (1996) Relationship between abundance of N₂-fixing cyanobacteria and environmental features of spanish rice fields. *Microb. Ecol.* 32:59-71.
- Quesada A., Leganés F. y Fernández Valiente E. (1997) Environmental factors controlling N₂-fixation in mediterranean rice-fields. *Microb. Ecol.* 34: 39-48.
- Quesada A., Nieva M., Leganés F., Ucha A., Martín M., Prospero C. y Fernández Valiente E (1998) Acclimatization of cyanobacterial communities in rice-fields and response of nitrogenase activity to light regime. *Microb. Ecol.* (En prensa)
- Roger P. (1995) Biological N₂-fixation and its management in wetland rice cultivation. *Fertil. Res.* 42:261-276
- Roger, P.A. (1996) Biology and management of the floodwater ecosystem in ricefields. International Rice Research Institute, P.O. Box 933, Manila 1099, Philippines. 250p.

TRANSFERENCIA GENÉTICA HORIZONTAL EN BACTERIAS DEL GÉNERO *RHIZOBIUM*

Herrera-Cervera J.A., Sanjuan-Pinilla J.M., Muñoz S., Olivares J. y Sanjuan J.

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas simbióticos. Estación Experimental del Zaidín-CSIC. Profesor Albareda, 1 E-18008 GRANADA. jsanjuan@eez.csic.es

El uso de biofertilizantes, dentro del contexto de la agricultura sostenible, es una práctica bastante extendida en los últimos años. Sin embargo pocas veces se tiene conciencia de los riesgos que implica la utilización continuada de dichos fertilizantes. Una de las consecuencias más dramáticas son los cambios y/o desplazamientos temporales de las poblaciones indígenas en los suelos inoculados que pueden conducir a cambios cualitativos y cuantitativos en dichas poblaciones. Otro de los riesgos asociados al uso de inoculantes bacterianos es la transferencia genética lateral o horizontal no sólo entre los microorganismos introducidos y las poblaciones nativas sino también al contrario. Este intercambio genético contribuye de manera significativa e inequívoca a los cambios en la variabilidad genética de las poblaciones con la consecuente reorganización en la estructura y biodiversidad de las mismas. Aunque es bien conocido que en la naturaleza ocurre, de manera natural, transferencia genética pocas veces ha podido ser cuantificada. El género *Rhizobium* es un buen modelo para estudiar los fenómenos de transferencia lateral por diferentes motivos. En primer lugar por la importancia agrícola derivada de su uso como inoculante para leguminosas, en segundo lugar por la abundancia relativa de especies en todo tipo de suelos y, en tercer lugar, por la presencia generalizada, en este género, de elementos genéticos extracromosómicos (plásmidos), los cuales son considerados como vehículos eficientes de diseminación genética.

Tomando como modelo la cepa GR4 de *Rhizobium meliloti* se evaluó la transferencia genética horizontal, tanto en condiciones naturales (microcosmos) como en condiciones de laboratorio, entre dicha cepa y poblaciones naturales de *Rhizobium* que nodulan judía, guisante, trébol y alfalfa. Se estudió la transferencia de los plásmidos no simbióticos de GR4 (pRmeGR4a y pRmeGR4b) hasta dichas poblaciones. No se pudo detectar transferencia genética de dichos plásmidos, en condiciones de microcosmos, hasta poblaciones nativas del suelo, mientras que sólo algunos de los aislados pudieron soportar transferencia conjugativa de dichos plásmidos, en condiciones de laboratorio, a pesar que se ha estimado que el 100 % de las poblaciones nativas analizadas son capaces de mantener establemente los replicones de los plásmidos no simbióticos de la cepa GR4. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores cuando intentan evaluar o detectar transferencia genética en poblaciones naturales. Uno de los principales problemas a la hora de detectar la transferencia de estos plásmidos puede ser el método de selección de transconjugantes empleado: la planta. De hecho, es necesario tanto un número mínimo de receptores como de transconjugantes en suelo para que éstos puedan ser

cazados por su planta hospedadora, lo cual supone una limitación técnica más a la hora de evaluar la transferencia. Hay que tener en cuenta que los transconjugantes deben alcanzar una densidad poblacional adecuada, o al menos ser más competitivos, para que éstos puedan ocupar un nódulo a partir de cual ser aislados. Tampoco se sabe si en este suelo existe la presión selectiva adecuada que permita la transferencia de estos plásmidos. Hay que tener en cuenta además que sólo se ha estudiado la transferencia de los plásmidos no simbióticos de la cepa GR4 en unas condiciones determinadas y por tanto desconocemos si bajo estas mismas condiciones ha existido o no transferencia de otros replicones autotransmisibles o movilizables (¿megaplásmidos simbióticos o cromosoma?). Para profundizar un poco más en este aspecto se estudió la transferencia de diferentes cósmidos, portadores de regiones movilizables dentro del genoma de *Rhizobium meliloti* GR4 pertenecientes tanto a los plásmidos simbióticos como al cromosoma, hasta diferentes aislados de poblaciones nativas de *Rhizobium*. De nuevo, la transferencia conjugativa de estas regiones dependió del receptor nativo en cuestión obteniéndose frecuencias que variaron desde 10^{-1} hasta casi indetectables. Estos resultados claramente evidencian que existen muchas regiones de ADN que son capaces de ser transferidas por conjugación dentro del genoma de GR4 y que no pertenecen a los plásmidos hasta ahora conocidos como autotransmisibles o movilizables (pRmeGR4a y pRmeGR4b). Conviene, por tanto, alertar sobre los estudios de transferencia genética en el sentido que no podemos limitarnos sólo a aquellas regiones conocidas como autotransmisibles o movilizables, sino extender el estudio al resto del genoma bacteriano. Puede que bajo unas condiciones mediambientales específicas se produzca transferencia genética de determinadas regiones de ADN que no se transferirían bajo diferentes condiciones ambientales y viceversa, bajo las mismas condiciones puede que ciertos ADNs se transfieran y otros no. Por tanto resulta difícil, no ya cuantificar, sino simplemente detectar eventos de transferencia genética en suelo y aún cuando seamos capaces, tampoco es fácil determinar qué tipo de condición mediambiental ha permitido la transferencia de determinados ADNs.

UTILIZACIÓN DEL GEN DE LA TIMIDILATO SINTASA (*THYA*) COMO MARCADOR ALTERNATIVO A GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

Fernández-Alfonso C., Carnicero P., Báscones E., Ruiz-Argüeso T., y Palacios J.

Laboratorio de Microbiología, Dpto. Biotecnología, E.T.S.I. Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, 28040 Madrid. cfernandez@bit.etsia.upm.es

Tradicionalmente, la ingeniería genética ha utilizado en distintos microorganismos genes de resistencia a antibióticos para estabilizar plásmidos. Si el estudio se ha de llevar a cabo en el laboratorio o en condiciones confinadas, la estabilidad del plásmido está asegurada por la presión selectiva que ejerce el antibiótico en el medio de cultivo. Sin embargo, si el estudio se ha de llevar a cabo en condiciones de campo, aparecen una serie de problemas de diversa índole. El primero surge de la ausencia de presión selectiva estabilizadora del plásmido como consecuencia de la inexistencia de una concentración adecuada de antibióticos en el suelo. El segundo problema surge de la posibilidad de que se produzca una transferencia horizontal incontrolada de los genes de resistencia a antibióticos desde los microorganismos introducidos por nosotros en el suelo hacia otros existentes, incluyendo potenciales microorganismos patógenos. El tercer problema es de tipo legal, y se debe al rechazo creciente respecto de la utilización de genes de resistencia a antibióticos empleados en medicina para la liberación de microorganismos marcados con éstos al ambiente. Debido a ello en la actualidad sólo se autoriza la liberación de microorganismos genéticamente manipulados que carezcan de este tipo de marcadores.

Para obviar los tres problemas antes mencionados, se ha propuesto el gen *thyA*, codificante para la timidilato sintasa, como marcador alternativo a los genes de resistencia a antibióticos. Los mutantes en este gen son auxótrofos para timidina, de forma que en medios pobres en este compuesto, como lo es el suelo, sólo pueden vivir si se suplementa con timidina o si se complementa la mutación. El objetivo de este trabajo es comprobar la idoneidad del gen *thyA* de *Rhizobium leguminosarum* como estabilizador de vectores portadores de características potencialmente beneficiosas.

En nuestro laboratorio se ha aislado el gen *thyA* a partir de una genoteca de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* UPM791 y se ha construido un mutante de *Rhizobium leguminosarum* en este gen mediante una delección. El mutante es, como se había predicho, auxótrofo para timidina y requiere del aporte exterior de este compuesto para crecer adecuadamente, tanto en medio mínimo como en medios ricos. En cuanto a las características simbióticas, el mutante es incapaz de nodular guisante, incluso en presencia de timidina en la solución de riego. Aunque el mutante es incapaz de culminar la formación de nódulos, es interesante estudiar qué sucede en las etapas iniciales de la nodulación. Para abordar este estudio de forma rápida y sencilla, se han empleado derivados de la cepa silvestre y del mutante portadores de una copia del gen de la β -glucuronidasa con expresión constitutiva. El empleo de estas cepas ha

revelado que el aporte de timidina externo es necesario para la colonización de las raíces de guisante por el mutante *thyA*, y que dicha mutación no impide la inducción de la curvatura en los pelos radiculares. Aunque desconocemos el paso concreto en que se interrumpe el proceso de nodulación, de estos datos se concluye que las raíces de guisante no aportan timidina en cantidad suficiente para permitir el desarrollo del proceso infectivo. La auxotrofia de timidina fue complementada por la introducción de un cósmido portador del gen *thyA* silvestre.

A partir del plásmido pJB3 (derivado de RK2), se ha construido un derivado en el que el gen marcador original (-lactamasa) se ha interrumpido por delección y en el que se ha clonado el gen *thyA* de *R. leguminosarum*. Este plásmido complementa al mutante *thyA* y se está empleando para comprobar el funcionamiento del sistema *thy* como marcador en condiciones de invernadero y de campo.

Finalmente, y con el fin de comprobar que el sistema *thy* es válido para otras especies del grupo *Rhizobium*, se ensayó la complementación de dicho mutante con genotecas genómicas de *Bradyrhizobium japonicum* 717 y de *Sinorhizobium meliloti* GR4. En los dos casos se obtuvieron cósmidos capaces de complementar la mutación. El análisis de estos cósmidos mediante Southern confirmó la presencia de secuencias homólogas a *thyA* de *R. leguminosarum*. Por otro lado, se ha obtenido un mutante espontáneo *thy* de *R. etli* CFN42, cuya auxotrofia se ha complementado con los cósmidos *thy* de *R. leguminosarum* y de *B. japonicum*. De estos resultados se deduce que el gen *thy* procedente de una especie es capaz de complementar de forma heteróloga a mutantes de otras especies de la familia *Rhizobiaceae*, lo que sugiere que el gen *thy* de *R. leguminosarum* puede ser utilizado como estabilizador de vectores en una amplia gama de especies de esta familia.

REGIONES MOB EN *RHIZOBIUM MELILOTI*

Herrera-Cervera J.A., Sanjuan-Pinilla J.M., Remisz E., Olivares J. y Sanjuan J.

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas simbióticos. Estación Experimental del Zaidín-CSIC. Profesor Albareda, 1 E-18008 GRANADA. jherrera@eez.csic.es

Existen abundantes evidencias indirectas que indican que las especies de *Rhizobium* intercambian ADN frecuentemente. Sin embargo, los intentos de cuantificar la magnitud de esta transferencia lateral de genes proporcionan resultados casi siempre negativos. Probablemente esto sea debido a un completo desconocimiento de cuando, donde, cómo y por qué ocurre la transferencia genética y, en general, a una falta de información sobre los mecanismos por los que ésta es llevada a cabo, al menos en las especies rhizobiáceas. La transferencia genética conjugativa no es evaluable a menos que se usen marcadores ligados a un replicón en particular, lo cual a su vez puede representar una limitación técnica o experimental. Por ejemplo, si existe más de un replicón transmisible la transferencia de los que no están marcados sería indetectable. Además si (i) la transferencia del replicón ocurre pero el marcador usado es (ii) inestable y/o (iii) no se expresa adecuadamente en el receptor, normalmente se concluye que la transferencia nunca tuvo lugar. Para solventar estas limitaciones hemos desarrollado una estrategia para identificar replicones o parte de ellos que puedan ser susceptibles de transferencia conjugativa, independientemente de su estabilidad o expresión en las células receptoras. Para ello se han clonado regiones de ADN, que contienen orígenes de transferencia conjugativos, en el genoma de la cepa GR4 de *Rhizobium meliloti* capaces de convertir un vector no transmisible en un plásmido movilizable. Para ello se introdujo el banco de genes de la cepa GR4 en diferentes cepas, deficientes en recombinación homóloga, derivadas de GR4 obteniéndose las correspondientes poblaciones merodiploides de *Rhizobium meliloti*, donde cada individuo contenía un cósmido híbrido procedente del banco. Estas poblaciones merodiploides se usaron como donadores en masa en conjugaciones con otra cepa receptora de *R. meliloti*, seleccionando transconjugantes para la resistencia a tetraciclina codificada por el vector en el cual está construido el banco. Los análisis de restricción permitieron identificar hasta 11 regiones no solapantes de ADN que contenían posibles orígenes de transferencia conjugativa. Los experimentos de hibridación mostraron que 7 regiones de ADN *mob* estaban localizadas en plásmidos, de las cuales 4 pertenecían al megaplásmido 1, 1 al megaplásmido 2 y otros dos a cada uno de los plásmidos no simbióticos de los que es portadora la cepa GR4 de *R. meliloti*, respectivamente. Otros 3 clones *mob* no pertenecían a ninguno de los plásmidos contenidos en GR4 y fueron asignados preliminarmente al cromosoma. Se confirmó que todas las regiones *mob* clonadas se transferían eficientemente desde los donadores *recA* originales a frecuencias que variaban entre 10^{-2} y 10^{-5} por célula receptora. Siguiendo esta estrategia se ha podido caracterizar el origen de transferencia del plásmido conjugativo pRmeGR4a, lo cual confirma la fiabilidad de la misma. Además los cósmidos *mob* seleccionados

se transferían a frecuencias de hasta 10^{-1} a bacterias Gram-negativas, como *E. coli*, no relacionadas con la familia *Rhizobiaceae* demostrando que la capacidad conjugativa de *R. meliloti* no se limita a su propia familia. Estos resultados proporcionan nuevas herramientas para una mejor comprensión de los fenómenos de transferencia genética horizontal.

CARACTERIZACIÓN Y SELECCIÓN DE CEPAS AISLADAS A PARTIR DE NÓDULOS EFECTIVOS DE *LUPINUS ALBUS*

Gomis V., Velázquez E., Mateos P. y Martínez-Molina E.

Departamento de Microbiología y Genética. Edificio Departamental. Lab. 209. Universidad de Salamanca. pfm@gugu.usal.es

España, al igual que otros países de la Comunidad Europea, depende hasta en un 80% de las importaciones del exterior para abastecerse de proteínas. El cultivo de las leguminosas grano y forraje sería una medida adecuada para evitar esa dependencia, incrementando la producción proteica. La cosecha de proteínas por unidad de superficie en las leguminosas es mayor que en los cereales y su coste es menor puesto que el nitrógeno se fija simbióticamente en los nódulos radicales.

Las leguminosas grano con mayores posibilidades en cultivo de secano son las habas, el guisante, la veza y el altramuz. Entre estas leguminosas cabe destacar el altramuz, tanto por su valor agronómico, como nutricional (Jambrina, 1996).

El altramuz, como todas las leguminosas, establece rizoendosimbiosis con microorganismos fijadores de nitrógeno.

La puesta a punto de la técnica de separación Staircase Electrophoresis (SCE) (Cruz-Sánchez *et al.*, 1997) nos permite el análisis de los perfiles de LMW RNA (RNA estables de bajo peso molecular) que incluyen los 5S rRNA y los tRNA. Mediante esta técnica se han analizado los perfiles de LMW RNA de las cepas tipo de las especies incluidas en la Familia Rhizobiaceae (Velázquez *et al.*, 1998). De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede concluir que los diferentes Géneros de la Familia Rhizobiaceae se diferencian en los perfiles de 5S rRNA. Asimismo, se puede concluir que las especies de un mismo Género se diferencian en los perfiles de tRNA.

Los objetivos de este trabajo se han centrado: (i) en el estudio de cepas que nodulan *Lupinus Albus*, mediante la utilización de pruebas enzimáticas para una mejor caracterización bioquímica de estos microorganismos y el análisis mediante SCE de los perfiles de LMW RNA, que incluyen los 5S rRNA y los RNA de transferencia, y (ii) en el estudio de las características simbióticas de las cepas aisladas de *Lupinus*.

Para realizar este estudio se aislaron 25 cepas a partir de nódulos efectivos de altramuz cultivados en un suelo de Salamanca.

La caracterización de las cepas aisladas se llevó a cabo en función de sus perfiles de actividad enzimática y de los perfiles de LMW RNA.

Se analizaron 20 actividades enzimáticas (glucosidasas, fosfatasas y sulfatasas) utilizando como sustratos paranitrofenil derivados.

Los perfiles de LMW RNA se analizaron de acuerdo con la técnica descrita por Cruz-Sánchez *et al.*(1997).

Los resultados de actividad enzimática, en general, mostraron un patrón básico común de producción enzimática. Las cepas aisladas mostraron actividad fosfatasa ácida y alcalina, glucosidasa, fucosidasa y sulfatasa.

De acuerdo con los perfiles de LMW RNA obtenidos, todas las cepas presentaron un perfil de 5S rRNA idéntico al de la cepa de referencia *Bradyrhizobium japonicum* ATCC10324, por tanto deben incluirse en el Género *Bradyrhizobium*. Todas las cepas aisladas de *Lupinus* estudiadas presentan el mismo perfil de tRNA, que es diferente al de la especie tipo, por lo que se trataría de una especie diferente dentro del Género *Bradyrhizobium*.

En estudios previos (Velázquez *et al.*, 1998) se ha establecido que el actual Género *Bradyrhizobium*, de acuerdo con el perfil de LMW RNA, agrupa en la actualidad microorganismos heterogéneos, lo que es especialmente claro para la especie *B. liaoningense* (Xu *et al.*, 1995) y que en el futuro, tras realizar estudios más amplios nos obligará a la descripción de nuevos Géneros dentro de los *rhizobia* de crecimiento lento al igual que ha sucedido con los de crecimiento rápido.

Se realizó el estudio de efectividad de todas las cepas aisladas, comprobándose que existen dos cepas de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) que presentan características simbióticas de infectividad y efectividad superiores al resto de las cepas ensayadas.

Teniendo en cuenta estos resultados cabe destacar que los perfiles de LMW RNA son útiles en la caracterización e identificación tanto a nivel de Género como a nivel de especie de las cepas que nodulan *Lupinus* y que los perfiles producción de enzimas son útiles en el mismo sentido y ambas metodologías nos permitirán realizar en el futuro estudios ecológicos de las poblaciones existentes en diferentes suelos y localizaciones geográficas que nodulan especies diferentes de *Lupinus*, con el fin de establecer criterios de selección de cepas autóctonas que puedan ser utilizadas como inoculantes.

Bibliografía

- Cruz-Sánchez, J.M., Velázquez, E., Mateos, P.F., Velázquez, E., Martínez-Molina, E.. 1997. Enhancement of resolution of low molecular weight RNA profiles by staircase electrophoresis. *Electrophoresis* **18**: 1909-1911.
- Jambrina, J.L. 1996. El altramuz. En *El Cultivo de las Leguminosas Grano en Castilla y León*. Eds.: Franco Jubete, F. y Ramos Monreal, A. Publicaciones de la Consejería de Agricultura y Ganadería. Valladolid.
- Velázquez, E., Cruz-Sánchez, J.M., Mateos P.F., Martínez-Molina E. 1998. Analysis of stable Low-Molecular Weight RNA Profiles of Members of the Family Rhizobiaceae. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1555-1559.
- Xu, L. M., C. Ge, Z. Cui, J. Li and H. Fan. 1995. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., Isolated from the Root Nodules of Soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 706-711.

ELECTROFORESIS DE MOLÉCULAS SUPERFICIALES DE RIZOBIOS

Díaz Marrero A.R.^a, Hernández Hernández M.J.^a, Santamaría M.^a, Gutiérrez-Navarro A.M.^b y Corzo J.^a

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular^a y Departamento de Microbiología y Biología Celular^b, Universidad de La Laguna, 38206 Tenerife.fcorzo@ull.es

Las moléculas superficiales de naturaleza glucídica de los rizobios desempeñan un papel fundamental tanto en diferentes fases del proceso simbiótico como en la vida libre de estas bacterias; por ello es importante el disponer de metodologías que permitan su estudio. Los lipopolisacáridos (LPS) y polisacáridos superficiales son moléculas que tienen en común su carácter polidisperso. Esto es, son polímeros de un número variable de restos oligosacáridicos que se repiten un número variable de veces. Este carácter polidisperso es a la vez un inconveniente y una ventaja. Un inconveniente porque dificulta su estudio estructural, ya que no se trabaja con una especie molecular pura sino con una mezcla. Sin embargo, puede ser una ventaja ya que es posible obtener perfiles de alta resolución de estas moléculas si se dispone de una técnica capaz de separar una mezcla compleja de moléculas similares en sus componentes individuales. Tal separación es posible mediante la electroforesis en geles de poli(acrilamida). En esta comunicación presentamos dos rangos de aplicaciones en las que el análisis electroforético de moléculas superficiales resulta de interés.

Identificación de estirpes por electroforesis de LPS

Los rizobios producen perfiles electroforéticos de LPS que pueden ser de dos tipos [1]. Los LPS de los miembros del género *Rhizobium* originan generalmente pautas sin periodicidad en la distribución de las bandas en el gel, pero que se resuelven en una banda o grupo de bandas intensas y de elevada movilidad (LPS II) y otro grupo de bandas de movilidad menor (LPS I). Estos perfiles suelen ser de difícil comparación, varían poco entre diferentes aislados y por ello no resultan adecuados para el estudio de diversidad de poblaciones de estas bacterias. Los perfiles de las bacterias pertenecientes al género *Bradyrhizobium* son mucho más similares a los de otras bacterias Gram -: no presentan la división entre LPS I y LPS II, sino que originan pautas de bandas “en escalera” que, en el caso de *Salmonella*, se ha demostrado que se deben a la existencia de moléculas con diferente grado de polimerización en el antígeno O [2]. Estas pautas son muy variables entre distintas estirpes, pero a la vez estables frente a cambios en las condiciones de cultivo [3], resultando muy adecuadas para los estudios de diversidad. El elevado poder de resolución de la electroforesis permite discriminar entre estirpes serológicamente idénticas, incluso cuando los determinantes antigénicos sean los propios LPS, siempre que entre estos haya diferencias estructurales. Por ejemplo, dos aislados inmunológicamente indistinguibles de *Bradyrhizobium* (*Chamaecytisus*), BTA-4 y BGA-1, presentan LPS que son reconocidos por igual por un anticuerpo policlonal dirigido contra la estirpe BGA-1. Sin embargo, sus LPS son perfectamente distinguibles por electroforesis [1].



Una de las ventajas del empleo de los LPS como marcadores de diversidad estriba en que, siendo moléculas específicas de las bacterias Gram-, se pueden estudiar directamente los nódulos sin que sea preciso ni el previo cultivo de las bacterias ni la amplificación o purificación de ningún componente. Además, en el caso de los bradirhizobios, los perfiles obtenidos a partir de las bacterias aisladas y de los homogeneizados de los nódulos son similares y directamente comparables [3]. Esta técnica presenta un poder de resolución (entendido como el número de grupos en que se puede dividir una muestra dada) equivalente al de técnicas basadas en la amplificación de secuencias específicas de DNA, como la ERIC-PCR [Santamaría *et al.*, enviado para su publicación]

Electroforesis de exopolisacáridos

El estudio de los exopolisacáridos (EPS) por electroforesis plantea el problema de la fijación de la muestra en el gel, ya que al ser moléculas hidrosolubles son eliminados rápidamente durante los primeros pasos del proceso de tinción. Sin embargo, mediante el tratamiento con azul alcian es posible fijarlos en el gel, siendo entonces perfectamente posible su revelado. [4, 5]. Desde el punto de vista de la teoría de la electroforesis, los EPS presentan la ventaja de que son moléculas estrictamente poliméricas, por lo que producen perfiles electroforéticos más simples y de más fácil interpretación que los de los LPS. Esta mayor simplicidad de las pautas, supone que el empleo de EPS como marcadores de estirpes resulte poco útil; sin embargo, la electroforesis puede ser un potente medio para el análisis estructural de estas moléculas. Así la electroforesis del exopolisacárido ácido producido por *Bradyrhizobium (Chamaecytisus)* BGA1, ha permitido resolverlo en un mínimo de 54 bandas, lo que pone una cota mínima al grado de polimerización de este EPS.

Así mismo ha sido posible demostrar que la electroforesis de los EPS de BGA1 separa las moléculas estrictamente por el tamaño. La comparación de los exopolisacáridos producidos por *B.japonicum* USDA110 y *B.(Chamaecytisus)* BGA1 mediante electroforesis ha permitido mostrar que, aunque ambos están formados por la misma unidad pentasacáridica básica [6,7] no son completamente idénticos, ya que el primero es una molécula con un grado de polimerización mayor que el segundo [Díaz-Marrero *et al.*, enviado para su publicación]. El método de fijación previa con azul alcian permite, además, la detección de un tercer tipo de moléculas polidispersas: los oligosacáridos capsulares ácidos (CPS), encontrados hasta ahora en *Rhizobium* [8].

- 1 Santamaría, M., Corzo, J., León-Barrios, M. y Gutiérrez-Navarro, A.M. (1997) *Plant Soil*, 190:143.
- 2 Palva, E.T. y Mäkelä, P.H. (1980) *Eur. J. Biochem.* 107:137.
- 3 Santamaría, M., Gutiérrez-Navarro, A.M. y Corzo, J., (1998) *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 902.
- 4 Pelkonen, S., Häyrinen, J. and Finne, J., *J. Biol. Chem.* 1988, 170: 2646.
- 5 Corzo, J., Pérez-Galdona, R., León-Barrios, M. and Gutiérrez-Navarro, A. M., *Electrophoresis* 1991, 12, 439-441.
- 6 Mort, A. J. and Bauer, W. D. *J. Biol. Chem.* 1982, 257, 1870-1875.
- 7 Poveda, A., Santamaría, M., Bernabé, M., Prieto, A., Bruix, M., Corzo, J. and Jiménez-Barbero, J., *Carbohydr.*

Res. 1997, 304, 209-217. **8** Forsberg, L. S. and Rehus, B. L., *J. Bacteriol.* 1997, 179, 5366-5371.

CARACTERIZACIÓN Y SELECCIÓN DE CEPAS AISLADAS A PARTIR DE NÓDULOS EFECTIVOS DE *CICER ARIETINUM*

Rivas A., Velázquez E., Mateos P. y Martínez-Molina E.

Departamento de Microbiología y Genética. Edificio Departamental. Lab. 209. Universidad de Salamanca. emm@gugu.usal.es

El garbanzo es la tercera leguminosa en importancia en el mundo y en España es actualmente una de las más cultivadas. Su valor nutritivo la sitúa entre las leguminosas de mayor importancia en consumo humano y forma parte desde hace tiempo de la dieta mediterránea.

Las bacterias aisladas a partir de nódulos de *Cicer arietinum* se clasificaron en un primer momento dentro de *Rhizobium loti* que incluía (y aún incluye) a muchos aislados de afiliación dudosa. Posteriormente, en 1994 se describe una especie que incluye exclusivamente aislados de garbanzo, *R. ciceri*. Nour *et al.*, en 1995 describieron una segunda especie capaz de nodular garbanzo: *R. mediterraneum*.

En nuestro laboratorio se ha puesto a punto una nueva técnica de electroforesis, denominada Staicase Electrophoresis (Cruz-Sánchez *et al.*, 1997), que permite el análisis de los perfiles de LMW RNA (RNA estables de bajo peso molecular) que incluyen los 5S rRNA y los tRNA. Mediante esta técnica se han analizado los perfiles de LMW RNA de las cepas tipo de las especies incluídas en la Familia Rhizobiaceae (Velázquez *et al.*, 1998). De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede concluir que los diferentes Géneros de la Familia Rhizobiaceae se diferencian en los perfiles de 5S rRNA. De acuerdo con nuestros resultados se pudo establecer que las especies denominadas hasta entonces *R. mediterraneum* y *R. ciceri* debían clasificarse en un Género diferente. Muy recientemente estas dos especies se han reclasificado junto a *R. loti*, *R. huackuii* y *R. thiansanense* en un nuevo Género denominado *Mesorhizobium* (Jarvis *et al.*, 1997). Asimismo, de acuerdo con nuestros resultados, se podía comprobar que los perfiles de LMW RNA de estas dos especies se diferenciaban en la clase 2 de tRNA. Estos resultados nos permiten abordar un análisis de cepas aisladas a partir de garbanzo en suelos habitualmente dedicados a su cultivo.

Los objetivos de este trabajo han sido la caracterización de cepas aisladas a partir de nódulos efectivos de garbanzo y la selección de cepas en función de sus características simbióticas.

Para realizar este estudio se aislaron 25 cepas a partir de nódulos efectivos de garbanzo cultivados en suelo de Pedrosillo (Salamanca).

La caracterización de las cepas aisladas se llevó a cabo en función de sus perfiles de actividad enzimática, de los perfiles de plásmidos y de los perfiles de LMW RNA.

Se analizaron 20 actividades enzimáticas (glucosidasas, fosfatasa y sulfatasas) utilizando como sustratos paranitrofenil derivados.

Los plásmidos se analizaron de acuerdo con la técnica descrita por Plazinski *et al.* (1985).

Los perfiles de LMW RNA se analizaron de acuerdo con la técnica descrita por Cruz-Sánchez *et al.* (1997).

Los resultados de actividad enzimática, en general, mostraron un patrón básico común de producción enzimática. Las cepas aisladas mostraron actividad glucosaminidasa, fosfatasa ácida y alcalina, y glucosidasas y xilosidasas.

Se hallaron 10 perfiles de plásmidos diferentes que contenían 1 ó 2 plásmidos cuyos pesos moleculares oscilaron entre 50 y 160 MDa.

De acuerdo con los perfiles de LMW RNA obtenidos, el 72% de las cepas presentaron el mismo perfil de LMW RNA que la cepa de referencia *R. ciceri* USDA3383 y el 28% de las cepas el mismo que la cepa de referencia *R. mediterraneum* USDA 3392. En el suelo analizado no se ha detectado la formación de nódulos en garbanzo por ninguna otra especie o Género de la Familia Rhizobiaceae.

Se realizó el estudio de efectividad de todas las cepas aisladas, comprobándose que existen cepas de ambas especies (*M. mediterraneum* PECA 03 y *M. ciceri* PECA 09, PECA 11 y PECA 20) que forman un número de nódulos similar y las plantas inoculadas con ellas no presentan diferencias significativas ni en peso ni en altura de la parte aérea.

Teniendo en cuenta estos resultados cabe destacar que los perfiles de LMW RNA son útiles en la caracterización e identificación de los microorganismos que son capaces de nodular a un determinado hospedador, en este caso *Cicer arietinum*, y que los perfiles de producción de enzimas son útiles en el mismo sentido, sin embargo, en la selección de cepas que presenten ventajas simbióticas con respecto a otras es necesario tener en cuenta el perfil de plásmidos que son los que determinan en definitiva el rango de hospedador, la infectividad y la efectividad, independientemente de la especie de *rhizobia* de que se trate.

Bibliografía

- Cruz-Sánchez, J.M., Velázquez, E., Mateos, P.F., Velázquez, E., Martínez-Molina, E. 1997. Electrophoresis **18**: 1909-1911.
- Jarvis, B.D.W., Van Berkum, P., Chen, W.X., Nour, S.M., Fernández, M.P., Cleyet-Marel, J.C., Gillis, M. 1997. Int. J. Syst. Bacteriol. **47**: 895-898.
- Nour, S. H., Cleyet-Marel, J. C., Normand, P., Fernández, M. P. 1995. Int. J. Syst. Bacteriol. **45**: 640-648.
- Nour, S. H., Fernández, M. P., Normand, P., Cleyet-Marel, J. C.. 1994. Int. J. Syst. Bacteriol. **44**: 511-522.
- Plazinsky, J., Chen Y.H., Rolfe, B.G. 1985. Appl. Environm. Microbiol. **48**: 1001-1003.
- Velázquez, E., Cruz-Sánchez, J.M., Mateos P.F., Martínez-Molina E. 1998. Appl. Environ. Microbiol. **64**: 1555-1559.

AISLAMIENTO Y EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD FIJADORA DE NITROGENO DE *RHIZOBIUM FREDII* PROCEDENTE DE SUELOS DE LA PROVINCIA CHINA DE HUBEI

Temprano F.¹, Santamaría C.¹, Rodríguez-Navarro D.N.¹, Camacho M.¹, Daza A.¹ y Ruíz-Sainz J.E.²

(1) C.I.F.A. Las Torres y Tomejil. Apdo. Oficial. Alcalá del Río (Sevilla). E-mail: cifatorr@cap.caan.es. (2) Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Sevilla. Apdo. 1095. 41080 Sevilla.

Introducción

Rhizobium fredii es la bacteria de crecimiento rápido que junto a *Bradyrhizobium japonicum* y *B. elkani* nodula, mayoritariamente, a la soja (*Glycine max* (L.) Merrill.). *R. fredii* fué aislada por primera vez en suelos de la República Popular de China en 1982 (3) y posteriormente en suelos de otros países (5). Desde entonces se han realizado numerosos estudios para conocer mejor las características y el valor agronómico de este *Rhizobiumi* (1, 2). En este trabajo se han obtenido aislamientos de *R. fredii* de suelos de una zona de la provincia china de Hubei, donde tradicionalmente se cultiva soja, con el fin de disponer de una amplia colección de cepas de esa especie de *Rhizobium* para ser utilizada en estudios genéticos y agronómicos.

Materiales y Métodos

Se tomaron muestras de suelos en cuatro condados (entre 6 y 11 muestras por condado) de la provincia de Hubei: Honghu (aluvial, franco limoso, pH 8); Qianjiang (aluvial, arcilloso, pH 7,5); Wuchan (suelo rojo/ocre, areno limoso, pH 6,5) y Xiantao (arcilloso, pH 8). En estos suelos se cultiva soja desde hace, al menos, 60 años (entre 60 y 600 años según el condado).

Para obtener los aislamientos de *R. fredii*, se tomaron 2 g. de cada muestra de suelo, se diluyeron 1:10 en solución tampón y se inocularon (1 ml/semilla) a semillas de soja de los cultivares Williams y Peking. Las semillas se sembraron en jarros de Leonard preparados con un sustrato de vermiculita/perlita (2:1) y solución nutritiva de Rigaud y Puppo (1/2, pH 7,5) (4, 6). Por cada muestra de suelo y cultivar se sembraron dos jarros (2 semillas/jarro) y las plantas se desarrollaron en invernadero (18-32 °C, 14 h. de luz) durante un mes. Finalmente los nódulos se esterilizaron en superficie y se procedió a aislar cultivos de rizobios en medio de extracto de levadura-manitol (6).

Con uno de los suelos del condado de Honghu, se efectuaron diluciones seriadas 1/10 que se inocularon a jarros de Leonard con el cultivar de soja AS19, siguiendo el método del número más probable (6), con el fin de estimar la densidad de las poblaciones nativas de rizobios.

Para la evaluación de la nodulación y la fijación de nitrógeno de los aislamientos se utilizaron también jarros de Leonard, y los cultivares de soja Williams y AS19; siguiendo la metodología anterior; las plantas crecieron en invernadero durante 50

días, al cabo de los cuales se valoró visualmente la nodulación y se estimó la efectividad fijadora de las cepas como peso seco de parte aérea de las plantas, en comparación con los controles no inoculados.

Resultados y Discusión

Se obtuvieron 524 aislamientos (167, 94, 82 y 181 de cada uno de los condados), La proporción de aislamientos de *R. fredii* y *B. japonicum* resultó ser variable según su procedencia y el cultivar de soja utilizado (Tabla 1). Así, en los suelos de Honghu predomina *R. fredii* y en Wuchan sólo se pudo aislar *B. japonicum*, mientras que en los otros dos condados se aislaron ambos tipos de rizobios. Por otro lado, de forma general, parece que en el cultivar Williams se aísla una mayor proporción de *B. japonicum* que en el cultivar Peking.

Tabla 1.- Porcentaje de aislamientos de *Rhizobium* o *Bradyrhizobium* obtenidos de los cultivares de soja Williams y Peking, a partir de suelos de 4 condados de Hubei (China).

Condados	Williams		Peking	
	<i>R. fredii</i>	<i>B. japonicum</i>	<i>R. fredii</i>	<i>B. japonicum</i>
Honghu	93	4	100	0
Qianjiang	48	52	83	17
Wuchan	0	100	0	100
Xiantao	41	59	54	46

En una muestra de suelo del condado de Honghu la densidad de las poblaciones nativas de rizobios, estimada por método del NMP, fué de $1,7 \times 10^4$ bacterias/g. La densidad de rizobios capaces de nodular la soja en estos suelos parece, pues, ser bastante alta y suficiente para nodular los cultivos de soja. Al mismo tiempo se evaluó la capacidad de nodulación y de fijación de nitrógeno de 135 aislamientos de *R. fredii*, procedentes del condado de Honghu, en los cultivares de soja Williams (origen americano) y AS19 (origen chino). Todos los aislamientos mostraron una alta capacidad de nodulación en ambos cultivares, mientras que la efectividad fué bastante variable. La proporción de aislamientos inefectivos fué, en ambos cultivares, inferior al 3 %. En el cultivar AS19 los aislamientos mostraron, en general, una efectividad mucho más alta que en el cultivar Williams, donde una gran proporción de aislamientos de *R. fredii* desarrollaron una efectividad mediocre.

Referencias.- (1) Buendía-Clavería, A.M. et al. (1994) System. Appl. Microbiol. 17:155-160. (2) Dowdle, S.F. y Bohlool, B.B. (1985). Appl. Environ. Microbiol. 50:1171-1176. (3) Keyser, H.H. et al. (1982) Sci. 215:1631-1632. (4) Rigaud, J. y Puppo, A. (1975). J. Gen. Microbiol. 88:223-228. (5) Rodríguez-Navarro, D.N. et al. (1996). System. Appl. Microbiol. 19:240-248. (6) Vincent, J.M. (1970). IBP Handbook No. 15, Blackwell Sci. Pub.

MERCURY AND ZINC TOLERANCE OF *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* BV. *TRIFOLII* ISOLATES FROM HEAVY METAL CONTAMINATED SOIL

Castro I.V.¹, Ferreira E.¹ and McGrath S.P.²

¹ Dept. de Microbiologia, EAN/EFN - Instituto Nacional de Investigação Agrária. Quinta do Marquês 2780 - Oeiras. Portugal.

² Soil Science Dept., IACR-Rothamsted. Harpenden, AL5 2JQ, U.K.

Introduction

Anthropogenic pollutants, including heavy metals, emitted by industrial activities can have an adverse impact on the activity, ecology and population dynamics of the indigenous microbiota in the soil environment. While many heavy metals (Zn, Cu, Ni, Co and Cr) are essential elements at low levels, they can exert toxic effects at the concentrations encountered in polluted environments. In response to toxic concentrations of heavy metals many soil microorganisms can develop resistance and in gram-negative bacteria this is frequently mediated by plasmids (Silver and Misra, 1988, Silver, 1992).

Despite the presence of heavy metals in agricultural soils, there have been few studies of metal resistance in rhizobia, although N₂-fixation is considered to be one of the most important microbial processes that is sensitive to metal contamination. From a study of metal tolerance of *R. leguminosarum* bv. *trifolii* Chaudri et al. (1992), found a marked difference in the levels of resistance of strains isolated from root nodules of clover plants grown in metal contaminated soil and those isolated from plants grown in uncontaminated soils. Tolerance to toxic metals by *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, effective in N₂-fixation with white clover, was also shown by Leung et al. (1993).

In the present study we report evidence that *R. leguminosarum* bv. *trifolii* mutants are resistant to higher levels of heavy metals, than the wild-type strain in terms of the effects of different concentrations of Zn and Hg on cell viability.

Material and Methods

We used a soil from an industrial area polluted by heavy metals mainly Zn (375 mg kg⁻¹) and Hg (33 mg kg⁻¹). Soils samples were sterilized by Gamma- irradiation (25 kGy) and inoculated with approximately 10⁷ cells g soil⁻¹ of a *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, strain 24 Ts1A (wild-type). This strain was previously isolated from root nodules of *Trifolium subterraneum* grown in an unpolluted soil. Uninoculated soil samples were used as controls. After inoculation all soil samples were sealed and placed in the dark at 15 °C. Six and twelve months after the inoculation, samples of soils were taken and nitrogenase activity (ARA) was estimated on six subclover plants. The nodules from these plants were excised and bacteria isolated. Ten isolates were analysed for plasmid content using horizontal gel electrophoresis, in an adaptation of the Eckhardt method (1978). Two isolates (B and E) with plasmid profiles different from the wild-type strain were evaluated for sensitivity to Hg²⁺ and Zn²⁺. These were added separately as chloride salts at concentrations of 0.004, 0.008 and 0.01 µg ml⁻¹ Hg and 0.4, 1.0 and 5.0 µg ml⁻¹ Zn. Ten ml of each of these test solutions were inoculated with 30 µl of the washed resuspended cells to give ca 10⁶

cells ml⁻¹ and incubated at 28 °C on an orbital shaker at 200 rev min⁻¹ for 72 h. Cell viability was assessed after 5, 24, 48 and 72 h and was expressed as log₁₀ colony forming units (cfu) ml⁻¹.

Results and Discussion

Plants from controls (uninoculated soil samples) were checked for the presence of nodules, 6 and 12 months after inoculation. Since no nodules could be found, the efficiency of irradiation as a sterilant was confirmed.

ARA of the polluted soils was lower than that of the wild-type strain in unpolluted soil. Although remaining Fix⁺, the values of ARA decreased by about 40% and 75%, 6 and 12 months after the inoculation, respectively.

Twelve months after inoculation, the plasmid pattern in 40% of the isolates differed from that of the wild-type strain 24 Ts1A. Two of these isolates were tested for resistance to Zn and Hg and compared with the wild type. The strain 24 Ts1A and the two isolates (B and E) were all very sensitive to Hg. However, at the concentrations tested here (Table 1) the two isolates were more tolerant than the wild type strain. At 0.008 µg ml⁻¹ all cells of 24 Ts1A were killed after 24 h but both isolates survived including at the highest concentration tested (0.01 µg ml⁻¹). None of the isolates was completely inhibited by any of the concentrations of Zn used but the wild-type did not survive at 1.0 µg ml⁻¹ after 72 h or at 5.0 µg ml⁻¹ after 24 h (Table 2).

Table 1. Effects of 0.0, 0.004, 0.008 and 0.01 µg ml⁻¹ Hg on cell viability expressed as log₁₀ of cfu ml⁻¹ of wild-type (24Ts1A) and isolates (B and E) for 72 hours.

h	wild type				B				E			
	.0	.004	.008	.01	.0	.004	.008	.01	.0	.004	.008	.01
5	6.08	5.44	1.11	0	6.14	6.16	6.10	5.57	6.05	5.85	5.50	3.85
24	6.41	5.20	0	0	6.38	6.31	5.83	0	6.13	6.04	1.71	1.41
48	6.33	4.40	0	0	6.54	6.63	5.40	0	6.54	5.95	1.49	1.41
72	6.39	3.65	0	0	6.71	6.71	4.83	0	6.72	5.95	1.62	0

Table 2. Effects of 0.0, 0.4, 1.0 and 5.0 µg ml⁻¹ Zn on cell viability expressed as log₁₀ of cfu ml⁻¹ of the wild-type (24Ts1A) and isolates (B and E) for 72 hours.

h	wild type				B				E			
	0.0	0.4	1.0	5.0	0.0	0.4	1.0	5.0	0.0	0.4	1.0	5.0
5	6.39	6.07	6.12	5.85	7.42	6.55	6.83	4.80	6.14	5.92	5.93	5.37
24	6.37	5.98	4.58	0	6.64	5.19	5.34	5.13	6.57	5.58	4.95	2.78
48	6.26	5.99	2.78	0	6.81	5.93	5.24	4.41	6.54	5.40	4.40	2.00
72	6.32	4.54	0	0	6.90	6.85	5.50	3.94	6.66	5.37	3.45	1.49

These data indicate a marked increased in tolerance to Hg and Zn in the two isolates of *R. leguminosarum* bv. *trifolii* with a different plasmid profile isolated from polluted soil, when compared with the wild-type strain. There is also evidence that these rearrangement of plasmids could be viewed as an adaptation of the population to certain environmental factors, such as the pressure exerted by heavy metals toxicity.

References

- Chaudri, A., McGrath, S. and Giller, K. (1992) *Soil Biol. Biochem.*, 24: 83-88
 Eckhardt, T. (1978) *Plasmid*, 1:584-588.
 Leung et al. (1993). Report No. FR 0342. Foundation for Water Research Marlow
 Silver, S. and Misra, T.K. (1988) *Ann. Rev. Microb.*, 42: 717-743.
 Silver, S. (1992) *Plasmid*, 27: 1-3.

ESTUDIO DEL POTENCIAL BIORREMEDIADOR DE *SINORHIZOBIUM MELILOTI*

Sánchez Contreras M., Villacieros M., Fernández-Piñas F., Lloret J., Martín M., Bonilla I. y Rivilla R.

Departamento de Biología. Universidad Autónoma de Madrid.

Al igual que otros microorganismos edáficos, *Sinorhizobium meliloti* posee rutas metabólicas tales como la vía del -ceto adipato que le facultan para utilizar compuestos fenólicos como fuentes de carbono y de energía. La presencia de estas rutas metabólicas hace posible la modificación genética de este microorganismo mediante la introducción de genes que codifican enzimas capaces de degradar contaminantes aromáticos tales como los hidrocarburos aromáticos policíclicos y bifenilos policlorados. Estos genes, que no han sido aislados de *Rhizobiaceae*, pueden ser situados bajo el control de promotores endógenos de *Sinorhizobium* para su expresión. Además, la capacidad de *S. meliloti* para colonizar eficientemente la rizosfera de la alfalfa hace de esta bacteria un buen candidato para técnicas de rizorremediación, sobre todo si consideramos que la alfalfa es una planta bianual cuyas raíces pueden alcanzar los seis metros de profundidad.

El estudio se ha planteado a tres niveles:

1.- Aislamiento de cepas de *S. meliloti* de suelos contaminados. Hemos aislado cepas de este microorganismo de *Medicago spp.* crecidas en estos suelos. Además utilizando plántulas de *Medicago sativa* se están aislando nuevas cepas utilizando suelos contaminados como inoculantes. La presencia de cepas con capacidad biodegradadora, se está evaluando mediante la determinación de catecol 2,3-dioxigenasa, enzima clave en la degradación de los diversos contaminantes aromáticos.

2.- Adaptación de los genes de biodegradación de bifenilo de *Pseudomonas* en *S. meliloti*. Los genes *bph* contenidos en un minitransposón sin marcadores de resistencia a antibióticos han sido modificados mediante la introducción de *Sinorhizobium*, entre ellos los promotores de genes *nod* (cajas *nod*) que podrían permitir situar los genes de biodegradación bajo el control de la planta.

3.- Utilización de promotores *nod* de *Sinorhizobium* para regular la expresión de los genes *bph* en *Pseudomonas fluorescens* F113. Esta cepa, colonizadora de la rizosfera de alfalfa, se pretende usar para rizorremediación situando la expresión de los genes de biodegradación bajo el control de la planta. Previamente estamos analizando mediante fusiones transcripcionales con *lacZ* la expresión y regulación de las cajas *nod* en *Pseudomonas fluorescens* en presencia y ausencia de *nodD1* de *S. meliloti*.

Financiado por Unión Europea BIO4-CT97-2227 y C.A.M. 07M/0170/1977

MICROBIAL ACTIVITIES IN A SEWAGE SLUDGE AMENDED SOIL

Oliveira A.¹, Pampulha M.E.¹, Ferreira E.M.² & Castro I.²

1 Dep. Bot. Engenharia Biológica, Instituto Superior de Agronomia, Tapada da Ajuda,

1399 Lisboa Codex, Portugal. adnpoliveira@isa.utl.pt

2 Dep. Microbiologia, Estação Florestal Nacional, Quinta do Marquês, 2780 Oeiras

Introduction

Application of sewage sludge to agricultural land recycles plant nutrients and organic matter to soil. However, the most important hindrance to sewage sludge utilization is that soil pollution problems may be increasingly serious. Most research has focused mainly on the effects of elevated soil metal concentrations on crop yields, uptake by plants and possible effects on animals and humans as the primary consumers of these crops. Therefore toxic effects of sewage sludge can also affect soil microbial processes. Various parameters can be used as sensitive indicators of soil pollution problems, such as Biological Nitrogen Fixation (BNF) (McGrath et al, 1988; Smith, 1991) and soil enzymatic activities (Frankenberger and Dick, 1983).

The objective of our investigation was to evaluate the response of N₂-fixation (assessed by determination of nitrogenase activity in *Trifolium subterraneum*) and soil dehydrogenase activity due to the application of different rates of sewage sludge.

Material and methods

This experiment was conducted in pots filled with composite soil samples (pHH₂O 7.2) taken from 0-20 cm and added with sludge at the rates: 10, 50 and 80 t ha⁻¹. As control we used a soil sample without amendment and added with a standard mineral fertilization (PK). Half of the pots were seeded with grass (*Lolium multiflorum*) and the other half with sub-clover (*Trifolium subterraneum*) and maintained in a greenhouse. Nitrogenase activity (ARA) was evaluated using clover plants, growing in Jensen's medium, inoculated with soil suspensions obtained from the pots.

Dehydrogenase activity was assayed in soil samples, collected from the pots, using the method of Tabatabai (1982). Specific activity is reported as µg of triphenylformazan released per 1g dry soil within 24h.

Results and discussion

Nitrogenase activity (Table 1) was similar for all treatments. For *Lolium* treatments the highest rate of sludge (80 t ha⁻¹) the ARA was significantly higher. These results suggest that the sewage application did not affect the potential BNF.

The effect of sewage sludge application to the soil on the dehydrogenase activity is summarized in Table 2. Whereas the dehydrogenase activity decreased in pots sown with *Trifolium subterraneum*, in pots sown with *Lolium multiflorum* the effect was quite different. In this case dehydrogenase activity tended to increase with the increase of sludge application.

Generally, the enzyme activities increased with increasing organic C of the soils (Baruah and Mishra, 1984). Since sewage sludge supplies the carbon sources and the nutrient necessary for microbial growth, it was expected to have a positive effect on dehydrogenase activity, in agreement with many investigators (Lima et al, 1996; Martens et al, 1992). In contrast to these results, in pots sown with *Trifolium subterraneum* we obtained an inhibitory effect on biological activity of these soils, expressed by the reduced dehydrogenase activity.

The results obtained emphasize the importance of vegetation to microbial activity and pattern of recovery of amended soils.

Table 1. Effects of sewage sludge application on nitrogenase activity (expressed as nmoles $C_2H_4/h/3$ plants)

Treatment	Nitrogenase activity
<i>T. subt.</i> + PK (Control)	22a
<i>T. subt.</i> + 10 t ha ⁻¹	30a
<i>T. subt.</i> + 50 t ha ⁻¹	32a
<i>T. subt.</i> + 80 t ha ⁻¹	30a
<i>Lolium</i> + PK (Control)	34a
<i>Lolium</i> + 10 t ha ⁻¹	30a
<i>Lolium</i> + 50 t ha ⁻¹	31a
<i>Lolium</i> + 80 t ha ⁻¹	60b

Values followed by different letters in a column differ significantly at $P < 0.05$.

Table 2. Effects of sewage sludge application on dehydrogenase activity (expressed as μg trifenilformazan g⁻¹ dry soil 24 h⁻¹)

Treatment	Dehydrogenase activity
<i>T. subt.</i> + PK (Control)	98c
<i>T. subt.</i> + 10 t ha ⁻¹	70bc
<i>T. subt.</i> + 50 t ha ⁻¹	43ab
<i>T. subt.</i> + 80 t ha ⁻¹	19a
<i>Lolium</i> + PK (Control)	84c
<i>Lolium</i> + 10 t ha ⁻¹	134d
<i>Lolium</i> + 50 t ha ⁻¹	183e
<i>Lolium</i> + 80 t ha ⁻¹	151d

Values followed by different letters in a column differ significantly at $P < 0.05$.

References

- Baruah, M. and Mishra, R. R. (1984) *Soil Biol. Biochem.* 16(4): 423-424.
 Frankenberger, W. T. and Dick, W. A. (1983) *Soil Sci. Soc. Am. J.* 47: 945-951.
 Lima, J. A., Nahas, E. and Gomes, A. C. (1996) *Applied Soil Ecology* 4: 75-82.
 Martens, D. A., Johanson, J. B. and Frankenberger, Jr. W. T. (1992) *Soil Sci.* 153: 53-61
 McGrath *et al* (1988) *Soil Biol. Biochem.* 20, 415-424.
 Tabatabai, M. A. (1982) *Soil enzymes*. In A.L. Page *et al* (Editors), *Methods of Analysis*, Part 2, 2nd edn. *Agronomy* 9:75-82.
 Smith, S. R. (1991) *Advances in Soil Science* 16: 191-212.

Acknowledgements

This work was supported by IAEA (Project 8468) and ISA

COINOCULACIONES DE PLANTAS DE SOJA CON BACTERIAS DE LOS GÉNEROS *BRADYRHIZOBIUM*, *SINORHIZOBIUM*, *AZOSPIRILLUM* Y *BACILLUS*

Casas M. A.², de Felipe M. R.¹, Roldós J.², Rubio C.¹, Guasch L. M.¹ y Fernández-Pascual M.¹

¹Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal. Centro de Ciencias Medioambientales. CSIC. Madrid.

²Grupo de Biofertilizantes. Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar. La Habana, Cuba.

Introducción. El efecto sobre las leguminosas de la coinoculación con bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno y de géneros promotores del crecimiento vegetal (PGPRs) está adquiriendo un interés creciente dentro de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) actual. Publicaciones recientes apuntan un efecto positivo sobre estas plantas por la aplicación combinada de bacterias de los géneros *Rhizobium* o *Bradyrhizobium*, con *Azospirillum*, una conocida PGPR diazotrofa (Okon *et al.*, 1998). El efecto positivo se traduce en una nodulación temprana, un aumento del número de nódulos, de la actividad nitrogenasa y de la respiración radicular, así como una mejoría general en la absorción de agua y nutrientes por las raíces. Las bacterias del género *Azospirillum* normalmente se asocian a raíces de gramíneas como la caña de azúcar, arroz, maíz etc., traduciéndose en un beneficio para la planta por su aporte a la nutrición. Aplicaciones artificiales de biopreparados a base de esta bacteria en caña de azúcar en Cuba, han arrojado incrementos significativos de los rendimientos (Roldós *et al.*, 1995), aunque se desconoce la importancia que tenga sobre estos efectos la FBN y la producción de fitohormonas promotoras del crecimiento debidas al microorganismo. *Azospirillum*, aparte de fijar dinitrógeno en condiciones microaerófilas, es capaz de producir citoquininas y giberelinas), pero se destaca en la producción de ácido indol-acético, para la cual posee al menos tres rutas biosintéticas (Van de Broek *et al.*, 1996) una de ellas independiente de triptofano, única en esta bacteria. Estas características de PGPR pudieran ser la razón de su efecto en coinoculaciones de leguminosas, lo cual estaría relacionado con la inducción de un mayor número de pelos radiculares infectables, diferenciados a partir de células epidérmicas y a un aumento en la secreción de flavonoides inductores de los genes nod (Okon *et al.*, 1998). También ha sido objeto de atención su interacción con otras PGPRs, encontrándose aumentos significativos en la actividad nitrogenasa en cultivos mixtos de especies de *Azospirillum* y *Bacillus*.

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar en condiciones de esterilidad, el efecto que sobre plantas de soja (*Glycine max* L. Merr), tiene la coinoculación de cepas de *A. Brasilense*, *B. japonicum* y *B. pumilus*. Paralelamente se han llevado a cabo experimentos con *Sinorhizobium fredii* con objeto de comparar su comportamiento con el *Bradyrhizobium* y su posible introducción en suelos cubanos. A la vista de los resultados de laboratorio se ha diseñado un experimento de campo en la zona de Cienfuegos (Cuba), para analizar los efectos de la coinoculación en los indicadores ya medidos en el laboratorio, así como evaluar el efecto que produce el intercalamiento de soja en cultivos con caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) sobre la producción final de azúcar, como alternativa ecológica para mejorar el rendimiento de la caña.

Material y Métodos. Los experimentos se llevaron a cabo en condiciones controladas (cámara de cultivo e invernadero) y campo. Las plantas se sembraron en jarras Leonard estériles y se inocularon con las cepas USDA 110 de *B. japonicum*, 8-I de *A. brasilense* (aislada en suelos cubanos) y B-12 de *B. pumilus*, haciendo todas las combinaciones posibles entre las mismas. Las plantas se regaron con solución

nutritiva libre de nitrógeno, excepto en los controles y en las inoculadas exclusivamente con *B. pumilus*, puesto que esta cepa es promotora del crecimiento pero no fijadora de nitrógeno. Los inóculos se han realizado con 10^8 cfu ml⁻¹ de cada cepa. Las plantas se recogieron a las siete semanas de la siembra y se midieron los siguientes parámetros: altura, peso de tallos, raíces y nódulos, actividad fijadora de nitrógeno y contenido total de nitrógeno. Pese a disponer en el Departamento de un sistema de flujo continuo para medida de la actividad nitrogenasa por la tasa de reducción de acetileno (Fernández-Pascual *et al.*, 1996), esta actividad se determinó por el sistema convencional debido al alto número de muestras para analizar. Muestras de raíces y nódulos fueron procesadas para microscopía óptica y electrónica. En los experimentos de campo se utilizarán parcelas de 48 m² con 4 réplicas por tratamiento, usando un diseño factorial. Se intercalan plantas de soja inoculadas con las cepas anteriormente mencionadas.

Resultados y Discusión. Los resultados de las coinoculaciones se han comparado con controles regados con nitrato y con plantas inoculadas sólo con la cepa USDA 110. En todos los parámetros referentes a la parte aérea, la coinoculación, produce incrementos con respecto al control con nitrato, excepto la combinación de *Azospirillum* y *B. pumillus* en la que se produce un descenso significativo del peso de la parte aérea, probablemente debido a interacciones entre los dos microorganismos. La combinación de *B. japonicum* con *B. Pumilus* es con la que mejores rendimientos se obtienen en los parámetros referentes a biomasa. En cuanto a los parámetros nodulares se han encontrado diferencias significativas en el número nódulos en las plantas coinoculadas con *Bradyrhizobium* y *Azospirillum*, a semejanza de lo publicado por Burdman *et al.*, (1997) en *Phaseolus vulgaris* con *R. tropici* y *R. etli* y la misma especie de *Azospirillum*. En cuanto al peso de los nódulos tanto las inoculadas con *B. pumilus* como con *Azospirillum* producen incrementos significativos, aunque la tasa de fijación de nitrógeno sólo aumenta en el caso de la inoculación con *B. pumilus*. La coinoculación simultánea de las cepas de *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* y *Bacillus* no produce incrementos significativos de ningún parámetro. Los experimentos llevados a cabo con *S. fredii* parecen demostrar que esta cepa aumenta el número de nódulos y el peso de los mismos comparando con la USDA 110. Faltan por llevar a cabo los experimentos de coinoculación de esta cepa de *Sinorhizobium* con *A. Brasilense* y *B. pumilus*.

Se ha observado colonización de las células parenquimáticas de raíces de soja inoculadas con *Azospirillum*, que no han sido observadas ni en el control ni en raíces inoculadas con otras PGPRs. La confirmación de que estas bacterias correspondan a la cepa 8-I de *Azospirillum* se está comprobando mediante inmunolocalización.

Conclusiones: 1) Cualquier tipo de coinoculación produce iguales o mejores resultados en la mayoría de los parámetros estudiados, que las plantas regadas con nitrato, lo cual indicaría que no es necesaria la fertilización nitrogenada en plantas coinoculadas. 2) La combinación de *B. japonicum* con *B. pumilus* puede considerarse la interacción óptima de las estudiadas.

Los autores agradecen a la Dra. D. Rodríguez de CIFA Las Torres y Tomejil, Drs. J.E. Ruiz-Sainz y Buendía de la Facultad de Farmacia de Sevilla y Drs. Gutiérrez Mañero y Probanza de la Universidad San Pablo CEU, la donación de las cepas de *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* y *B. pumilus*, respectivamente.

Bibliografía

- Burdman *et al.*, 1997. Soil Biol. Biochem. 29: 923-929.
Van de Broek *et al.*, 1996. In Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century. Eds.: Emerich *et al.*, 1998. P. 375.
Fernández-Pascual *et al.*, 1996. Proceedings of the International Symposium on Weed Research. Eds.: de Prado *et al.*, Universidad de Córdoba. P. 134-136.
Okon *et al.*, 1998. In Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century. Eds.: Emerich *et al.*, 1998. P. 369.
Roldos *et al.*, 1995. En: Avances en Biotecnología Moderna. Congreso Biotecnología Habana 95. 3.11.43

EFFECTOS DE LA COINOCULACIÓN DE ALFALFA CON *SINORHIZOBIUM MELILOTI* EFB1 Y *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* F113

Villacieros M., Sánchez Contreras M., Lloret J., Fernández-Piñas F., Bonilla I. y Rivilla R.

Departamento de Biología. Universidad Autónoma de Madrid.

Pseudomonas fluorescens F113 es una estirpe aislada de la rizosfera de remolacha que tiene la capacidad de colonizar las raíces de numerosas plantas, entre ellas la alfalfa. Esta cepa ha sido empleada para el control biológico de patógenos ya que produce sideróforos, antibióticos y otros compuestos capaces de limitar el crecimiento de bacterias y hongos fitopatógenos. Los genes de biodegradación de bifenilos policlorados (*bph*) provenientes de *Pseudomonas sp.* LB400 han sido introducidos con éxito en F113, y la cepa resultante (F113pcb) es capaz de utilizar el bifenilo como única fuente de carbono y energía. Debido a estas características se ha propuesto utilizar esta estirpe para la rizorremediación de suelos en conjunción con plantas de alfalfa.

Un aspecto fundamental a evaluar para su posible uso en la rizosfera de alfalfa es la interacción que pueda tener con *Sinorhizobium meliloti* y los efectos de esa interacción sobre la planta. Para estudiar estos efectos hemos realizado experimentos de inoculación de plantulas de alfalfa con cada una de las estirpes y experimentos de coinoculación, determinando los siguientes parámetros:

- Población de cada estirpe asociada a la raíz, determinada mediante el conteo de bacterias viables en medio selectivo para cada una de las estirpes.
- Tamaño de la planta, determinado según su peso húmedo y su peso seco.
- Número de nódulos.
- Contenido de nitrógeno total de la planta, determinado por análisis elemental.

Los experimentos realizados han mostrado la necesidad de la coinoculación, ya que las plantas inoculadas con *Pseudomonas* y fertilizadas con nitrato son significativamente más pequeñas que las plantas control no inoculadas. La diferencia de tamaño se aprecia tanto en peso húmedo como en peso seco, aunque no hay diferencias en el contenido de nitrógeno. Sin embargo cuando las plantas se coinoculaban con *Sinorhizobium* y *Pseudomonas* no hay diferencias ni en tamaño ni en contenido de nitrógeno con las plantas inoculadas únicamente con *Sinorhizobium*.

Por otro lado la inoculación con *Pseudomonas* no parece tener ningún efecto sobre la simbiosis *Sinorhizobium*-alfalfa ya que ni el número de nódulos, ni el

contenido de nitrógeno, ni el número de rizobios por raíz se ven afectados. Por el contrario, en el caso de la coinoculación el número de pseudomonas por raíz disminuye en un orden de magnitud, lo que parece indicar que *Sinorhizobium* compite ventajosamente con *Pseudomonas* en la colonización de la rizosfera de alfalfa. De cualquier forma, incluso en los experimentos de coinoculación el número de pseudomonas que colonizan la raíz es relativamente alto (aproximadamente 10^6 unidades formadoras de colonias/sistema radicular) y comparable a las que colonizan la rizosfera de remolacha, por lo que la coinoculación no debería disminuir significativamente la capacidad de biocontrol, o en su caso, biodegradación de cepas derivadas de *Pseudomonas fluorescens* F113.

Financiado por Unión Europea BIO4-CT97-2227 y C.A.M. 07M/0170/1977

PRODUCCIÓN DE HOMOPOLIMEROS (3HB) Y COPOLIMEROS (3HB-HV) POR *AZOTOBACTER CHROOCOCCUM* H23 EN EFLUENTES ORIGINADOS EN LA OBTENCIÓN DE ACEITE DE OLIVA

Martínez-Toledo M.V., Pozo C., Juárez B., Salmerón V. y González-López J.

Instituto del Agua, Universidad de Granada, 18071, Granada, España

En los últimos años se ha estudiado la capacidad de diversos microorganismos de producir polihidroxiálcanoatos (PHA's) de naturaleza tanto homo- como copolimérica. Estos polímeros presentan un gran interés industrial debido a sus características plastoméricas y biodegradabilidad, lo que ha hecho posible el desarrollo de numerosas tecnologías fermentativas para la producción de estos compuestos (Brandl *et al.*, 1988; Byrom, D., 1992; González-López *et al.*, 1997). Uno de los problemas más importantes en los procesos de producción de estos polímeros es su alto costo de producción, especialmente por las fuentes de carbono utilizadas, glucosa. Por esta razón, la búsqueda de fuentes de carbono más baratas, con igual rendimiento que la glucosa, es absolutamente esencial a escala industrial para conseguir la competitividad comercial de estos bioplásticos.

Durante la producción de aceite de oliva en sistema de tres fases, se genera un efluente de alto poder contaminante normalmente llamado alpechín. No obstante, son varios los autores que han demostrado que este subproducto contiene un conjunto de nutrientes tanto inorgánicos como orgánicos que permiten el crecimiento de ciertos microorganismos (García-Barrionuevo *et al.*, 1993). *Azotobacter chroococcum* H23 es una cepa capaz de producir durante su crecimiento logarítmico grandes cantidades de homopolímeros plásticos en medios químicamente definidos y en medios de alpechín (Martínez-Toledo *et al.*, 1995).

En este trabajo se demuestra como *A. chroococcum* H23 es capaz de originar homo- (3HB) y copolímeros (3HB-HV) plásticos al cultivarse en medios conteniendo alpechín en respuesta a la adición o no de ácidos orgánicos de cadena corta.

La producción de polihidroxiálcanoatos (PHA's) por *A. chroococcum* H23 se estudió en medios de alpechín adicionados de distintos precursores (ácidos orgánicos de cadena corta) a distintos tiempos de incubación. La adición de ácido propiónico y ácido butírico (15 mM) no representa ninguna modificación de la producción de biomasa celular, independientemente del momento de la adición de los precursores. Sin embargo, la adición de ácido valérico (12 mM) originó una ligera disminución de la biomasa celular. Ello demuestra una toxicidad de este precursor, hecho que fue

demostrado también en medios químicamente definidos y conteniendo glucosa como fuente de carbono.

Análisis de GC-MS de los medios de cultivo conteniendo alpechín antes y después del crecimiento de *A. chroococcum* H23, demostraron que este microorganismo utilizó distintos compuestos fenólicos presentes en el alpechín. Esto resulta de especial importancia por ser estos compuestos responsables de la fitotoxicidad y actividad antibacteriana que dificultan en gran medida los procesos de biodegradación de este residuo (Martirani *et al.*, 1996).

El estudio de los polímeros producidos por *A. chroococcum* mediante RMN mostraron que este microorganismo produce copolímeros plásticos (3HB-HV) en medios de alpechín adicionados de ácido valérico, mientras que acumula homopolímeros (3HB) en medios de alpechín sin la adición de precursores o adicionados de ácido poprónico o butírico.

Nuestras experiencias sugieren que es posible la producción tanto de homopolímeros (3HB) como de copolímeros (3HB-HV) en medios de cultivo que contienen alpechín como principal fuente de carbono. Ello representa un nuevo área de estudio que permite la utilización de un residuo industrial altamente contaminante y de bajo coste para la producción de bioplástico de distinta composición molecular y consecuente con distintas propiedades plásticas.

Bibliografía:

- Brandl, H., *et al.* (1988). *Applied and Environmental Microbiology* S4, 1977-1982
- Byrom, D. (1992) *FEMS Microbial Reviews* 103, 247-250.
- García-Barrionuevo, A. *et al.*, (1993). *Environmental Toxicology and Chemistry* 12, 225-230.
- González-López, J. *et al.* (1997). *International Biodeterioration and Biodegradation* 38, 271-276.
- Martínez-Toledo, M.V. *et al.* (1997). *Journal of Applied Bacteriology* 78, 413-418.
- Martirani, L. *et al.* (1996). *Water Research* 30, 1917-1918.

ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD DE LAS POBLACIONES DE *RHIZOBIUM FREDII* EN SUELOS PROCEDENTES DE CHINA

Camacho M.¹, Santamaria C.¹, Daza A.¹, Rodriguez-Navarro D.N.¹, Buendía A.², Espuny R.², Bellogin R.², López C.², Ollero J.² y Temprano F.¹

¹CIFA “Las Torres y Tomejil”. Apto. oficial, 41200. Alcalá del Río (Sevilla).E-mail: cifatorr@cap.caan.es.

² Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Sevilla. Apto 1095. 41080 Sevilla.

En este trabajo se tomaron muestras de suelo de cuatro condados de la provincia China de Hubei (Honghu, Qianjiang, Wuchan y Xiantao) con el objeto de estudiar la diversidad de sus poblaciones rizobianas. Se utilizaron dos cultivares de soja para el aislamiento de los rizobios: Williams (cultivar americano) y Peking (cultivar asiático). Entre todos los aislamientos obtenidos de rizobios de crecimiento rápido (*R. fredii*) se seleccionaron un centenar para proceder a su caracterización. La eficiencia de la simbiosis de estos aislamientos fue generalmente mayor en el cultivar chino, aunque cabe destacar que un 98% de los aislamientos formaron nódulos efectivos en ambos cultivares.

El estudio de la biodiversidad de estos aislamientos se ha realizado en base a pruebas fisiológicas y perfiles electroforéticos de LPS, plásmidos y proteínas.

Entre las pruebas fisiológicas realizadas se encuentran las siguientes: crecimiento en distintas fuentes de carbono, utilización de fuentes de nitrógeno, producción de melanina y tolerancia a pH extremos y a salinidad.

De los datos obtenidos cabe destacar que menos del 10% de las estirpes fueron capaces de crecer en amigdalina, ramnosa e hidrolizado de caseína; la mayoría crecieron con todas las fuentes de nitrógeno ensayadas; la producción de melanina tuvo lugar en la mitad de los casos; el 90% de los aislamientos crecieron entre pH 5- pH 11 en medio sólido sin tamponar y sólo un 5% de ellos fue capaz de crecer a pH 4. Un 10% creció en presencia de 0,5 M de ClNa .

La totalidad de los aislamientos se puede agrupar en 12 patrones diferentes utilizando los perfiles electroforéticos de LPS. No obstante, la mayoría de las estirpes se agrupan en dos de ellos que presentan cuatro bandas de LPS I con distinta movilidad electroforética.

En cuanto al perfil de proteínas el estudio se hizo comparando aislamientos provenientes de un mismo punto de muestreo de cada condado, dado que esta técnica no permite comparar todos los aislamientos entre sí. Posteriormente se agruparon en un mismo gel estirpes con características fisiológicas comunes, lo que permitió discernir entre estirpes que por los datos anteriores parecían similares.

Por último, los perfiles de plásmidos revelaron una gran variabilidad entre los distintos aislamientos, tanto por el número de bandas que presentaban, como por el tamaño relativo de ellas. No obstante, muchas de las estirpes presentaban tres plásmidos comunes, y un cuarto que variaba de tamaño de unas a otras.

Del conjunto de datos obtenidos se podría concluir que la diversidad de estirpes de *R. fredii* en estos suelos es realmente alta. El cultivo continuado de soja en dicha región (varios siglos) puede haber posibilitado la presencia de altas poblaciones de rizobios capaces de nodular esta leguminosa y su diversificación.

UTILIZACIÓN DE LA PERLITA COMO SOPORTE PARA INOCULANTES BACTERIANOS

Daza A., Santamaría C., Rodríguez-Navarro D., Camacho M., Orive R. y Temprano F.

Laboratorio de Inoculantes. C.I.F.A. “Las Torres- Tomejil”, Apto. Oficial, 41200-Alcalá del Río (Sevilla). E-mail:cifatorr@cap.caan.es

Introducción

La inoculación de semillas de leguminosas con rizobios data de finales del siglo pasado (Voelcker, 1896). La turba finamente molida ha sido el sustrato utilizado generalmente para la producción de inoculantes rizobianos (Rougley, 1970). Otras bacterias utilizadas en control biológico o como promotoras del crecimiento vegetal se han empleado también para producir inoculantes siguiendo una tecnología similar (López et al., 1981).

La turba es un sustrato que presenta unas propiedades importantes para ser utilizada como soporte en la producción comercial de inoculantes: un alto contenido en materia orgánica, una buena capacidad de retención de agua y una facilidad para soportar una buena supervivencia de las bacterias. No obstante, entre las limitaciones de este sustrato se encuentran el hecho de su falta de homogeneidad, su carencia en algunas regiones, y que ciertos lotes de turba contienen inhibidores de algunas cepas de *Rhizobium*. Además, resulta difícil su esterilización completa mediante autoclavado, originándose a veces sustancias tóxicas para las bacterias durante este proceso.

Se han probado otros sustratos alternativos para la producción de inoculantes como carbones, aceites, suelos o vermiculita (Graham-Weiss et al., 1987). En esta comunicación se describen los resultados obtenidos al utilizar perlita como soporte de los inoculantes (Daza et al., 1998).

Materiales y Métodos

Las cepas bacterianas utilizadas han sido: *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, *Rhizobium fredii* SHM12, *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (cepas ISP23 e ISP42), *Rhizobium tropici* CIAT899 y *Bacillus megaterium* ATCC33085. Los sustratos utilizados han sido turba negra de Padul (Granada) y perlita (Spavik, S.A., Huesca). Ambos sustratos se molieron finamente hasta un diámetro de partícula de aproximadamente 60-80 micras y se mezclaron con los diferentes cultivos bacterianos bien crecidos ($1-4 \times 10^9$ células ml^{-1}). La mezcla contuvo una humedad final del 36-38% con ambos sustratos. Los inoculantes se conservaron durante seis meses a 4 y 28°C, determinándose periódicamente el número de bacterias vivas mediante la realización de diluciones seriadas y siembras en placas de Petri con medio YEM (Vincent, 1970). Los inoculantes se aplicaron sobre las semillas usando soluciones de 20 % de goma arábiga o de 10 % de sacarosa como adhesivos. La supervivencia de los rizobios sobre las semillas se realizó también mediante diluciones y siembras

en los medios de cultivo. Los ensayos de campo y de invernadero se realizaron con una distribución de bloques al azar con cuatro repeticiones.

Resultados

La supervivencia de *R. leguminosarum* (cepas ISP23 , ISP42), *R. tropici*, *B. japonicum* and *B. megaterium* en inoculantes preparados con perlita molida fue similar a la observada cuando se utilizó turba como soporte. En general, la supervivencia de todas las cepas en ambos sustratos fue mayor cuando se mantuvieron refrigerados que cuando se guardaron a temperatura ambiente. Los estudios con diferentes adhesivos han mostrado que la sacarosa es más eficaz que la goma arábica cuando se combina con inoculantes preparados en perlita, proporcionando una mayor supervivencia de las bacterias sobre las semillas. La utilidad de la perlita se ha corroborado también mediante estudios de eficiencia de nodulación, de fijación de nitrógeno y productividad en ensayos de invernadero y de campo, tanto con soja como con judía (Tabla 1).

Tabla 1. Ensayo de soja en campo (cv. kure) utilizando inoculantes de *B. japonicum* USDA110 y de *R. fredii* SHM12 preparados en turba y en perlita.

Soporte	Número de nódulos	Peso seco de nódulos (g)	Prod.de grano (kg.ha. ⁻¹)	% N en semillas
T	0	0	2896b	5,01d
TN	0	0	4222a	5,97c
SMH12/turba	947,5a	2,96a	4645a	6,38ab
SMH12/perlita	843,0a	2,98a	4450a	6,24b
LSD(0,05)	363,3	1,44		
USDA110/turba	433,0a	1,85a	4327a	6,56a
USDA110/perl.	335,0a	1,34a	4425a	6,49a
LSD(0,05)	330,0	0,96	651,5	0,26

Todos los valores son medias de 4 repeticiones. T, control sin inocular y sin fertilizar; TN, control sin inocular y fertilizado con nitrógeno mineral. El número de nódulos y el peso seco de los mismos se calcularon después de 50 días, y los valores son medias de 10 plantas.

Bibliografía

- Daza et al. (1998) Soil Biol. Biochem. (enviado)
 Graham-Weiss, L. et al., (1987) Appl. Env. Microbiol. **53**, 2138-3140.
 López et al. (1981). Proc. 5th Inter. Conf. Plant Path. Bact. pp. 538-548. CIAT, Cali, Colombia.
 Roughley, R.J. (1970) Plant Soil **32**, 675-701.
 Vincent, J.M. (1975) A Manual for the Practical Study of Root-nodule Bacteria. Blackwell, Oxford.
 Voelcker, J.A. (1896) J. Roy. Soc. 3rd Serv. **7**, 253-264.

BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS VERSUS HONGOS MICORRÍZAS ARBUSCULARES: DOBLE INOCULACIÓN EN *BRACHIARIA DECUMBENS*

Lyra de M.C.C.P., Souza E., Lira Jr. M.A., Burity H.A.

Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Sevilla. Apdo 1095. 41080 Sevilla. España. catanho@cica.es

En las últimas décadas se ha intentado buscar alternativas para suprimir la utilización de abonos nitrogenados en los cultivos de cereales y gramíneas, siendo esto uno de los mayores desafíos a nivel de investigación en la agricultura tropical. El estudio de la doble inoculación de bacterias y hongos micorrizas arbusculares (HMA) en estas familias de plantas es importante, ya que la interacción entre estos microorganismos puede darnos información que posibilite un uso menor de abonos fosfatados y nitrogenados y se obtenga una alta productividad. Los ensayos de doble inoculación se realizaron en invernadero de la Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária - IPA, donde las semillas de *Brachiaria decumbens* se esterilizaron, se pre-germinaron en bandeja con vermiculita hasta que la plántula alcanzó una altura de 20-25 cm y entonces las plántulas se transplantaron a vasos con capacidad de 10 kg de arena lavada. Todos los vasos contuvieron la misma solución de micronutrientes y los vasos testigo contuvieron además una cantidad equivalente a 200 kg/Ha de (sulfato amoníaco) + 100 kg/Ha de P₂O₅ (superfosfato simples) + 100 kg/Ha de K₂O (sulfato potásico). La adición del abono nitrogenado se hizo en tres veces, la primera cuando se transplantó la plántula y las dos siguientes con 15 días de intervalo. Se emplearon las estirpes bacterianas oriundas del Centro Nacional de Agrobiología de Rio de Janeiro: Sp7 (*Azospirillum brasilense*); S82 (*A. lipoferum*); M4 (*Herbaspirillum* sp). También se emplearon unos aislados obtenidos por nosotros, denominados: ISOL1-IPA, ISOL2-IPA, ISOL3-IPA, y oriundos de la Región de Zona da Mata del Estado de Pernambuco. La inoculación bacteriana se hizo con 5 ml de cultivo por planta/vaso del medio de crecimiento específico NFb (*Azospirillum*) y JNFb (*Herbaspirillum*) conteniendo 10⁸ células/ml. Para las especies de HMA se inocularon a 4 ml/planta/vaso de una mezcla de *Gigaspora margarita*, *Glomus etunicatum* y *Acalospora longula* conteniendo 50 esporos/ml de cada hongo. Las plantas se cosecharon a los 90 días después de la inoculación. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que con los diferentes tratamientos la altura de la planta (cm) no hubo diferencia estadística significativa entre los diferentes tratamientos, es decir, planta control con N y P, plantas inoculadas con bacterias diazotróficas y plantas inoculadas con HMA y bacterias. Porcentualmente, con la inoculación se obtuvo una altura mínima del 80% respecto a las plantas control (Ver ISOL 2-IPA en Tabla 1). Cuando el parámetro estudiado fue el índice foliar (cm²), los resultados obtenidos sí mostraron diferencias estadísticas significativas, aunque el testigo N y P presentó mejor comportamiento en relación a los demás tratamientos, esto tomando en cuenta la media general entre bacterias, con excepción del tratamiento con aislado ISOL2-IPA, que obtuvo un valor muy bajo y se diferenció estadísticamente entre los demás. Aunque los valores porcentuales fueran menores, con un índice foliar mínimo del

32% a respecto del control. Respecto a los valores obtenidos para el nitrógeno total en la parte aérea (mg/planta), estadísticamente no hubo diferencia entre los tratamientos. Sin embargo, porcentualmente se obtuvieran mejores resultados que con la inoculación doble, con la media general equivalente a 51% en relación al testigo N y P. Respecto a los valores obtenidos para el fósforo total en la parte aérea (mg/planta), estadísticamente no hubo diferencia entre los tratamientos. Sin embargo, porcentualmente se obtuvieran mejores resultados que con la inoculación simple, con la media general equivalente a 154% en relación al testigo N y P (Ver Tabla 2). Teniendo presente todos los resultados presentados arriba se concluyó que la inoculación suplió en parte la necesidad de añadir abonos de nitrógeno y fósforo a la planta. Además, la doble inoculación, bacteria-HMA, facilitó la absorción de nitrógeno y que la simple inoculación con bacterias diazotróficas facilitó la absorción de fósforo, por parte de la planta. Es conocido que la inoculación con HMA aumenta la absorción de fósforo, aunque este no fue nuestro caso, por tanto, sugerimos que los HMA no se adaptaron a las condiciones del experimento. Posiblemente por un antagonismo con las bacterias diazotróficas. Otro factor que puede estar influenciando es que la planta *Brachiaria decumbens* no tenga las características de una planta micotrófica, es decir, fácilmente infectable por hongos micorrizas arbusculares.

Tabla 1: Valores de altura de planta (cm) y índice foliar (cm²) en *Brachiaria decumbens* inoculadas con hongos micorrizas y bacterias diazotróficas

Tratamientos	Altura de planta			Índice foliar (cm ²)		
	Con FMA	Sin FMA	Mé ^{dia} general	Con FMA	Sin FMA	Mé ^{dia} general
Sp7	108,67 aA	94,33 aA	101,17 a	743,85 aA	266,73 aA	505,29 ab
S82	121,33 aA	97,67 aA	109,50 a	750,72 aA	315,63 aA	523,17 ab
M4	93,33 aA	108,33 aA	100,83 a	396,53 aA	579,44 aA	487,98 ab
ISOL1-IPA	104,67 aA	116,00 aA	110,33 a	500,56 aA	736,56 aA	616,60 ab
ISOL2-IPA	94,00 aA	90,33 aA	92,17 a	359,42 aA	263,29 aA	311,36 b
ISOL3-IPA	109,67 aA	104,00 aA	106,83 a	717,82 aA	518,82 aA	618,32 ab
Media general	105,86 A	102,95 A		629,95 A	519,61 A	
Testigo N y F (200-100 kg/ha)	110,00 aA			960,78 aA		
	C.V.(%) = 16,23 ; MDS _{bacteria(5%)} = 31,04; MDS _{bacteria/hongos (5%)} = 43,89; MDS _{hongos (5%)} = 10,72; MDS _{hongos/bacteria(5%)} = 28,37			C.V.(%) = 55,27 ; MDS _{bacteria(5%)} = 581,87 MDS _{bacteria/hongos (5%)} = 822,87 MDS _{hongos (5%)} = 201,03 MDS _{hongos/bacteria(5%)} = 531,87		

Tabla 2: Cantidad de nitrógeno y fósforo total en la parte aérea de *Brachiaria decumbens* inoculados con hongos micorrizas y bacterias diazotróficas

Tratamientos	Nitrógeno total (mg/pl)		Fósforo total (mg/pl)	
	Con FMA	Sin FMA	Con FMA	Sin FMA
Sp7	18,58	51,81	1,81	3,04
S82	25,08	45,73	3,84	4,25
M4	40,03	28,08	4,40	3,01
ISOL1-IPA	51,39	14,05	6,99	2,42
ISOL2-IPA	22,28	27,30	7,38	3,09
ISOL3-IPA	36,79	51,57	5,20	6,43
Media general	41,86 A	40,24 A	3,71 A	5,07 A
Testigo N y F (200-100 kg/ha)	81,56 A		3,28 A	
C.V (%)	15,95		48,42	

INTERACCIÓN ENTRE EL AUMENTO DE CO₂ ATMOSFÉRICO Y EL DÉFICIT DE PRESIÓN DE VAPOR EN EL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE ALFALFA FIJADORAS DE NITRÓGENO

De Luis Munárriz I., Irigoyen J.J. y Sánchez-Díaz M.

Departamento de Fisiología Vegetal, Facultades de Ciencias y Farmacia, Universidad de Navarra, 31008 Pamplona, jirigo@mail1.cti.unav.es

Introducción

Numerosas especies vegetales responden al aumento de CO₂ atmosférico con mayores tasas de crecimiento. Sin embargo, este comportamiento se puede ver modificado por la interacción con otros factores como: temperatura, nutrición mineral, déficit de presión de vapor (DPV), disponibilidad de agua, etc. (Kimball, 1986). Son escasos los estudios sobre la interacción entre el DPV y el aumento de CO₂ atmosférico (Wong, 1993), a pesar de que se conoce que la fotosíntesis neta de una hoja se puede ver afectada seriamente por el DPV de la atmósfera que le rodea (Bunce, 1993). En estudios previos con plantas de alfalfa (*Medicago sativa* L. cv. Aragón) inoculadas con *Rhizobium meliloti*, hemos podido comprobar que el aumento del CO₂ atmosférico estimula el crecimiento y la nodulación cuando crecen a alto DPV (1,74 kPa correspondiente a 45% de humedad relativa a 25°C) (De Luis y col., 1996). El objetivo del presente estudio ha sido investigar si la disminución del DPV afectara la respuesta de las plantas de alfalfa al CO₂ elevado.

Material y Métodos

Plantas de alfalfa en simbiosis con *Rhizobium meliloti* cepa 102F78 se cultivaron en una mezcla de perlita/vermiculita (2:1 en volumen), y crecieron en invernadero a 25/15°C día/noche, 14 h de fotoperíodo y 45% HR. Al mes de edad se separaron al azar en cuatro grupos: plantas crecidas en CO₂ elevado y alto DPV (1,74 kPa correspondiente al 45% de humedad relativa a 25°C) o bajo DPV (0,48 kPa correspondiente al 85% de humedad relativa a 25°C), y plantas en CO₂ ambiente y alto DPV (1,74 kPa correspondiente al 45% de humedad relativa a 25°C) o bajo DPV (0,48 kPa correspondiente al 85% de humedad relativa a 25°C). Los cuatro grupos de plantas se trasladaron a cámaras de crecimiento con las siguientes condiciones: 14 h de fotoperíodo, 600 $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (PAR), 45 u 85% HR, 25/15°C día/noche y CO₂ ambiente (alrededor 400 ppm) o CO₂ elevado (700 ppm). Al cabo de un mes en estas condiciones se hicieron las siguientes determinaciones: parámetros de crecimiento, transpiración específica y total, estado hídrico, contenidos foliares de clorofilas, azúcares solubles totales (AST), proteína soluble y almidón, así como contenido en nitrógeno y carbono.

Resultados

Contrariamente a lo observado en alto DPV (1,74 kPa), las plantas crecidas con 0,48 kPa no respondieron con un mayor crecimiento al aumento de CO₂ atmosférico. Los pesos secos totales y nodulares de estas plantas no variaron significativamente

respecto a los de las plantas crecidas a CO₂ ambiente. El área foliar aumentó pero no llegó a alcanzar los valores observados en las plantas crecidas con altos DPV y CO₂. A la misma conclusión se llega tras el estudio de los niveles totales de carbono y nitrógeno de las plantas. El aumento de CO₂ estimuló la fijación de carbono y de nitrógeno en un 58% y 75%, respectivamente, en condiciones de alto DPV, mientras que sólo se observaron aumentos del 10% y 29%, respectivamente, cuando se cultivaron a bajo DPV.

Las plantas crecidas en bajo DPV mostraron contenidos de proteína foliar significativamente menores, especialmente en el tratamiento con alto CO₂. No se observó acumulación de azúcares solubles totales en las hojas en ninguno de los tratamientos con CO₂ elevado. Contrariamente a lo observado con los azúcares, el almidón se acumuló en las hojas de las plantas crecidas en altos CO₂ y DPV. El aumento de CO₂ en ambos DPVs disminuyó significativamente la concentración de clorofilas expresadas por área foliar. Las plantas crecidas en alto CO₂ mostraron potenciales hídricos más bajos que las plantas de CO₂ ambiente. La transpiración específica disminuyó significativamente al aumentar el CO₂. La transpiración total se vió afectada por el DPV de crecimiento, siendo menor en las plantas crecidas a bajo DPV, y no se alteró con el aumento de CO₂.

Discusión y Conclusión

El aumento de CO₂ atmosférico estimuló el crecimiento de plantas de alfalfa en simbiosis con *Rhizobium* en condiciones de alto DPV; por el contrario, en bajo DPV el efecto no fue significativo. Tanto la capacidad fijadora de CO₂ de las hojas como la actividad nodular se vieron limitadas con bajo DPV. Es posible que la falta de un gradiente de vapor de agua adecuado entre la hoja y la atmósfera, a bajo DPV, limite la transpiración y, en consecuencia, la toma de agua y nutrientes, afectando por tanto al crecimiento. Esta limitación disminuiría la capacidad de los sumideros de la planta (hojas, raíces, nódulos, etc.), provocando una acumulación de almidón en los cloroplastos. Ello podría restringir física y químicamente la fijación de CO₂, así como la actividad nodular.

Del trabajo realizado se concluye que el crecimiento en condiciones de bajo déficit de presión de vapor anula los efectos positivos que tiene el aumento de CO₂ atmosférico sobre el crecimiento y la actividad nodular de las plantas de alfalfa.

Bibliografía

1. Kimball B.A. (1986). Carbon Dioxide Enrichment of Greenhouse Crops. Vol. II. CRC Press, Boca Raton, pp. 53-67.
2. Wong S-Ch. (1993). Vegetatio 104/105: 211-221.
3. Bunce J.A. (1993). Plant, Cell and Environment 16: 189-197.
4. De Luis Munárriz I., Irigoyen J.J., Sánchez-Díaz M. (1996). VII Reunión Nacional de Fijación de Nitrógeno (Salamanca), pp. 123-126.

NUTRICIÓN NITROGENADA EN EL RENDIMIENTO DE GUISANTE *SNAP-PEA*

Estomba O. y Arrese-Igor C.

Dpto. Ciencias del Medio Natural. Universidad Pública de Navarra. 31006 Pamplona. cesarai@upna.es

Introducción

El guisante *snap-pea*, a diferencia de las variedades tradicionales en las que la semilla (bien en fresco o en seco) es la parte aprovechable en alimentación, se utiliza por las vainas comestibles. Este tipo de variedades se caracterizan por presentar una pared de la vaina con un grosor considerable, estando este genotipo condicionado genéticamente por el gen *n* (Wehner y Gritton, 1981). Las vainas de guisante *snap-pea* carecen de pared apergaminada por la presencia de genes recesivos *ppvv* (Khvostova, 1983).

El cultivo de estas variedades fracasó inicialmente por diversas causas (dificultades del cultivo, valor comercial, etc.), pero ha vuelto a tener un cierto auge tras la introducción del cultivar Sugar snap y otros similares (Thorndyke, 1983) que presentan un alto contenido de azúcares en sus vainas (Basterrechea y Hicks, 1991). Actualmente, este cultivo está implantado con exclusividad en los Estados Unidos, pero su corto ciclo de desarrollo, permitiría su posible implantación como un segundo cultivo favorecido por las condiciones edafoclimáticas del valle medio del Ebro. Este estudio presenta datos preliminares sobre el crecimiento y rendimiento obtenidos con este cultivo en condiciones controladas, con distintas nutriciones nitrogenadas

Materiales y Métodos

Las plantas de guisante (*Pisum sativum* L. var. macrocarpon cv. Sugar boys) crecieron en invernadero con una solución nutritiva base descrita por Rigaud y Puppo (1983). Las plantas se dividieron en 5 tratamientos: (A) plantas fijadoras de nitrógeno, a las que se les inoculó con *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* NLV8, una cepa aislada de suelo navarro; (B) plantas reductoras de nitrato, a las que se les suministró nitrato 5 mM en forma de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, como única fuente de nitrógeno a lo largo del todo el periodo de crecimiento; (C) plantas suplementadas que fueron inoculadas y recibieron $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1 mM a lo largo del todo el periodo de crecimiento; (D) plantas fijadoras las que se les suministró $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1 mM durante el desarrollo de la plántula, para evitar una posible deficiencia de nitrógeno inicial y (E) plantas fijadoras las que se les suministró $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1 mM durante el desarrollo de la plántula y durante la formación de la vaina. En todos los casos, y para evitar posibles diferencias en cuanto a la salinidad del medio, se compensó la diferencia con CaSO_4 .

Para cada tratamiento se siguió el desarrollo de la planta y se determinó la fotosíntesis, mediante un Li-Cor 6200, al final del periodo vegetativo, cuando se realizó una primera cosecha de la que se determinó su rendimiento de biomasa. Una segunda cosecha se realizó cuando las vainas ya se habían formado. Los datos que se discuten son estadísticamente significativos en tests de mínima diferencia significativa protegida por el test de Fisher ($P < 0,05$).

Resultados y Discusión

Los primeros ensayos realizados en Europa con estas variedades, en condiciones de campo, sugerían que su capacidad de nodulación era muy escasa. Este hecho podía deberse a las prácticas agrícolas asociadas al cultivo, pero también podría estar relacionado con alteraciones en el metabolismo de carbono en este genotipo (ver Gordon *et al.*, 1998), por lo que en este primer estudio, en condiciones controladas,

se trató de determinar sus posibilidades en cuanto al establecimiento de una simbiosis efectiva y, en su caso, su rendimiento frente a la nutrición nítrica.

Los datos obtenidos tanto al final del periodo vegetativo (Tab. 1), como en el momento de la cosecha (Tab. 2) indican que, pese a los datos de campo, esta variedad tiene un buen potencial para nodular. Los datos obtenidos al final de estado vegetativo sugieren que las plantas fijadoras presentan una mayor área foliar específica que las plantas crecidas con nitrato y también se aprecia una tendencia a mayores tasas de fotosíntesis y mejor eficiencia en el uso del agua, datos consistentes con los obtenidos previamente con otras variedades de guisante (Frechilla, 1994). Sin embargo, estos datos no se tradujeron en una mayor biomasa, lo que sí se obtuvo cuando a las plantas fijadoras se les suplementó con 1 mM nitrato, bien sólo en el estado de plántula, como durante todo el periodo de desarrollo.

Tabla 1. Parámetros de plantas de guisante al final del periodo vegetativo: N° de nódulos (planta⁻¹); peso de nódulos (mg PS planta⁻¹); biomasa de la planta (g PS planta⁻¹); RPS, relación parte aérea/sistema radical (g g⁻¹), A, fotosíntesis neta (μmol CO₂ m⁻² s⁻¹); EUA, eficiencia en el uso del agua (mmol CO₂ mol H₂O); SLA, área específica foliar (m² kg⁻¹)

Tratamiento	N° nodul	Peso nod	PS planta	RPS	A	EUA	SLA
(A) fijadoras	257 a	85,2 a	1,69 a	2,33 b	12,5 a	3,3 ab	57,9 a
(B) nitrato			1,47 a	2,68 ab	9,7 ab	2,1 b	50, 6 b
(C) supl.	250 a	98,7 a	2,10 b	3,10 a	9,5 b	3,6 a	56,9 a
(D) compl.	228 a	87,2 a	2,31 a	2,87 ab	9,2 b	4,4 a	54,2 ab

En el momento de la cosecha (Tabla 2), no existió diferencia entre los distintos tratamientos en cuanto a masa nodular, biomasa vegetativa y distribución de la misma. Sin embargo, las plantas fijadoras y las suplementas solamente en el estado de plántula, presentaron mayores rendimientos en cuanto a número y biomasa de vainas que las reductoras de nitrato, mientras que las plantas suplementadas tuvieron un rendimiento intermedio. Estos datos resultan prometedores en cuanto a la eficiencia de la fijación de nitrógeno en esta variedad, tanto en cuanto al manejo agrícola de fertilización nitrogenada, como en cuanto a su relación con el metabolismo carbonado. El próximo objetivo es determinar cómo la nutrición nitrogenada afecta a la calidad de las vainas.

Tabla 2. Parámetros de plantas de guisante *snap-pea* en el momento de la cosecha: Columnas 1-4, como en la tabla 1; n° vainas (planta⁻¹), peso de vainas (g planta⁻¹)

Tratamiento	N° nodul	Peso nodulo	PS vegetat.	RPS	N° vainas	Peso vainas
(A) fijadoras	174 a	90 a	5,16 a	2,94 a	6,0 ab	9,43 a
(B) nitrato			5,31 a	2,75 a	5,25 b	6,53 b
(C) suplement	180 a	90 a	5,78 a	3,91 a	6,2 ab	8,69 ab
(D) complemen	156 a	80 a	5,36 a	3,34 a	6,1 ab	9,47 a
(E) complemen	162 a	120 a	6,11 a	2,88 a	6,6 a	8,52 ab

Agradecimientos.- Este trabajo está financiado a través del proyecto CICYT AGF97-0458.

Bibliografía

- Basterrechea M, Hicks JR (1991) Effect of maturity on carbohydrate changes in sugar snap pea pods during storage. *Scientia Horticulturae* 48: 1-8.
- Frechilla S (1994) Tesis Doctoral. Universidad Pública de Navarra.
- Gordon AJ, Skøt L, Webb KJ, Minchin FR, James CL, Wang TL, Hedley CL, Craig J, Smith AM (1998) Down regulation of nodule sucrose synthase by mutation and antisense. *In* Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century. Kluwer Academic Publishers.
- Khvostova VV (1983) Genetics and breeding of peas. Nanka Publishers. New Delhi.
- Rigaud J, Puppo A (1975) Indole-3-acetic catabolism by soybean bacteroids. *J. Gen. Microbiol.* 88: 223-228
- Thorndyke J (1983) The making of the sugar snap pea. *Horticulture* 61: 14-15
- Wehner TC, Gritton ET (1981) Effect of the *n* gene on pea pod characteristics. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 106: 181-186

INFLUENCIA DE LA ROTACIÓN CON LEGUMINOSAS EN EL RENDIMIENTO DE TRIGO BLANDO (*TRITICUM AESTIVUM* L.)

Lafarga A.¹, Azanza R.² y Arrese-Igor C.²

¹Instituto Técnico y de Gestión Agrícola. Crta. del Sadar s/n. 31006 Pamplona

²Dpto. Ciencias del Medio Natural. Universidad Pública de Navarra. 31006 Pamplona. cesarai@upna.es

Introducción

El incremento que viene experimentando el consumo de fertilizantes químicos en todo el mundo en los últimos años y, en particular, en el último decenio, constituye una prueba evidente del valor que se le reconoce como factor básico de la producción agrícola. En España, el cultivo de cereal es el de mayor extensión, con incidencia económica en casi todas las regiones. Para alcanzar el objetivo de mejorar rendimientos, se hace imprescindible mejorar las técnicas de cultivo y planificar una fertilización racional, tanto en las dosis como en el momento de aplicación. La utilización de rotaciones cereales-leguminosas puede cumplir el doble objetivo de aportar niveles adecuados de nitrógeno para los cultivos de cereales y enmarcarse dentro de las tendencias actuales de propiciar una agricultura más compatible con el entorno.

El presente estudio presenta datos preliminares sobre el efecto de una rotación guisante-trigo en la Cuenca de Pamplona, una zona netamente cerealista que se caracteriza por el práctico monocultivo de trigo.

Materiales y Métodos

Los ensayos se realizaron en parcelas situadas en el término municipal de Beriain (Navarra) en un suelo clasificado como CALCIXEROLLIC XEROCHREPT, familia esquelética, arcillosa, ilítica (caliza), profunda, con un horizonte superficial franco arcilloso, calizo.

Durante la campaña 94/95, las parcelas se sembraron con guisante forrajero (*Pisum sativum* L. cv. Gracia) o trigo blando de ciclo largo (*Triticum aestivum* L. cv. Marius). En el 2º año (Campaña 95/96), todas las parcelas se sembraron con trigo blando y se utilizaron 4 dosis distintas de abonado nitrogenado (120, 150, 180 y 210 UFN). Los abonados se realizaron en una primera cobertera (60 UFN, en todos los casos) coincidiendo con la mitad del ahijado (18.1.96). La segunda cobertera se aplicó el 26.3.96, al comienzo del encañado. El diseño del estudio fue de bloques al azar, con subparcelas de 8 líneas de 12 m de longitud, con una distancia entre líneas de 15 cm.

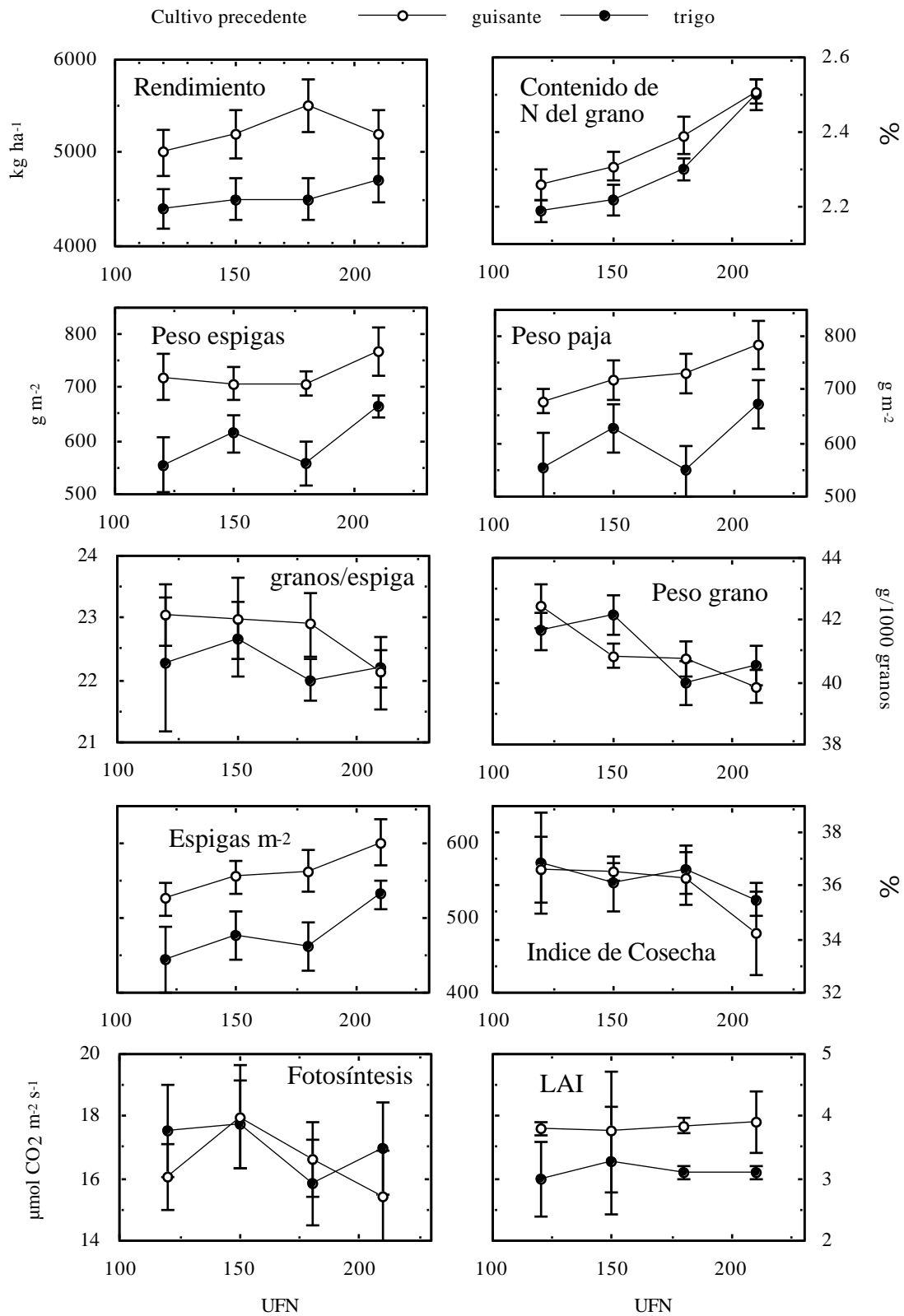
La medida de fotosíntesis se realizó con un equipo LI-6200, la determinación de índice de área foliar, mediante un equipo LAI-2000 y el contenido de nitrógeno se determinó mediante el método de Kjeldahl.

Resultados

La utilización de guisante forrajero en rotación con trigo, frente a la utilización de monocultivo de trigo, presentó rendimiento superior en el cultivo de trigo de la siguiente campaña; este superior rendimiento está relacionado más con un mayor desarrollo de la cubierta foliar, como consecuencia de un mayor ahijamiento, que con variaciones en la capacidad fotosintética de las plantas. Además, la utilización de la rotación tuvo como resultado un mayor contenido de nitrógeno en el grano, lo que se tradujo en una mejor calidad de la harina producida a partir de este grano.

Un estudio del balance económico integrado de ambas campañas (94/95 y 95/96), para la dosis de 180 UFN, indica una variación de beneficio entre ambas

posibilidades de sólo un 1% (78276 vs 77429 pta ha⁻¹ año⁻¹). Estas razones, permiten sugerir que la rotación puede resultar una alternativa interesante al monocultivo cerealista en esta comarca.



THE USE OF SEWAGE SLUDGE AS A FERTILIZER IN PASTURES: EFFECTS ON BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, USING THE ¹⁵N ISOTOPE DILUTION METHOD¹

Ferreira E.M., Castro I.V. and Carranca C.

Departamento de Microbiologia da EAN/EFN, Instituto Nacional de Investigação Agrária, Quinta do Marquês 2780 Oeiras, Portugal.

Tel +351- 1- 4416855, Fax +351-1- 4416011

Introduction

Land application of sewage sludge is an economical way of disposal, practised throughout the world. Its beneficial effects includes crop yield, soil physical characteristics (2, 6), organic matter content, cation exchange capacity and soil fertility (N and P). However it can contain materials potentially toxic to soil microorganisms, affecting their activity, including biological nitrogen fixation (BNF) by the *Rhizobium* - legume symbiosis (3, 4). To assess BNF of subclover growing in a mixed pasture fertilized with sewage sludge, a field experiment was set up.

Materials and Methods

A field experiment was carried out near Estação Agronómica Nacional (Oeiras, Portugal) on a calcareic cambisol (Table 1), using a complete randomized block design with 4 replicates, with the following rates of an irradiated (6.17 kGy) urban sewage sludge (Table 2): S1 - 5t ha⁻¹, S2 -10 t ha⁻¹, S3 - 20 t ha⁻¹, S4 -50 t ha⁻¹ and a control with a standard mineral fertilization (PK), equivalent to 300 kg of superphosphate (18 %-P₂O₅) ha⁻¹ and 60 kg of KCl (60%-K₂O) ha⁻¹. A mixture of *Trifolium subterraneum* cv. *Clare* (30 kg ha⁻¹) and *Lolium multiflorum* cv. *Prima* (20 kg ha⁻¹) was sown, the legume seeds being inoculated with a local selected *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain. 5% ¹⁵N atom excess NH₄NO₃ was applied as an uniform spray at the rate of 2 kg N ha⁻¹, one month after seedling emergency and after the first cut.

Results and Conclusions

The % of nitrogen derived from fixation (Ndffix) (fig.1) decreased when the rates of sludge increased. With mineral fertilization (PK) and S1, the % of Ndffix was significantly higher (5% probability) than the rates S3 and S4, for both cuts. The amount (kg ha⁻¹) of Ndffix (fig. 2) decreased with the increasing rates of sludge. In the first cut all treatments were similar. In the second cut, with the mineral fertilization the N fixed was significantly higher (5% probability) than all rates of sludge.

¹ This research was supported by IAEA, project 8486 and INIA

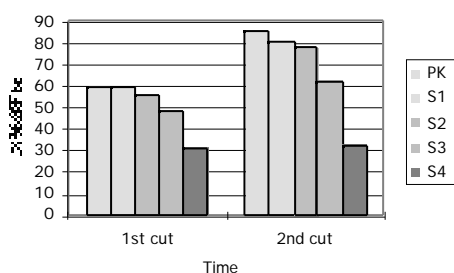


FIGURE 1. % N dffFix.

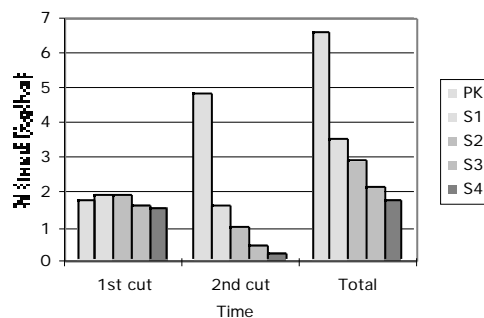


FIGURE 2. N fixed (kg/ha)

TABLE 1. Characteristics of the soil used for experiments

pH (H ₂ O)	7.2	*Al (g kg ⁻¹)	56.8
O.M. (g kg ⁻¹)	16.55	Cd (mg kg ⁻¹)	0.2
Total N (g kg ⁻¹)	1.13	Ca (g kg ⁻¹)	24.1
Organic C (g kg)	9.6	Cr (mg kg ⁻¹)	55.0
WHC (%)	38.7	Cu (mg kg ⁻¹)	15.0
Exch.Ca (cmol _(c) kg ⁻¹)	12.14	Fe (g kg ⁻¹)	37.6
Exch.Mg (cmol _(c) kg ⁻¹)	0.37	K (g kg ⁻¹)	23.0
Exch.K (cmol _(c) kg ⁻¹)	0.24	Mg (g kg ⁻¹)	6.4
Exch.Na (cmol _(c) kg ⁻¹)	0.25	Mn (mg kg ⁻¹)	181.0
CEC (cmol _(c) kg ⁻¹)	13.0	Pb (mg kg ⁻¹)	46.5
P ₂ O ₅ (mg kg ⁻¹)	384.5	Na (g kg ⁻¹)	7.6
K ₂ O(mg kg ⁻¹)	110.78	Ni (mg kg ⁻¹)	21.5

* All metals are totals recovered from HNO₃+HClO₄+HF digests.

TABLE 2. Characteristics of the sewage sludge

	Sludge sample	CEC limits (1)	Portugal limits (5)
pH (H ₂ O)	6.25		
O.M (%)	47.9		
Total N (%)	2.67		
Total P (%)	3.55		
*K (g kg ⁻¹)	1.01		
Na (g kg ⁻¹)	2.0		
Ca (g kg ⁻¹)	80.0		
Mg (g kg ⁻¹)	6.6		
Al (g kg ⁻¹)	13.5		
Fe (g kg ⁻¹)	106.6		
Co (mg kg ⁻¹)	13.0		
Mn (mg kg ⁻¹)	110.0		
Zn (mg kg ⁻¹)	1780.0	2500-4000	2500
Cr (mg kg ⁻¹)	64.0	1500-2500	1000
Ni (mg kg ⁻¹)	36.0	300-400	300

Pb (mg kg ⁻¹)	132.0	750-1200	750-1200
Cd (mg kg ⁻¹)	1.8	20-40	20-40
Cu (mg kg ⁻¹)	302.0	1000-1750	1000-1750

*All metals are totals recovered from aqua regia digests.

Literature Cited.

- (1) CEC. 1986 Official Journal of the European Communities, L181, Annex 1A, 10.
- (2) Epstein E., Taylor J. M. and Chaney R. L. 1976 J. Environ. Qual., 5: 422-426.
- (3) Giller K.E., McGrath S.P. and Hirsch P.R.. 1989 Soil Biol. Biochem., 21: 841-848.
- (4) McGrath S.P., Brookes P.C. and Giller, K.E. 1988 Soil Biol. Biochem., 20: 415-425.
- (5) Portaria n° 176/1996. D.R. n°230 (2ª série), 13789-13790.
- (6) Wei Q.F., Lowery B. and Peterson A. E. 1985 J. Environ. Qual., 14: 178-180.

Indice de autores

Acero N.....	157
Andrade D.S.....	161
Aparicio-Tejo P.M.....	83
Arrese-Igor C.....	83; 207; 209
Azanza R.....	209
Balland M.....	3
Barrientos M.L.....	157
Báscones E.	175
Becana M.....	77; 79; 81
Bedmar E.J.....	95; 119; 121; 123; 125
Bellogín R.A.	129; 199
Bisseling T.....	143
Blasco L.....	37
Blasco R.....	41
Bolaños L.....	61; 73
Bonilla I.....	61; 73; 99; 189; 195
Brewin N.J.....	141
Brito B.	111
Buendía-Clavería A.M.	103; 199
Bueno P.....	69
Burity H.A.....	203
Cabrera E.	111
Cabrerizo P.M.....	83
Camacho M.....	165; 185; 199; 201
Carnicero P.....	175
Carranca C.....	211
Carreres R.	169
Casas M. A.....	193
Castillo F.....	41
Castro I.V.....	187; 191; 211
Caviedes M.A.....	113
Cebolla A.....	3
Chamber Pérez M.A.....	145
Charon C.....	3
Coronado C.....	113
Corzo J.....	75; 181
Crespi M.....	3
Cubo T.....	129
Dary M.....	131
Day D.A.....	11
Daza A.....	165; 185; 199; 201
de Felipe M.R.....	53; 85; 193
De Luis Munárriz I.....	205
de Rudder K.E.E.	45
Delgado M.J.....	95; 119; 121; 123
D’Haeze W.....	49
Díaz Marrero A.R.....	181
Donaire J.P.....	69
Downie J.A.....	135
Drøbak B.K.	141
Ellis N.....	143
Epple G.	45
Escobar C.....	141
Espuny M.R.....	129; 199

Estomba O.....	207
Felle H.	3
Fernández-Alfonso C.....	175
Fernández-López M.	49
Fernández-Parra D.....	133
Fernández-Pascual M.....	85; 193
Fernández-Piñas F.....	189; 195
Fernández Valiente E.....	169
Ferreira E.M.....	187; 191; 211
Ferri A.....	57
Fillat M.F.....	37
Folch J. L.....	107
Foucher F.....	3
Frugier F.....	3
Gao M.....	49
García P.....	41
Geiger, O.	45
Geurts R.	143
Gil Serrano A.M.....	103
Gomis V.	179
González E.M.....	143
González-López J.....	197
Goormachtig S.....	49; 50
Guasch L.M.....	85; 193
Gutiérrez D.....	111
Gutiérrez Mañero F.J.....	157
Gutiérrez-Navarro A.M.....	75; 181
Hernández Hernández M.J.	181
Hernández L.E.....	141
Hernández M.J.....	53
Hernando Y.....	111
Hérouart D.....	53
Herrera-Cervera J.A.....	69; 173
Holsters M.....	49
Hualde I.....	67
Hungria M.....	161
Imperial J.	111; 133
Irigoyen J.J.....	205
Iturbe-Ormaetxe I.....	77
Jarabo Lorenzo A.....	65
Jimenez-Zurdo J.I.	3
Johansson C.....	3
Juárez B.....	197
Khadri M.....	87; 89; 91
Klipp W.....	41
Klucas R.V.....	81
Kondorosi A.....	3; 113
Kondorosi E.....	3
Koulikova O.....	143
Lafarga A.....	209
Lamrabet Y.	127; 129
Leganés F.....	169
León Barrios M.	65
Lira Jr. M.A.....	203
Lithgow J.....	135

Lloret J.....	99; 189; 195
Lluch C.....	57; 63; 87; 89; 91
López C.....	199
López-Lara I.M.....	45
Lorite M.J.....	123; 125
Lucas J.A.....	157
Lucas M.M.....	53
Lyra de M.C.C.P.....	203
Madinabeitia N.....	129
Manyani H.....	107
Marroquí S.....	107
Martín M.....	99; 189
Martínez M.....	111
Martínez E.....	57
Martínez-Abarca F.....	117; 149
Martínez-Luque M.....	41
Martínez-Molina E.....	153; 179; 183
Martínez-Toledo M.V.....	197
Matamoros M.A.....	77
Mateos P.....	153; 179; 183
McGrath S.P.....	187
Megías M.....	107; 127; 161
Mergaert P.....	3
Mesa Banqueri M.S.....	119
Minchin F.R.....	19
Mógica P.A.....	37
Moran J.F.....	81
Moreno J.....	103
Moussaid A.....	103
Muñoz S.....	71; 173
Muñoz E.....	117
Nogales J.....	71
Ocaña A.....	57; 63; 87; 89
Olivares J.....	69; 71; 139; 173
Oliveira A.....	191
Ollero F.J.....	103; 127; 129; 199
Orellana M.....	61
Orive R.....	201
Ortega E.....	63
Palacios J.M.....	111; 175
Palomares A.J.....	113; 131
Pampilha M.E.....	191
Peleato M.L.....	37
Peregrín Alvarez J.M.....	145
Pérez Galdona R.M.....	65
Pérez-Hormaeche J.....	113
Pliego L.....	87; 89; 91
Pozo C.....	197
Probanza A.....	157
Pueyo J.J.....	85
Puppo A.....	53
Quesada A.....	169
Ramos B.....	157
Ratet P.....	113
Razquin P.....	37

Redondo M.....	61
Rey L.....	111
Rivas A.....	183
Rivilla R.....	99; 189; 195
Rodelas B.....	135
Rodríguez-Llorente I.D.	113
Rodríguez-Navarro D.N.....	165; 185; 199; 201
Rodríguez-Rosales P.....	69
Röhrs V.....	45
Roldós J.....	193
Roudier F.....	3
Royuela M.....	67
Rubio C.....	193
Rubio M.C.....	79
Ruiz Sainz J.E.....	103
Ruiz-Argüeso T.....	111; 133; 175
Ruíz-Sainz J.E.	103; 127; 129; 185
Sáez L.....	41
Salmerón V.....	197
Sánchez Contreras M.....	189; 195
Sánchez-Díaz M.....	205
Sanjuán J.....	69; 71; 125; 139; 173
Sanjuán-Pinilla J.M.....	139; 173
Santamaría C.....	165; 185; 199; 201
Santamaría M.....	75; 181
Sarath G.....	81
Schultze M.....	3
Segundo E.....	149
Soto M.J.....	137; 149
Sousa C.....	3; 107
Soussi M.....	87; 89; 91
Souza E.	203
Staehelin C.....	3
Sun Z.....	81
Tejera N. A.....	63
Temprano F.....	129; 165; 185; 199; 201
Toffanin A.....	133
Toro N.	117; 137; 149
Ucha A.....	169
Van de Sype G.....	53
van Dillewijn P.....	137; 149
Van Montagu M.....	49
Vance C.P.	27
Vargas M.A.T.....	161
Vega Hernández M.C.....	65
Velasco L.....	95; 121
Velázquez E.....	153; 179; 183
Villacieros M.	189; 195
Villadas P.....	137
Vinardell J.M.....	127
Wall L.G.....	61
Wilkinson A.....	135
Wisniewski-Dyé F.....	135
Xu C-A.....	123
Zekri S.	117

