

An. R. Acad. Nac. Farm., 2006, 72: 423-442

Revisiones

Factores estructurales, bioquímicos y moleculares de la simbiosis *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*)-*Lupinus*

Recibido el 11 de septiembre de 2006

M. R. DE FELIPE ANTÓN¹, M. FERNÁNDEZ-PASCUAL,
M. M. LUCAS SÁNCHEZ, E. FEDOROVA*, M. P. GOLVANO
HERRERO*, A. GONZÁLEZ SAMA*, L. GUASCH PEREIRA*,
C. DE LORENZO CARRETERO*, N. DE MARÍA DE LA HERAS*,
J. M. POZUELO GUANCHE*, J. J. PUEYO DABAD*,
A. VIVO RODRÍGUEZ*

* Autores en orden alfabético.

*Instituto de Recursos Naturales. Centro de Ciencias
Medioambientales del C.S.I.C. Madrid*

RESUMEN

La presente revisión es un resumen de algunos trabajos originales realizados en nuestro Departamento para el estudio de diferentes aspectos de esta peculiar simbiosis, siempre integrando estructura y función. La primera parte está dedicada a un estudio estructural llevado a cabo con el fin de conocer los mecanismos de infección, que difieren de la mayoría de las leguminosas estudiadas. Para este fin se aplicaron técnicas de inmunofluorescencia con la *green fluorescent protein* (GFP), técnicas de inmunocitoquímica y de hibridación *in situ*. Mediante estos estudios se ha observado que la infección se realiza por vía intercelular. Junto al estudio estructural se describen algunos componentes enzimáticos del nódulo, MAPKinasas (Mitogen-activated protein kinase) y aldehído oxidasa, presentes en estadios tempranos del reconocimiento bacteria-planta. Ambos enzimas están relacionados con la mitosis y la multiplicación de las células radicales.

¹ Email de contacto: mr.defelipe@hotmail.com

La segunda parte se refiere a los mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares que regulan la simbiosis, especialmente los relacionados con la regulación de oxígeno en el nódulo, de gran importancia para la fijación de N_2 , ya que la nitrógenasa necesita una atmósfera microaeróbica para fijar nitrógeno. Se describen algunos mecanismos de regulación, como la leghemoglobina y la barrera de resistencia a la difusión de O_2 . Por último también se incluye el estudio genético que realizamos para conocer los genes que regulan la difusión de O_2 en el nódulo: *lenod 2*, *leghemoglobin* y *nifH*.

Palabras clave: Aldehído oxidasa.—Barrera de resistencia a la difusión de oxígeno.—Fijación biológica de nitrógeno.—Leghemoglobina.—Lupino.—MAPKinasas.—Proceso de infección.—Regulación de oxígeno.

SUMMARY

Structural, biochemical and molecular factors of the symbiosis *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*)-*Lupinus*

The present revision summarises some of the original works carried out in our Department to study different aspects of the peculiar symbiosis *Bradyrhizobium* sp. *Lupinus*, by integrating structure and function. The first part of the revision is focused to a structural study on the infection mechanisms, since differ of other legumes. This study was realized by applying immunofluorescent techniques with the *green fluorescent protein*, immunocytochemistry and different microscopies. It could be observed that the infection by the *Bradyrhizobium* follows the intercellular way. The infection study includes the presence of enzymatic components, as MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinase) and aldehyde oxidase in the first steps of the symbiosis. Both enzymes are very much related with auxins and cell multiplication.

The second part takes up the physiological, biochemical and genetic mechanisms that regulates nitrogen fixation, specially those related to oxygen diffusion, since nitrogenase activity is very sensible to oxygen and needs a microaerobic atmosphere for its function. Between these mechanisms, the leghemoglobine and the oxygen-diffusion resistance barrier have been considered the more important in oxygen regulation. Finally it is included the results of a genetic study carried out to know the genes implicated in nodule oxygen diffusion as: *lenod 2*, *leghemoglobin* and *nifH*.

Key words: Aldehyde oxidase.—Biological nitrogen fixation.—Infection process.—Leghemoglobin.—Lupin plants.—MAPKinases.—Oxygen regulation.—Oxygen diffusion barrier.

1. INTRODUCCIÓN: FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO

La Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) aporta la mayor parte del nitrógeno fijado a los ecosistemas terrestres. Se estima que apro-

ximadamente 100 especies de leguminosas agrícolamente importantes contribuyen anualmente con casi la mitad del nitrógeno fijado biológicamente. La FBN representa una alternativa a la fertilización nitrogenada y está restringida a organismos procariontes, capaces de reducir el nitrógeno molecular a amoníaco, tanto en vida libre como en simbiosis. Este proceso que hermana a las leguminosas con las bacterias, estableciendo un diálogo entre los dos simbioses, constituye una de las biotecnologías más sorprendentes y excepcionales, por su gran repercusión en los sectores sanitario, agroalimentario y ecológico.

El enzima responsable de la fijación de nitrógeno, la nitrogenasa, que reduce el nitrógeno atmosférico a amonio, es muy sensible al oxígeno. Algunos autores opinan que la simbiosis entre las leguminosas y las bacterias de la familia *Rhizobiaceae* existía ya antes de que el oxígeno existiera en la tierra y ésta puede ser la causa de las condiciones de anaerobiosis, que requiere este proceso.

Desde 1985 nuestro grupo de investigación viene trabajando en Fijación Biológica de Nitrógeno, concretamente en la simbiosis *Bradyrhizobium*-sp. (*Lupinus*)-*Lupinus*, que tiene características propias que la diferencian de otras simbiosis *Rhizobium*-leguminosa.

2. EL LUPINO (*LUPINUS*)

El lupino o altramuz (Figura 1) es una de las leguminosas de mayor interés ecológico y agronómico, por ser una de las que más N fija en el suelo, repercutiendo muy positivamente sobre la agricultura y el medio ambiente, constituyendo una de las mayores promesas de la agricultura sostenible. En trabajos anteriores se ha demostrado que esta simbiosis es especialmente sensible a estreses abióticos como nitrato (1), salinidad (2) y determinados herbicidas (3, 4). Su capacidad de crecer en suelos contaminados con metales pesados permite considerarla como una potencial planta fitorremediadora (5, 6).

Las especies del género *Lupinus* establecen simbiosis con bacterias del género *Bradyrhizobium*, bacteria de crecimiento lento, en el cual sólo hay una especie definida: *Bradyrhizobium japonicum*. El resto de las especies se nombran con el nombre del género seguido

de la especie de leguminosa que nodulan. En el caso de *Lupinus: Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*).

El nódulo de lupino, aunque de carácter indeterminado, presenta características propias, constituyendo el tipo denominado lupinoide (Figura 2). Sus características estructurales han sido ampliamente estudiadas por nuestro grupo de investigación (7).

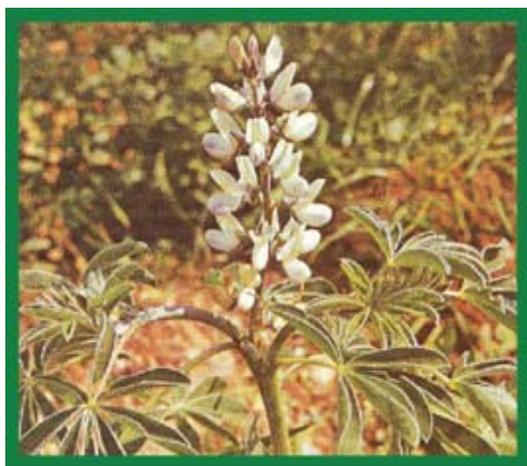


FIGURA 1. *Planta de Lupinus albus* cv. *Multolupa* en floración. Finca La Higuera, Santa Olalla. Toledo.

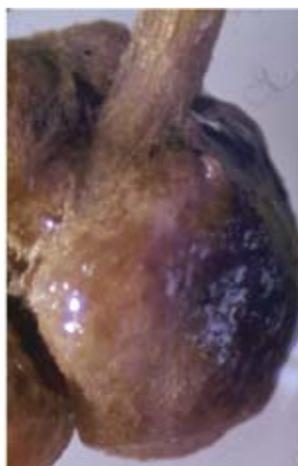


FIGURA 2. *Nódulos de Lupinus albus*.

2.1. Factores estructurales:

Proceso de infección *Bradyrhizobium-Lupinus*

El proceso tiene características propias, desconocidas hasta estudios recientes realizados por el Doctor González Sama en su Tesis Doctoral (8). Mediante la combinación de diferentes microscopías y técnicas relacionadas, como microscopía de fluorescencia, láser confocal, microscopía electrónica de transmisión y barrido y técnicas de inmunomarcado de bacterias especialmente con la proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*), se ha observado que se trata de un proceso de infección peculiar diferente al resto de las leguminosas, que exponemos a continuación:

2.1.1. Colonización e infección de las células corticales por *Bradyrhizobium*

Las raíces de *Lupinus* excretan sustancias de tipo flavonoide que atraen al *Bradyrhizobium* a la rizosfera, adhiriéndose a la superficie externa de los pelos radiculares. Unos días después de la inoculación, las bacterias se encuentran inmersas en una masa mucilaginosa rica en glicoproteínas excretadas por las raíces, identificadas por el anticuerpo monoclonal MAC 265 (9). A continuación los rizobios proliferan en la zona de contacto entre los pelos radiculares y las células epidérmicas, donde tendrá lugar la entrada de las bacterias a las células corticales de la raíz. La infección se realiza por vía intercelular y la invasión ocurre de manera localizada en una única célula situada bajo un pelo radical (Figura 3). Las primeras divisiones de las células de la corteza externa tienen lugar a continuación. La invasión de la célula cortical localizada debajo del pelo radical se produce a través de regiones de la pared celular alteradas estructuralmente (Figura 3B). No se han observado canales de infección.

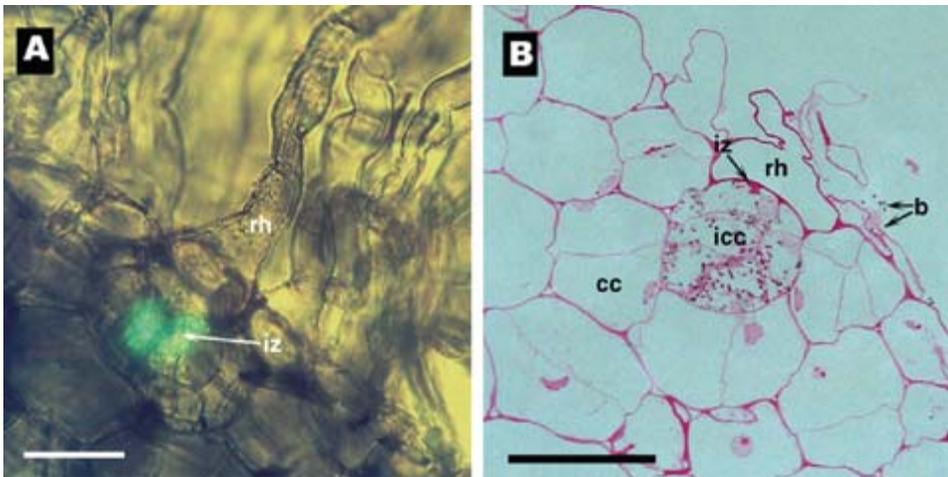


FIGURA 3. **Infección e inicio de la nodulación en raíces de *Lupinus albus*, seis días después de la inoculación.** **A)** Microfografía de fluorescencia mostrando el inicio de la infección por *Mesorhizobium loti* marcado con GFP, en célula bajo el pelo radical. **B)** Microfografía en campo claro mostrando el primordio nodular con células corticales y células infectadas (bacterias inmunomarcadas en negro) en división; b, bacterias; cc, células corticales; icc, células infectadas; iz, zona de infección; rh, pelo radical. Barra: A, 100 μm ; B, 20 μm .

2.1.2. *Formación del primordio nodular*

La célula cortical infectada se divide repetidamente dando varias células hijas, donde se distribuyen las bacterias (Figura 3B). Las células de alrededor no infectadas se dividen simultáneamente. En una fase más avanzada el primordio nodular presenta dos zonas claramente diferenciadas: zona central, que dará lugar a la zona infectada del nódulo y contiene únicamente células infectadas en diferentes estadios de división y zona cortical, que presenta células no infectadas en división que darán lugar a la corteza del nódulo. Ambas zonas constituyen el nódulo de lupino. En cada ciclo de división se produce una reorganización intracelular de los rizobios y un reparto aparentemente equitativo entre las células hijas. Los rizobios se sitúan de manera que no interfieran en la división celular (8, 9).

La división de las células infectadas constituye una originalidad del nódulo de lupino que le diferencia de la mayoría de los nódulos estudiados. En las etapas tempranas del desarrollo, el nódulo crece en todas direcciones adquiriendo una forma esférica, que recuerda a los nódulos determinados. Conforme el nódulo madura, la zona meristemática queda circunscrita a la región basal-lateral y el nódulo continúa creciendo, pudiendo rodear completamente a la raíz, momento en que cesa su desarrollo (Figura 2).

2.1.3. *Activación de MAPKs en la infección *Bradyrhizobium* sp *Lupinus**

En el proceso de reconocimiento entre los dos simbioses intervienen señales relacionadas con el ciclo celular, ya que inmediatamente se iniciará una multiplicación celular en la corteza de la raíz para alojar al *Bradyrhizobium*. Las MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*) están implicadas en la regulación del ciclo celular, en la acción hormonal (auxinas) y en la respuesta de la planta a diversos estreses y patógenos.

Nuestros estudios han constatado que las MAPKs pueden mediar en los procesos de infección por rizobios. La inoculación de *L. albus* con *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) activa transitoriamente SIMK (Salt stress-inducible MAPK) y SAMK (stress-activated MAPK). La inocu-

lación de raíces con bacterias muertas de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) o con *Sinorhizobium meliloti*, bacteria incapaz de nodular *Lupinus*, no tiene efecto en la activación de SIMK y SAMK (10).

Estos datos indican que la activación de estos enzimas es una respuesta específica de las células de la leguminosa a la presencia de una bacteria potencialmente simbiótica, y por tanto puede conducir a una interacción simbiótica positiva. La utilización de inhibidores específicos de MAPKs produce un retraso en la nodulación, lo que sugiere que estas quinasas intervienen en procesos tempranos de la infección.

2.1.4. Presencia de aldehído oxidasa en el primordio nodular

Las auxinas (fitohormonas) actúan en la organogénesis de los nódulos de leguminosas, aunque su papel no es totalmente conocido. Sin embargo, recientemente hemos demostrado, por primera vez, la presencia de un enzima de la síntesis de ácido indol acético (AIA) en nódulos, y por tanto la potencial capacidad de síntesis de esta hormona. El enzima aldehído oxidasa (AO) interviene en la última etapa de la síntesis del ácido abscísico (ABA) y del ácido indol acético (AIA) vía indol-3-pirúvico.

Los nódulos de *L. albus*, inducidos por cepas de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*), poseen tres isoenzimas de AO. Sin embargo, los nódulos Fix^- , de crecimiento restringido y senescencia prematura, inducidos por una cepa de *Mesorhizobium loti*, no parecen poseer AOs activas. Mediante el inmunomarcado de los tejidos con anticuerpos que reconocen AOs nodulares, se estudió la localización del enzima, por microscopía electrónica de transmisión, de fluorescencia y microscopía láser confocal. La proteína, que es citoplasmática, se localiza preferentemente en la zona meristemática lateral de los nódulos de altramuz (11), constituida por células no infectadas e infectadas en división (Figura 4). El análisis de expresión de AO mediante RT-PCR demostró que la expresión más alta se produce en el primordio nodular y la más baja en nódulos Fix^- . Los estudios de hibridación *in situ* mostraron un patrón de expresión altamente consistente con la distribución de la proteína. Además el patrón de inmunolocalización de AIA fue semejante al encontrado para AO.

Por el contrario, el inmunomarcado de ABA en los nódulos reveló que los niveles de esta hormona eran bajos y homogéneos en todas las zonas del nódulo. Estos resultados indican la capacidad de síntesis local de AIA en la zona meristemática del nódulo de altramu, así como la posible implicación de AO en la organogénesis nodular y en la autorregulación del crecimiento y el desarrollo de los nódulos.

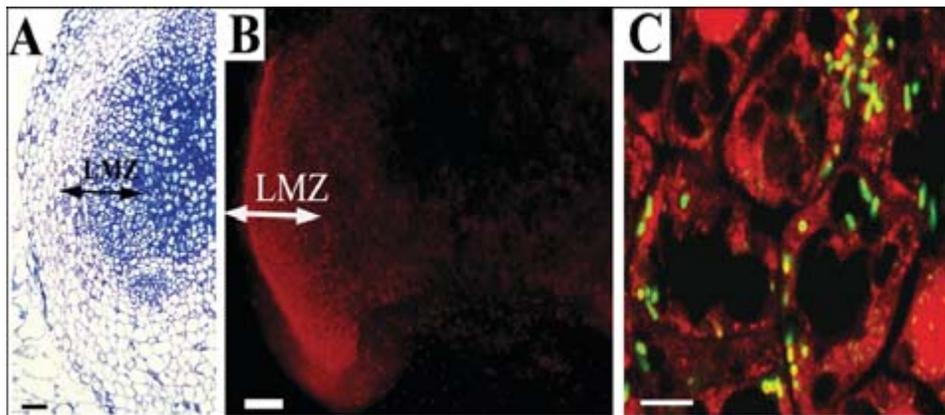


FIGURA 4. **Localización de aldehído oxidasa.** A) Fotografía de campo claro mostrando zona meristemática lateral (LMZ). B) Imagen de microscopía láser confocal de localización de aldehído oxidasa, en LMZ. C) Detalle de B, mostrando localización de aldehído oxidasa en células infectadas con bacterias con fluorescencia en verde. Barra: A y B, 100 μm ; C, 10 μm .

2.1.5. Estructura del nódulo de lupino

La Figura 5 muestra un nódulo de lupino al microscopio óptico (7). Está formado por una corteza externa (CE) de células alargadas más o menos isodiamétricas, una corteza media (CM) de células irregulares de mayor tamaño y de paredes engrosadas, una corteza interna (CI) y una zona central que corresponde a la zona infectada (ZI). Los haces vasculares por los que se comunica el nódulo con la raíz se sitúan en la corteza interna. La zona central está formada por células infectadas únicamente. En las células infectadas, las bacterias se transforman en bacteroides, rodeándose de una membrana de origen vegetal, la llamada membrana peribacteroidal. La unidad fijadora de nitrógeno o *simbiosoma*, está constituida por uno o más bacteroides separados del citosol por la membrana peribacteroidal.

Junto a los bacteroides se encuentran orgánulos subcelulares como amiloplastos, mitocondrias y peroxisomas. A su vez los bacteroides observados al microscopio electrónico son de tipo multiforme, contienen reservas de polihidroxy butirato y polifosfato. Pero su principal característica es su capacidad para fijar nitrógeno, gracias a que poseen el enzima nitrogenasa que transforma el nitrógeno atmosférico en amoníaco y posteriormente por acción de los enzimas glutamino sintetasa (GS), glutamato glutamina 2-oxiglutarato amino transferas (GOGAT) y glutamato deshidrogenasa (GDH), el amoníaco se transforma en aminoácidos y éstos en amidas que son transportadas a la parte aérea de la planta.

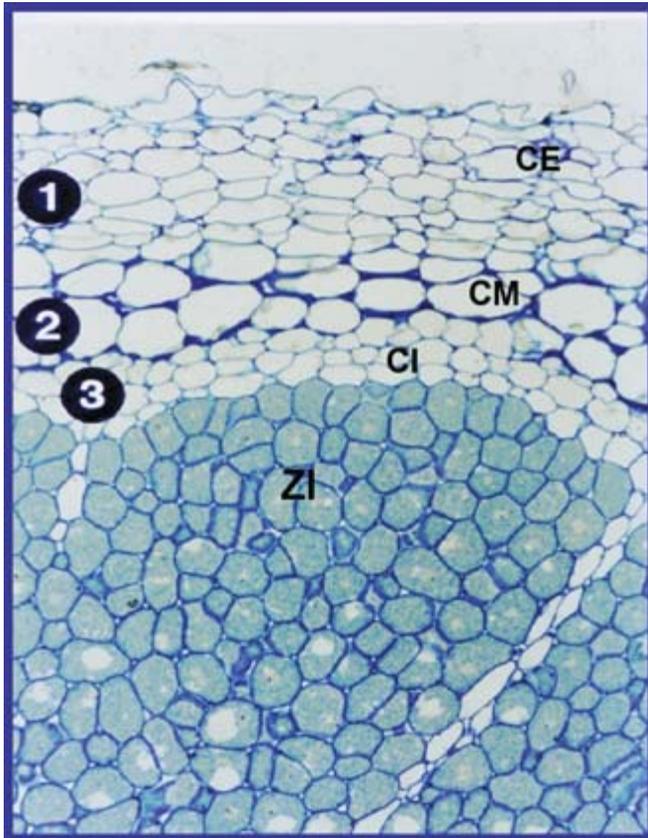


FIGURA 5. *Estructura del nódulo de Lupinus albus* incluido en LR white y teñido con toluidina. ZI, zona infectada; CI (1), Corteza interna; CM (2), Corteza media; CE (3), Corteza externa.

3. FACTORES FISIOLÓGICOS BIOQUÍMICOS Y GENÉTICOS DE LA SIMBIOSIS *BRADYRHIZOBIUM-LUPINUS*

3.1. Regulación de la concentración de oxígeno en los nódulos

El enzima nitrogenasa, responsable de la fijación de nitrógeno, es inactivada por el oxígeno. La concentración de oxígeno debe estar limitada en el interior del nódulo, para lo cual la planta cuenta con varios mecanismos de regulación.

3.1.1. *Leghemoglobina (Lh) (hemoglobina de las plantas)*

La leghemoglobina es la proteína mayoritaria del nódulo, cuya función es transportar oxígeno a los bacteroides, transformada en oxileghemoglobina. Se cree que a su síntesis contribuyen ambos simbiosiontes, bacteria y planta, y aparece cuando el nódulo está formado morfológicamente. Se la denomina *nodulina tardía* por expresarse después del desarrollo morfológico del nódulo. Su presencia es imprescindible para que la fijación de nitrógeno pueda realizarse. Para cumplir esta función el Fe del grupo hemo debe estar en forma reducida (Fe^{2+}), existiendo reductasas en el nódulo para controlar la oxidación.

Por el importante papel que juega esta proteína, su localización fue motivo de estudio por diversos laboratorios, siendo los resultados muy diferentes y contradictorios mediante técnicas bioquímicas. Nuestro grupo abordó la localización inmuocitoquímica de la Lh.

3.1.2. *Localización de la Lh por técnicas inmunocitoquímicas*

La proteína se extrajo a partir del extracto de nódulos de lupino y una vez purificada se obtuvieron los anticuerpos policlonales, haciendo una caracterización posterior de las inmunoglobulinas. Se obtuvo un anticuerpo primario con un título muy alto, de gran especificidad. La localización se realizó con un anticuerpo secundario cabra-anticonejo, unido a oro coloidal (12).

La Figura 6 muestra la localización de Lh en las células infectadas. En la figura se muestra la localización en el citosol y en la membrana peribacteroidal (PBM) de los bacteroides de *Bradyrhizobium*. Estos resultados contradecían resultados anteriores sobre la localización de la Lh en el espacio peribacteroidal (PBS).

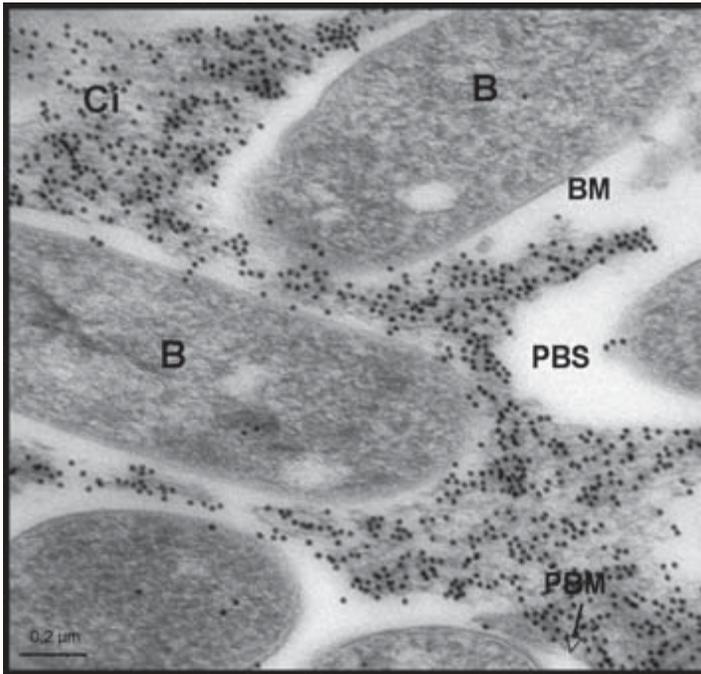


FIGURA 6. **Localización de leghemoglobina.** Sección ultrafina de células infectadas inmunomarcada con anti-leghemoglobina de lupino. B, bacteroid; Ci, citosol; PBM, membrana peribacteroidal, PBS, espacio peribacteroidal.

La localización *in situ* de la Lh representó un importante descubrimiento para conocer la regulación de oxígeno en el nódulo. El oxígeno transportado desde la superficie del nódulo a través de los espacios intercelulares de la corteza, llega a la zona infectada y en la interfase corteza/zona infectada es atrapado por la leghemoglobina que transformada en oxileghemoglobina, libera el oxígeno paulatinamente a los bacteroides, desde la membrana peribacteroidal a la membrana bacteroidal (BM), donde se encuentra la cadena respiratoria.

3.1.3. *Ultraestructura del simbiosoma*

El hecho de no existir leghemoglobina en el espacio peribacteroidal (PBS), conducía a la hipótesis de la existencia de un transportador enzimático, un transportador de oxígeno en el espacio peribacteroidal, que transportara el oxígeno desde la PBM a la BM. También nos planteamos que el PBS fuera un artefacto, observado por técnicas convencionales. Por lo que era de interés estudiar la estructura del simbiosoma por técnicas que pusieran de relieve su estructura real.

La técnica «High Pressure Freezing» (HPF) cumple este requisito, permite la preservación de los tejidos y es el único método hasta el momento actual, capaz de crioinmovilizar hasta 500 μm de tejido en estado nativo (13). Nuestro objetivo fue comparar la estructura de nódulos de *Lupinus albus* observada por procesamiento convencional con la obtenida por HPF.

Los resultados obtenidos mostraron claramente que la membrana peribacteroidal está en estrecho contacto con la membrana bacteroidal (Figura 7), dejando un espacio peribacteroidal muy reducido entre ambas membranas (14). El estrecho espacio peribacteroidal aparece como una matriz densa a los electrones, lo que está de acuerdo con la posible existencia de enzimas y proteínas en este pequeño espacio (15).

El O_2 es liberado por la leghemoglobina, desde la membrana peribacteroidal directamente a la membrana bacteroidal y a los bacteroides. Un estrecho intercambio de nutrientes y metabolitos entre ambos simbiosomas, planta y bacteria, puede tener lugar con normalidad entre ambas membranas.

La técnica HPF constituye la técnica apropiada para estudiar aspectos funcionales en el desarrollo de los nódulos como el proceso de formación del simbiosoma, y a profundizar desde su origen en la relación estructura-función de este orgánulo subcelular, existente únicamente en leguminosas.

3.1.4. Barrera de resistencia a la difusión de oxígeno

Constituye otro de los mecanismos de regulación de oxígeno en los nódulos de leguminosas (7). El uso de un microelectrodo de oxígeno para seguir su concentración desde la superficie al interior del nódulo, da como resultado una disminución drástica a partir de la corteza media, lo que parece indicar que esta estructura regula el acceso de O_2 a la zona central del nódulo donde se encuentran los bacteroides.

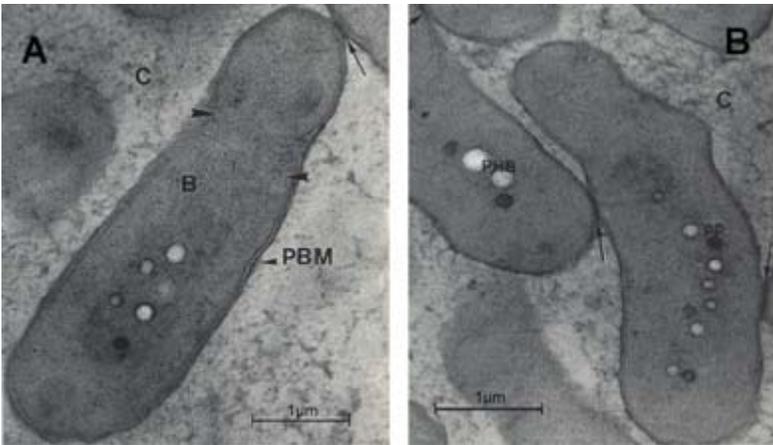


FIGURA 7. **Microfotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de nódulos de *Lupinus albus* tratados con HPF.** A) Detalle de bacteroides mostrando la membrana peribacteroid estrechamente unida al bacteroide. B) Puntos de contacto entre bacteroides. B, bacteroids; C, citosol; PBM, membrana peribacteroidal; PBS, espacio peribacteroidal; PHB, polihidroxibutirato; PP, polifosfato.

La corteza media del nódulo de *Lupinus albus* (Figura 8) está formada por dos o tres capas de células de mayor tamaño que las de la corteza externa e interna, con grandes espacios intercelulares y paredes engrosadas. La tinción con Ácido periódico-Base de Schiff, usada rutinariamente para la localización de hidratos de carbono, muestra una tinción intensa de las paredes celulares de la corteza media y de la matriz de los espacios intercelulares, lo que indica su constitución hidrocarbonada.

Con el fin de conocer exactamente la naturaleza hidrocarbonada de la matriz de los espacios intercelulares, aplicamos técnicas inmu-

nocitoquímicas con los anticuerpos monoclonales MAC 265 y MAC 236, que habían localizado *in situ* una glicoproteína de guisante en los canales y gotas de infección (16).

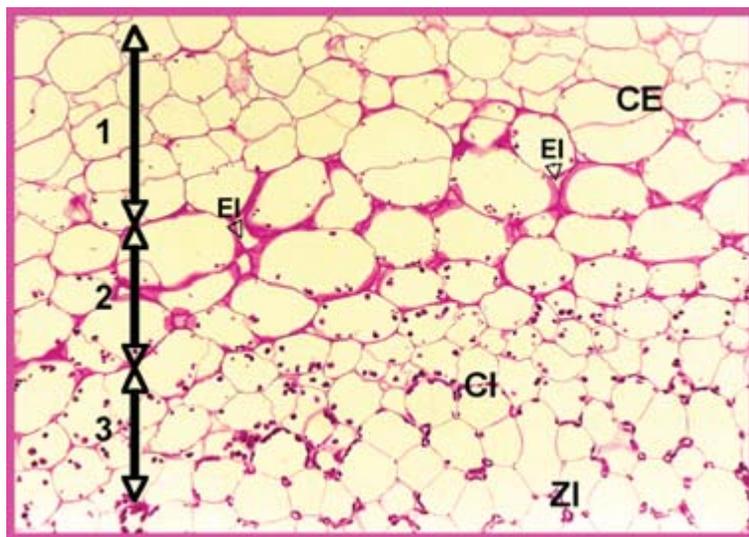


FIGURA 8. Zona de la corteza nódulo de *Lupinus albus* mostrando la barrera de resistencia a la difusión de oxígeno. Sección radial. CE, corteza externa (1), Corteza media (2). X 300, Corteza interna (3). EI, espacio intercelular; ZI, zona infectada.

También ambos anticuerpos habían reaccionado con una única banda de 95 kDa en extractos solubles de guisante mediante electroforesis desnaturizante e inmunoblotting, obteniendo los mismos resultados en extractos de judía y soja (16) y en especies de los géneros *Vicia* y *Lathyrus* (17). Sin embargo en extractos de *Lupinus albus* el anticuerpo MAC 236 reconoció una banda de 240 kDa, mientras que el MAC 265 reconoció una única banda de 135 kDa (1, 18). Los resultados sugirieron que en lupino los dos epítomos pueden pertenecer a dos glicoproteínas estrechamente relacionadas, pero con funciones diferentes. Nuestro objetivo se centró en determinar estas funciones en la regulación de oxígeno y en su localización en la corteza media del nódulo.

La Figura 9 muestra la localización del antígeno MAC 236 en los espacios intercelulares de las células de la corteza media del nódulo

de lupino mediante microscopía óptica y electrónica. Para conocer el comportamiento de la corteza media como posible barrera de resistencia a la difusión de oxígeno, comparamos la localización inmunocitoquímica en plantas crecidas en condiciones normales y en presencia de nitrato. La localización fue mayor en el último caso, lo que parece indicar que la glicoproteína está relacionada íntimamente con la operación de la barrera aumentando o disminuyendo su contenido y en consecuencia abriendo o cerrando el flujo de oxígeno a la zona infectada.

En condiciones de estrés (nitrato, oscuridad, salinidad, etc.) las glicoproteínas aumentan en los espacios intercelulares, cerrando la posibilidad al oxígeno de difundir a la zona infectada (3, 18). De este modo, la barrera es capaz de ajustar la resistencia a la difusión de O_2 , de acuerdo a las condiciones ambientales de crecimiento de las plantas.

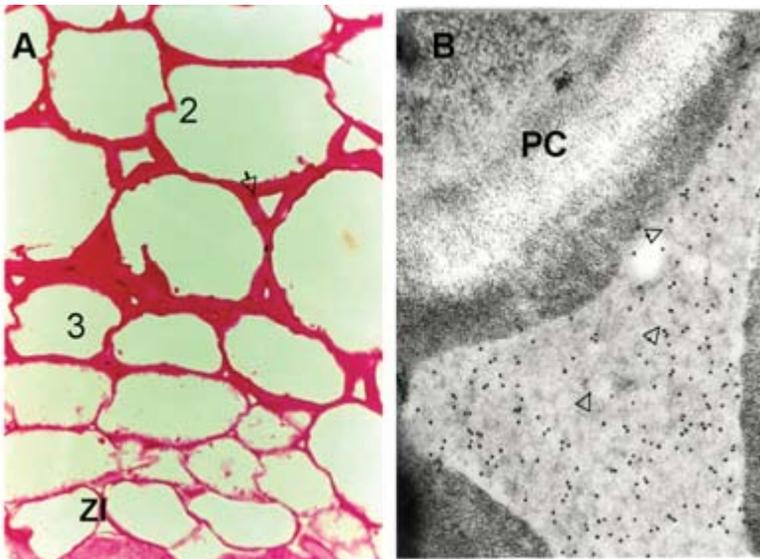


FIGURA 9. **Inmunolocalización de la glicoproteína** reconocida por el anticuerpo monoclonal MAC 236 en nódulos de altramuza al microscopio óptico (A) y electrónico (B). A) Corteza externa (1), corteza media (2) y corteza interna (3). x 200. B) Espacio intercelular de zona 2. x 43.900. CI, células infectadas; PC, pared celular.

Los trabajos llevados a cabo para el estudio de la identificación y operación de la barrera de resistencia a la difusión de O_2 han sido realizados en colaboración con el Doctor Frank Minchin (Aberystwyth, País de Gales, U.K.). De los dos epítomos estudiados, MAC 236 y MAC 265, el primero parece estar relacionado con el desarrollo del nódulo y situaciones de estrés de la planta, de ahí su papel en el funcionamiento de la barrera de difusión de oxígeno, regulando su concentración en la zona infectada. Por el contrario, el epítomo MAC 265, apenas se encuentra localizado en la matriz intercelular y creemos que está principalmente asociado a los primeros estadios de la infección del *Bradyrhizobium* (19) y su concentración no cambia con la edad de la planta.

Así pues, en esta simbiosis las glicoproteínas parecen tener un papel relevante en las primeras etapas de interacción entre los dos simbiosistas. También este estudio nos ha permitido observar estructuras nodulares (1), que se encuentran adheridas a las paredes celulares de los espacios intercelulares de las células de la barrera morfológica, conteniendo también glicoproteínas y que pudieran actuar como reservorios a lo largo del desarrollo del nódulo.

3.1.5. *Expresión de genes implicados en la regulación de oxígeno*

Para constatar estructuralmente si la limitación de oxígeno en el nódulo es la causa principal de la inhibición de la fijación de nitrógeno, aplicamos diferentes concentraciones de oxígeno por debajo y por encima de la presión atmosférica: 1% y 40% de oxígeno (20, 21). Este estudio fue complementado con la expresión de los genes relacionados con la difusión de O_2 : *enod2*, *leghemoglobina* y *nifH*, dado el desconocimiento de las bases moleculares de la barrera de resistencia a la difusión de oxígeno.

La expresión del gen *enod 2* en nódulos de lupino (*lenod 2*) fue llevada a cabo en colaboración con el Doctor Bisseling (Universidad de Wageningen, Holanda). La aplicación de técnicas de Northern Blot e Hibridación *in situ* con la sonda de un fragmento de *lenod 2* de *Lupinus luteus*, cedida por el Doctor Legocki de la Universidad de Poznan (Polonia), sirvieron para demostrar la influencia del oxígeno en la expresión del gen (20). Para la hibridación la sonda fue mar-

cada con digoxigenina y para la detección se aplicaron anticuerpos antidigoxigenina unidos a fosfatasa alcalina o bien sonda marcada radiactivamente.

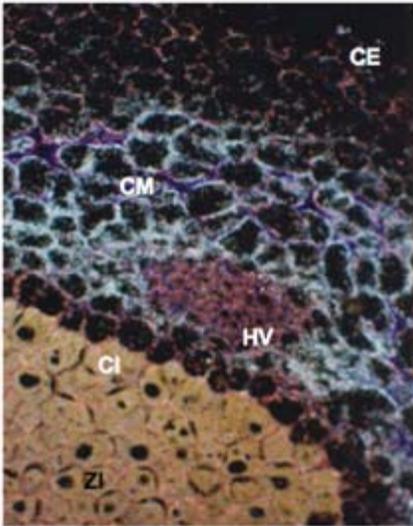


FIGURA 10. **Hibridación in situ (RNA-RNA)** con sonda de *lenod 2* marcada con S^{35} y revelada con emulsión fotográfica. Nódulos incluidos en Paraplast. ZI, zona infectada.

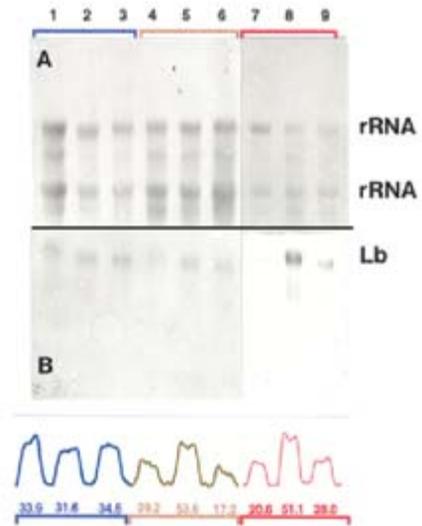


FIGURA 11. **Expresión de la leghemoglobina de lupino mediante Northern-blot.** A) Tinción del RNA total con Azul de Metileno.

B) Hibridación de la misma membrana con la sonda de *LbI* marcada con Digoxigenina. Revelado con anticuerpos unidos a fosfatasa alcalina. 1) 1% O_2 1 día. 2) 21% O_2 1 día. 3) 40% O_2 1 día. 4) 1% O_2 3 días. 5) 21% O_2 3 días. 6) 40% O_2 3 días. 7) 1% O_2 10 días. 8) 21% O_2 10 días. 9) 40% O_2 10 días. 10 mg de RNA total. Se incluye el perfil densitométrico de los inmunoblots.

La Figura 10 muestra la localización del gen *lenod 2* usando sonda radioactiva y digoxigenina, respectivamente, en una sección longitudinal del nódulo de lupino. Como puede observarse, la localización coincide con el parénquima o corteza media donde se sitúa la barrera de resistencia al O_2 . La localización es muy específica, no en-

contrándose en otras estructuras del nódulo y varía con la concentración de oxígeno aplicada. Estos resultados apuntan a que el gen *lenod 2* podría estar implicado en la formación de la barrera morfológica de resistencia a la difusión de O_2 (20).

La expresión de *lenod 2* comienza a detectarse trece días después de la inoculación, antes de la aparición de la nitrogenasa, por lo que puede considerarse como nodulina temprana. Con respecto a la expresión de genes implicados en la regulación de la difusión de O_2 , el notable incremento del contenido del mensajero del gen *enod 2* con la aplicación de 40% O_2 al sistema radicular durante tres días coincide con el aumento de la resistencia mínima, lo que parece confirmar su papel en la difusión de oxígeno a medio plazo, mientras que a más largo plazo los cambios bioquímicos y genéticos ceden el protagonismo a los estructurales. El mensajero de leghemoglobina desciende de forma apreciable a partir del tercer día de aplicación de oxígeno (Figura 11), lo que está en concordancia con el papel regulador de la misma en el bloqueo de la difusión facilitada. Mientras que la expresión de *nifH*, perteneciente al simbionte, no se ve alterada por los tratamientos aplicados. Esto demuestra la capacidad de adaptación de los nódulos de lupino a altas concentraciones de O_2 , debido a la sucesión de modificaciones fisiológicas, bioquímicas y estructurales producidas en los mecanismos de difusión de O_2 dentro del nódulo.

4. CONSIDERACIONES FINALES

A pesar de los estudios científicos realizados, dirigidos a paliar el hambre que padece gran parte de la población mundial, sin embargo poco se ha conseguido para cambiar esta triste realidad. Cerca de 190 millones de personas, un tercio de la población de África, son susceptibles de carecer definitivamente de alimentos. En la presente revisión hemos pretendido resaltar el interés de las interacciones planta microorganismo, como alternativa al uso de fertilizantes químicos, demasiado costosos para los pequeños agricultores de países en desarrollo. Estas biotecnologías constituyen una alternativa al uso de agroquímicos y fitosanitarios y convenientemente aplicadas pueden repercutir en la mejor calidad de las cosechas y en el aumento de la productividad.

En este sentido el reto de extender la simbiosis a plantas no leguminosas, como maíz y arroz, cultivos básicos en países subdesarrollados que dependen únicamente de estos monocultivos, parece en la actualidad difícil de conseguir. Para ello es preciso un conocimiento más profundo de las interacciones planta microorganismo, y especialmente exige un estudio minucioso de las características fisiológicas y genéticas de la planta permitiendo la entrada de la bacteria. Nuestro interés en seguir estudiando la simbiosis *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*)-*Lupinus* tiene este objetivo, ya que al tratarse de una simbiosis muy particular, que no sigue el patrón general de las leguminosas, podría ayudar a conocer cómo se pueden establecer simbiosis en plantas alejadas de las leguminosas, como los cereales.

5. BIBLIOGRAFÍA

- (1) DE LORENZO, C.; IANNETTA, P. P. M.; FERNÁNDEZ-PASCUAL, M.; JAMES, E. K.; LUCAS, M. M.; SPRENT, J. I.; WITTY, J. F.; MINCHIN, F. R. and DE FELIPE, M. R. (1993): Oxygen diffusion in lupin nodules. II. Mechanisms of diffusion barrier operation. *J. Exp. Bot.* 44: 1469-1474.
- (2) FERNÁNDEZ-PASCUAL, M.; DE LORENZO, C.; DE FELIPE, M. R.; RAJALAKSHMI, S.; GORDON, A. J.; THOMAS, B. J. and MINCHIN, F. R. (1996): Possible reasons for relative salt stress tolerance in nodules of white lupin cv. *Multolupa*. *J. Exp. Bot.* 47: 1709-1716.
- (3) DE MARÍA, N. (2004): Efecto del glifosato sobre la simbiosis *Lupinus albus-Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.
- (4) DE MARÍA, N.; BECERRIL, J. M.; GARCÍA-PLAZAOLA, J. I.; HERNÁNDEZ, A.; DE FELIPE, M. R. and FERNÁNDEZ-PASCUAL, M. (2006): New Insights on Glyphosate Mode of Action in Nodular Metabolism: The Role of Shikimate Accumulation. *J. Agricul. Food Chem.* 54: 2621-2628.
- (5) ZORNOZA, P.; VÁZQUEZ, S.; ESTEBAN, E.; FERNÁNDEZ-PASCUAL, M. and CARPENA, R. (2002): Cd-stress in nodulated white lupin: Strategies to avoid toxicity. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 1003-1009.
- (6) PASTOR, J.; HERNÁNDEZ, A. J.; PRIETO, N. and FERNÁNDEZ-PASCUAL, M. (2003): Accumulating behaviour of *Lupinus albus* l. growing in a normal and a decalcified calcic luvisol polluted with Zn. *J. Plant Physiol.* 160: 1457-1465.
- (7) DE LORENZO, C. (1992): Efecto de la aplicación de nitrato sobre la barrera de resistencia a la difusión de oxígeno y sobre el metabolismo de especies tóxicas de oxígeno en nódulos de lupino. Tesis Doctoral.
- (8) GONZÁLEZ-SAMA, A. (2003): Procesos iniciales del establecimiento de la simbiosis *Lupinus albus-Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias (Sección Biológicas). Universidad Autónoma de Madrid.

- (9) GONZÁLEZ-SAMA, A.; LUCAS, M. M.; DE FELIPE, M. R. and PUEYO, J. J. (2004): An unusual infection mechanism and nodule morphogenesis in white lupin (*Lupinus albus*). *New Phytol.* 163: 371-380.
- (10) FERNÁNDEZ-PASCUAL, M.; LUCAS, M. M.; DE FELIPE, M. R.; BOSCA, L.; HIRT, H. and GOLVANO, M. P. (2006): Involvement of Mitogen-activated Protein Kinases in the Symbiosis *Bradyrhizobium-Lupinus*. *J. Exp. Bot.* 57: 2735-2742.
- (11) FEDOROVA, E.; REDONDO, F. J.; KOSHIBA, T.; DE FELIPE, M. R.; PUEYO, J. J. and LUCAS, M. M. (2005): Aldehyde oxidase (AO) in the root nodules of *Lupinus albus* *Medicago truncatula*: Identification of AO in meristematic and infection zones. *Mol. Plant. Micro. Interact.* 18: 405-413.
- (12) VIVO, A.; ANDREU, J. M.; DE LA VIÑA, S. and DE FELIPE, M. R. (1989): Leghaemoglobin in lupin plants (*Lupinus albus* L. cv. Multolupa). *Plant Physiol.* 90: 452-457.
- (13) STUDER, D.; HENNECKE, H. and MÜLLER, M. (1992): High-pressure freezing of soybean nodules leads to an improved preservation of ultrastructure. *Planta.* 188: 155-163.
- (14) DE FELIPE, M. R.; LUCAS, M. M.; LECHAIRE, J. P.; NICOLAS, G.; FERNÁNDEZ-PASCUAL, M. and POZUELO, J. P. (1997): Comparative study of two cryotechniques to elucidate real functional aspects of legume nodules development. *J. Plant. Physiol.* 150: 428-436.
- (15) KATINAKIS, P.; KLEIN LAKHORST, R. M.; LOUWERSE, J.; VAN KAMMEN, A. and VAN DEN BOSCH, R. C. (1988): Bacteroid-encoded proteins are secreted into the peribacteroid space by *Rhizobium leguminosarum*. *Plant Mol. Biol.* 11: 183-190.
- (16) VANDEN BOSCH, K. A.; BRADLEY, D. J.; KNOX, J. P.; PEROTTO, S.; BUTVHER, G. W. and BREWIN, N. J. (1989): Common components of the infection thread matrix and the intercellular space identify by immunochemical analysis of pea nodules and uninfected roots. *EMBO J.* 8: 967-978.
- (17) POZUELO, J. M.; FERNÁNDEZ-PASCUAL, M.; DE LORENZO, C.; MOLINA, C. y DE FELIPE, M. R. (1993): Estudios comparativos de fijación Biológica de nitrógeno en tres leguminosas de zonas áridas o semiáridas. X Reunión Nacional de la SEFV. *III Congreso Hispano-Portugués de Fisiología Vegetal*. Pamplona.
- (18) IANNETTA, P. P. M.; DE LORENZO, C.; JAMES, E. K.; FERNÁNDEZ-PASCUAL, M.; SPRENT, J. I.; LUCAS, M. M.; WITTY, J. F.; DE FELIPE, M. R. and MINCHIN, F. R. (1993): Oxygen diffusion in lupin nodules. I. Visualization of diffusion barrier operation. *J. Exp. Bot.* 44: 1461-1467.
- (19) DE LORENZO, C.; FERNÁNDEZ-PASCUAL, M. and DE FELIPE, M. R. (1998): Subcellular localization of glycoprotein epitopes during the development of lupin root nodules. *Protoplasma.* 201: 71-84.
- (20) GUASCH, L. M. (1998): Factores estructurales fisiológicos y genéticos en la regulación de la difusión de oxígeno en nódulos de *Lupinus albus* L, cv. Multolupa, Tesis Doctoral ETSIA. Madrid.
- (21) GUASCH, L. M.; DE FELIPE, M. R. and FERNÁNDEZ-PASCUAL, M. (2001): Effects of different concentrations on nitrogenase activity, respiration and O₂ diffusion resistance in *Lupinus albus* L. cv. Multolupa nodules. *J. Plant Physiol.* 158: 1395-1402.