03062

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Unidad Académica de los Ciclos
Profesionales y de Posgrado del C.C.H.

SECUENCIA NUCLEOTIDICA DE LA REGION DE NODULACION DE *Rhizobium phaseoli*-CE3.

T E S I S.
Que para obtener el título de
MAESTRA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA
p r e s e n t a

Araceli Elvira Dávalos Rodríguez.

México, D.F 1990.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

RESUMEN	1-2
INTRODUCCION	3-37
ANTECEDENTES	38
OBJETIVO	39
MATERIAL Y METODOS	40-43
RESULTADOS	44-50
DISCUSION	51-57
FIGURAS	58-79
BIBLIOGRAFIA	80-82

RESUMEN.

Se obtuvo la secuencia nucleotídica de una región del plásmido simbiótico de **Rhizobium leguminosarum** biovar **phaseoli-CE3** involucrada en el desarrollo del nódulo en frijol.

Se identificaron cuatro fases abiertas de lectura (ORF's) en esta región. Una comparación de los ORF's con un banco de bacterias reveló que, los dos ultimos ORF's tienen alta homología con **nodB** y **nodC** de otras cepas de **Rhizobium** y los dos ORF's presentes hacia el 5' de estos genes, no tienen homología con el gen **nodA**. La expresión de los genes **nodABC** en otros **Rhizobium** es necesaria para la formación del nódulo, por lo que nosotros sugerimos que el gen **nodA** de **R. phaseoli-CE3** pudiera estar presente en otra región. La posible función de los ORF's hacia arriba de **nodBC** se desconoce, posibles estrategias para conocer su funcion son discutidas.

Una secuencia involucrada en la regulación del operon **nod**, esta presente hacia el 5' de los cuatro ORF's . La presencia de esta región sugiere un papel clave en su regulación. Los genes **nodB** y **nodC** están separados por 103 pb, no se encontraron secuencias promotoras consenso de **Escherichia coli** o de **Rhizobium**, ni terminadores en esta región intergénica. La aparente cercania y la carencia de terminadores o promotores intergénicos sugiere que los cuatro ORF's presentes en **R. phaseoli-CE3** constituyen un operón.

Análisis de perfiles de hidrofobicidad de los cuatro ORF's indican que los productos del **ORF-1**, del **ORF-2** y de **nodB** carecen de regiones altamente hidrofóbicas por lo que es posible que estos polipéptidos se encuentren en el citoplasma de **Rhizobium phaseoli-CE3**, por el contrario la región amino terminal y la region carboxi-terminal del producto de **nodC** son altamente hidrofóbicos, sugiriendo que este polipeptido esta asociado a la membrana de **Rhizobium phaseoli-CE3**.

Hibridizaciones DNA-DNA de los cuatro ORFs contra genomas de la cepa silvestre indicaron que cada uno de ellos está presente en una sola copia.

INTRODUCCION.

La fijación biológica del nitrógeno atmosférico (la conversión de nitrógeno molecular a amonio.) ocurre en plantas leguminosas y no leguminosas cuando estas se asocian en simbiosis con bacterias del género **Rhizobium**,**Bradyrhizobium** y **Azorhizobium**. Una característica importante de esta simbiosis es que exhibe especificidad, es decir que leguminosas particulares son infectadas únicamente por un rango limitado de cepas de **Rhizobium** (71),(figura 1)

La manifestación macroscópica de ésta asociación simbiótica, es el desarrollo de un órgano vegetal: el nódulo, donde finalmente la fijación del nitrógeno ocurre. La formación de ésta estructura es un proceso complejo que involucra (71):

1. La presencia de la bacteria sobre la superficie de la raíz.
2. Enroscamiento de los pelos radiculares
3. División de las células vegetales.
4. Formación de un hilo de infección.
5. Penetración de la bacteria a la corteza vegetal através del hilo de infección.
6. Diferenciación de la bacteria a bacteroide y
7. Fijación del nitrógeno.

La única planta no Leguminosa capáz de asociarse con bacterias fijadoras del nitrógeno, es **Parasponia**. El mecanismo de infección

que ocurre en ésta interacción difiere del de las leguminosas. El primer evento que se observa, es la división celular de una zona de la raíz que es altamente suceptible a infección. La división celular produce entonces un rompimiento en la epidermis por donde la bacteria puede entrar a la raíz. El microsimbionte es retenido en una especie de hilo de infección modificado, llamado hilo de fijación, y es en este lugar donde la fijación del nitrógeno se lleva a cabo (5).

GENETICA DE RHIZOBIUM

El desarrollo del nódulo y la fijación del nitrógeno son procesos que requieren la expresión coordinada tanto de genes vegetales como de genes bacterianos.

Genes bacterianos.

La mayoria de las cepas de **Rhizobium** se caracterizan por la presencia de plásmidos de alto peso molecular (31). La transferencia de éstos plásmidos a cepas de **Agrobacterium** ó a cepas de **Rhizobium** carentes de plásmidos han indicado que los genes bacterianos que participan en el desarrollo del nódulo se localizan en ellos (31). Estos plásmidos se han denominado plásmidos simbióticos (psym).

La génetica de los genes bacterianos, ha sido estudiada en más detalle en **Rhizobium meliloti** (**R.meliloti**) **Rhizobium leguminosarum** biovar **viceae** (**R.leguminosarum**), **Rhizobium leguminosarum** biovar **trifolii** (**R. trifolii**) y **Bradyrhizobium**.

Algunas evidencias géneticas sugieren que dos tipos de funciones están involucradas en los pasos iniciales del desarrollo del nódulo (31).

1. Funciones generales que determinan : la deformación de la raíz, la formación del hilo de infección y la penetración de la bacteria a las células vegetales.

2. Funciones específicas, que determinan la capacidad ó la incapacidad de **Rhizobia** a inducir nodulación sobre un huésped determinado

Estos dos tipos de funciones están codificadas por dos grupos de genes (36).

1. Genes **nod** comunes: Son genes involucrados en las primeras etapas del desarrollo del nódulo y se caracterizan por ser intercambiables entre las diferentes cepas de **Rhizobium**.

2. Genes **hsn**: Son genes que intervienen en la especificidad de infección por **Rhizobium** en un huésped determinado y se caracterizan por no ser intercambiables entre las diferentes cepas de **Rhizobium**.

genes nod comunes.

Se han definido cinco genes **nod** comunes (**nodABCIJ**) por experimentos que involucran ; mutaciones inducidas por inserción de transposones (52),por deleciones,por complementación de funciones y por análisis de la secuencia nucleotídica (16,52,62,70), Estos genes se encuentran agrupados en una pequeña región del plásmido

simbiótico y se encuentran preferencialmente cerca de los genes nif (genes involucrados en la fijación del nitrógeno).

El fenotipo de las mutaciones en los genes **nodABC** es la inhibición del enroscamiento de los pelos radiculares y el de las mutaciones en los genes **nodIJ** solo causan retardo en la nodulación.

nodA.

Los sistemas de transcripción y traducción in vitro y los análisis de la secuencia nucleotídica, detectan que **nodA** codifica para un polipéptido de 21Kd (16,70). Es probable, que la proteína codificada por éste gen esté en el citoplasma de **Rhizobium**. Una evidencia que apoya ésta localización viene de experimentos de nodulación, en los cuales **R. meliloti** se inoculó com anticuerpos dirigidos contra NodA: No se observó diferencia en el número de nódulos con respecto al experimento control (60). Si embargo, parece que el producto de nodA está también asociado con la parte interior de la envoltura celular. Una evidencia que apoya esta localización viene de técnicas inmunológicas con oro coloidal para la localización celular de los productos de los genes de nodulación (35). Todos estos datos, van de acuerdo con los experimentos de Egelgoff y Long (17), los cuales localizan a la proteína de **nodA** tanto en la membrana como en fracciones solubles de cepas productoras de NodA de **R. meliloti**. La asociación de NodA a la envoltura celular podría deberse a la presencia de las regiones hidrofóbicas localizadas en ésta proteina (70). De todos éstos datos, se

sugiere que la proteína de **nodA**, se asocia con la parte interior de la envoltura celular después de traducirse en el citoplasma (35).

Finalmente, se ha sugerido que la proteína de **nodA** está involucrada en los pasos iniciales del desarrollo del nódulo (70) pero parece ser que también juega un papel importante durante los últimos pasos del desarrollo del mismo, puesto que se ha detectado en nódulos maduros de alfalfa (60).

nodB.

Se ha mostrado previamente que éste gen codifica para una proteína de 23.8 Kd (16,70), y que se encuentra localizada en el citosol de **R. meliloti** (61).

La proteína de **nodB** se sintetiza en cantidades más bajas con respecto al nivel de síntesis que se observa para el producto del gen **nodA** (61). Las secuencias nucleotídicas de los genes **nodABC** de **R. meliloti** (70) y **R. trifolii** (62), revelan que la secuencia ATGA traslapa el codón de terminación del gen **nodA** con el codón de iniciación del gen **nodB**. Schmidt y colbs (61), proponen que el sobrelape de la secuencia terminadora y de la secuencia iniciadodora de la traducción inducen un acoplamiento traduccional de los dos genes. Este mecanismo de regulación, podría servir para coordinar la expresión de ambos genes y tal véz sea la forma de asegurar que las dos proteínas se sinteticen en cantidades apropiadas. Otra evidencia, que podría apoyar la baja síntesis de **nodB**, es que el tetranucleótido GGAG que representa un sitio potencial de unión a ribosoma (Secuencias Shine Dalgarno) para el

gen **nodB**, cae dentro de la región codificadora de **nodA** y está separado del codón de iniciación (ATG) por únicamente 3 pb (61). Se ha reportado que el espacio entre la secuencia Shine-Dalgarno y el codón ATG afecta la cantidad de proteína sintetizada (2).

Los productos de los genes **nodAB**, parecen estar involucrados en la producción de factores difusibles termostables y tal véz glicosilados que estimulan a bajas concentraciones la mitosis de protoplastos vegetales. Se ha propuesto por las características de estos compuestos, que éstas substancias son parecidas a las citocininas (61).

La secuencias de aminoácidos deducida de las secuencias nucleotídicas de los genes **nodAB** de **R.leguminosarum** (52) y de **R. meliloti**(70) indican que existe una homología del 71% para el gen **nodA** y 65% de homología para **nodB** entre ambas especies. Una comparación de los productos de los genes **nodAB** de **R. trifolii** (62) contra los mismos genes de **R .leguminosarum, R. meliloti** y **Bradyrhizobium** revela una homología del 70-80% entre pares de especies (58).

nodC.

El gen **nodC**, es el más conservado entre los **Rhizobia** (48). Se encontró una homología del 70% al comparar la secuencia de aminoácidos de éste gen entre varias cepas de **Rhizobium** (58,70).

Diversas evidencias sugieren que el producto del gen nodC se encuentra asociado a membrana y que éste polipéptido se

transporta del interior al exterior de la célula (28,29,64):

1) La cantidad de NodC se reduce al tratar células de **R. meliloti** con proteasas.
2) NodC reacciona con lactoperoxidasas, las cuáles marcan proteínas que están expuestas sobre la superficie celular
3) Disminución en el número de nódulos cuando cepas silvestres de **Rhizobium** se coinoculan con anticuerpos dirigidos contra NodC en su planta huésped y
4) Análisis de la secuencia nucleotídica.

Estudios en los que se utilizaron fusiones entre nodC y el represor C1 del fago lambda permitieron localizar el dominio involucrado en el anclaje de NodC a la membrana. El fragmento responsable y suficiente para el anclaje de ésta proteína a membrana, es el segmento hidrofóbico cercano al carboxilo de la proteína (33). Del análisis de estos experimentos, se dedujo que el extremo amino terminal de NodC está expuesto al medio extracelular (33).

Estudios de entrecruzamiento de proteínas de membrana sugieren que la proteína de **nodC** existe en la membrana como dímero (33). De éstos últimos resultados John y colbs (33) proponen la siguiente estructura para la proteina NodC:

La proteina contine un segmento hidrofóbico de aproximadamente 65 residuos de aminoácidos cercano al extremo carboxi terminal el cual ancla la proteína a la membrana. Este dominio separa un dominio extracelular de aproximadamente 295 residuos de aminoácidos de un dominio carboxi terminal intracelular de 45 residuos de aminoácidos. Con este modelo es posible pensar que el

producto del gen **nodC** es un receptor que interviene en la transducción de señales de la bacteria a su huésped .

Schmidt y colbs (60), detectaron a la proteína de **nodC** de **R. meliloti**, en nódulos maduros de alfalfa. En estos nódulos, la proteína de **nodC** con peso molecular de 46.8 Kd, aparece como una forma truncada de 34 Kd, la cantidad relativa de la proteína procesada, aumenta con el desarrollo del nódulo de alfalfa. El procesamiento de **nodC**, parece ser un fenomeno general, puesto que se han localizado formas truncadas de ésta proteína en el desarrollo del nódulo de otras leguminosas (60). El efecto biológico que causa éste procesamiento en simbiósis aún no se ha determinado. pero tal vez ésta forma truncada juegue un papel importante en los últimos eventos del desarrollo del nódulo.

nodIJ.

Las cepas de **Rhizobium** inducen nodulación retardada, cuando la región que se localiza hacia abajo de los genes **nodABC** se encuentra mutagenizada (19). La secuencia nucleotídica de ésta región reveló la presencia de dos fases abiertas de lectura (ORF's). Ambos ORF's se localizaron en la misma direccion de la transcripción de los genes **nodABC**. Los genes que corresponden a éstos ORF's se denominaron **nodI** y **nodJ** (19).

La secuencia de aminoácidos predice un producto de 34304 daltones para el gene **nodI** y un producto de 27683 daltones para el gene **nodJ**. (19). Una comparación de los productos polipeptídicos codificados por ambos genes con un banco de proteínas, mostró que el producto de **nodI** es homólogo a los

productos **hisP** y **malK** de **Salmonella thyphimurum** y **Escherichia coli** respectivamente. Estas proteínas están involucradas en el transporte activo de moléculas como histidina y maltosa. El producto de **nodI** no es muy hidrofóbico por lo que podría estar asociado a membrana más que estar integrada a ella. Por el contrario, la proteína de **nodJ** es muy hidrofóbica y por lo tanto sería una proteína que sí se integra a membrana (19). La región carboxi terminal del producto de **nodJ**, contiene una secuencia consenso de proteínas que están involucradas en el transporte activo de moléculas (19), Parece ser entonces, que los productos de los genes **nodI** y **nodJ** están involucrados en el transporte activo

Organización de los genes nod comunes.

La región **nod** común, definida como la región que es esencial para la inducción del desarrollo del nódulo, contiene cinco genes (**nodABCIJ**) agrupados en pequeñas regiones del plásmido simbiótico (16,52,62,70).

La localización de éstos genes en la misma cadena de DNA, la carencia de terminadores o promotores intergénicos (70) así como estudios de complementación (36), indican que todos estos genes constituyen una unidad transcripcional simple,(Figura 2).

genes hsn.

En **R. meliloti** los genes involucrados en la especificidad de infección se encuentran localizados a 6 kb de los genes **nod** comunes. Inicialmente, se definieron cuatro genes agrupados en un fragmento EcoR1 de 6.6 Kb, los cuales se han denominado **nodFEG** y **nodH** ó **hsnABC** y **hsnD** (11,62).

Se ha encontrado que las mutaciones en los genes **hsn**, inducen retardo en nodulación (11), además de que producen cepas de **Rhizobium** capaces de infectar huéspedes que comunmente no infectan (20).

nodF.

El gen **nodF** codifica para un polipéptido de 93aa con un peso molecular de 9760 daltones (8,56). La secuencia de aminoácidos de **nodF** de **R. meliloti** es 59% homóloga a la secuencia de aminoàcidos del producto del mismo gen de **R .leguminosarum** y es 62% homóloga con NodF de **R. trifolii** (11).

Al comparar el producto del gen **nodF** con un banco de secuencias de proteínas, se encontró que, proteínas acarreadoras de acilo (proteínas involucradas en biosintesis de ácidos grasos.) de_**E.coli** son homólogas con este polipéptido. Esta observación indica que NodF puede actuar en este tipo de reacciones. NodF es una proteina muy hidrofilica (11) y es probable que como otras proteinas acarrreadoras de acilo, se encuentre en el citoplasma de **Rhizobium.**

nodE.

La secuencia nucleotídica de **nodE** de **R. leguminosarum** y de **R. trifolli**, predice un peso molecular de 41779 daltones para el producto de éste gen .La homología del producto de **nodE** entre ambas especies es del 78% y la homología de **nodE** de **R. legumiunosarum** y **R. meliloti** es del 86% (11).

Parece ser que la proteína NodE es un factor importante que distingue la inducción de la nodulación en los huéspedes de **R. leguminosarum** y **R, trifolii** (68) . Algunos experimentos en los que se utilizaron genes **nodE** híbridos, concluyeron que una región de 185 aminoàcidos de la parte central del gene determinan esta diferencia en especificidad de infección (68).

Los cextractos celulares obtenidos de **R. leguminosarum** y **R. trifolii** dirigidos contra anticuerpos para NodE, muestran que éste polipéptido se localiza en la membrana citoplásmica de éstas cepas (68). Parece ser que este polipéptido se transporta del interior al exterior de la célula. Una evidencia que apoya ésta localización, viene de la presencia de cadenas alfa hélices de 20 aminoácidos en el producto de **nodE** (68).

No se encontró homología de **nodE** con alguna otra proteína conocida (11).por lo que no se podría deducir alguna función biológica. Sin embargo, la posible localización transmembranal de NodE sugiere que, si existe una señal especie-específica durante el proceso de infección, ésta prodría ser transducida por el producto de éste gen (68).

nodG.

El gene **nodG** solo se ha encontrado en **R._meliloti.**(11). El análisis de la secuencia nucleotídica de la región **hsn**, reveló que **nodG** se transcribe en la misma direccion de **nodF** y **nodE**. Este gen se encuentra localizado 494pb hacia abajo del codón de terminación de **nodE**. No existen terminadores ni promotores en esta región intergénica (11).

El producto de éste gen es un polipéptido de 255 aminoácidos con un peso molecular de 26058 daltones y es similar a la proteína ribitol dehidrogenasa de **Klebsiela aerogenes** (11).

nodH.

El gen_**nodH**, también es exclusivo de **R. meliloti** (11). Está localizado hacia arriba de **nodF** y se transcribe divergentemente de **nodF** y **nodE** (12). **nodH** codifica para un polipéptido de 247 aa con un peso molecular de 28552 daltones y podría ser un péptido transmembranal, puesto que la región amino terminal es altamente hidrofóbica (11). Al comparar la traducción de la secuencia nucleotídica de **nodH**, no se encontró homología entre éste péptido con alguna otra proteína conocida (11). Sin embargo, recientemente se reportó que el producto de **nodH** está involucrado en la producción de una señal extracelular específica de alfalfa (4).

Además de los genes descritos, existen otros genes que también están involucrados en la especificidad de infección:

A; Tres de éstos genes **nodLMN** solo están presentes en el plásmido

simbiótico de R. leguminosarum y de R. trifolii y se encuentran en la misma dirección que nodFE.

Al comparar las secuencias nucleotídicas de nodG y de nodH de R. meliloti con los genes nodL, nodM ó nodN de R. leguminosarum_ y de R. trifolii_ se encontró que no existe homología entre ellos (69).

B; nodP y nodQ son genes que solo se encuentran en el plásmido simbiótico de R. meliloti y se encuentran adyacentes a nodFEG . Ambos genes se transcriben divergentemente de nodFEG.

nodL.

El gen nodL se encuentra 0.6kb hacia abajo del gen nodE y no se encontró ningún promotor o terminador en ésta región intergénica (69).

La expresión del gen nodL solo se requiere para la nodulación de algunos huéspedes de R. leguminosarum, esto ha sido sugerido por que insersiones Tn5 en nodL inhiben la nodulación de chicharo, de Lens culinaris y de Lathyrus sativus y reduce ligeramente el mismo fenotipo en_Vicia hirsuta (69).

El gen nodL codifica para un polipéptido de 20105 daltones y no existe homología entre éste gen con alguna proteína conocida (69).

nodM y nodN.

El gen nodM está separado por 0.5kb de nodL. El gen nodN.

está localizado a 70bp de **nodM**. (69). Mutaciones en **nodM** y **nodN** no alteran la nodulación (69).

nodM codifica para un polipéptido de 65795 daltones y el producto de **nodN** tiene un peso molecular de 18031 daltones (69)

La proteína NodN no tiene homología con ninguna proteína co - nocida, pero NodM es homóloga a dos amidofosforribosil transferasa (productos del gen purF), una de **E.coli** y otra de **Bacillus subtilis** (69).El gen **purF** cataliza los primeros pasos de biosintesis de purinas, usando como substrato pirofosfato de fosforribosil. Las mutaciones en el gen **purF** de **E.coli** no son complementadas por **nodM** de **R. meliloti**, por lo que es posible que **nodM** no se exprese ó no catalize la misma reacción como el producto del gen **purF** de **E.coli**.

nodP y **nodQ**.

El análisis de la secuencia nucleotídica indica que el codón de terminación de **nodP** traslapa el codón de iniciación de **nodQ**, sugiriendo acoplamiento traduccional entre éstos genes (63).

El producto de **nodP** consiste de 299 aminoácidos con un peso molecular de 34763 daltones y el producto de **nodQ** es de 641 aminoácidos con un peso molecular de 70613 daltones (63).

Una región del producto de **nodP** es similar a la colicina A de **Citrobacter freundy**, pero los aminoácidos involucrados en la depolarización de la membrana no están conservados en NodP (63)
El producto del gen **nodQ** es similar a los factores de iniciación y a los factores de elongación de la traducción de las proteínas,

todos éstos factores unen GTP y varios de los dominios involucrados en la unión de ésta molécula estan presentes en la proteina NodQ (8).

Organización de los genes hsn.

La organización de los genes **hsn** parece ser especie-especifica: En_R. **meliloti** los genes **nodF**, **nodE** y **nodH** se encuentran adyacentes y se transcriben divergentemente (11). **nodF** y **nodH** se encuentran a 12.5 kb del gen **nodD** (gen **nod**, del cual hablaré màs tarde). En las cepas **R. leguminosarum** y en las de **R. trifolii** los genes **nodFE** están localizados inmediatamente abajo del gen **nodD** (11).

El gen **nodG** de **R. meliloti** forma parte del operon **nodFE** a pesar de la gran distancia que existe entre ellos, de la misma manera **nodL** de **R. leguminosarum** y de **R. trifolii** pertenecen al operón nodFE (69).

Los genes **nodM** y **nodN** constituyen un operón puesto que se han encontrado secuencias promotoras de **Rhizobium** en la region intergénica de **nodL** y **nodM** (69). Finalmente **nodP** y **nod Q** de_R. **meliloti** parecen formar parte del operón **nodFEG** (63) (Figura 2)

Cambios en el comportamiento simbiótico causados por genes hsn.

Se ha observado que existen algunas modificaciones en el comportamiento simbiótico cuando se transfieren los genes **hsn** entre las diferentes cepas de_**Rhizobium**. Estos cambios han sido estudiados en **R. meliloti**, en **R. leguminosarum**_ y en **R trifolii** (20).

La transferencia de un plásmido que contiene los genes **hsn** de **R. meliloti** a **R.leguminosarum** causa dos tipos de modificaciones (20):

1. **R.leguminosarum** es capáz de infectar a alfalfa, el huésped de **R. meliloti** y
2. La habilidad de infección de **R. leguminosarum** sobre su huésped disminuye.

Los genes **nodH** y **nodQ** son los reponsables de las modificaciones simbióticas en **R. leguminosarum**. Esto fué demostrado por inducir mutaciones con Tn5 en la región **hsn** de **R. meliloti** y por la subsecuente transferencia de las mutantes a **R leguminosarum** (20).

Debellé y colbs (12), mostraron que las transferencia de los genes **hsn** de **R. meliloti** a **R. trifolii** también disminuye la habilidad de infectar y nodular a su huésped. Estos cambios están determinados por los genes **nodH**, **nodFE** y **nod Q**. De éstos datos se ha propuesto que los genes **nodFE**, **nodH** y **nodQ** de **R. meliloti** se comportan en **R. leguminosarum** y en **R. trifoli** como los genes de virulencia de bacterias fitopatógenas (20).

Los bioensayos para determinar la deformación de los pelos radiculares (**had**) y bioensayos para determinar el acortamiento

de la raíz (**tsr**) mostraron que los genes **nodH** y **nodQ** de **R. meliloti** contribuyen en la producción de señales extracelulares específicas para la infección específica de alfalfa (señales HadA). (20). las cepas de **R. leguminosarum** que tienen los genes **nodA** ó **nodC** mutados y que llevan los genes **hsn** de **R. meliloti** pierden la habilidad para infectar y para producir los factores extracelulares activos sobre su planta huésped (20). Se ha propuesto por Faucher (20) que también los genes **nodABC** producen factores que son activos en **Vicia sativa** (**Veza**), Estos factores han sido llamados factores HadVc. Es posible que tanto los factores HadA como los factores HadVc sean similares.

Hasta el momento, se han propuesto dos hipótesis para explicar el origen de los factores HadA y HadVc:

1. Ambos factores no están químicamente relacionados y por lo tanto no son derivados de la misma vía de síntesis.
2. Ambos factores estan químicamente relacionados y por lo tanto son derivados de la misma vía de síntesis.

Los siguientes datos obtenidos de **R. meliloti** y de **R. leguminosarum** apoyan la hipótesis de que ambos factores se sintetizan de la misma vía de síntesis.

-Mutaciones en **nodH** ó **nodQ** causan que la actividad HadA desaparezca y quede la actividad HadVc.

-Mutaciones en **nodABC** son epistáticas sobre **nodH** y **nodQ**.

-Tanto los factores HadA como los factores HadVc son termostables y se comportan de manera similar en experimentos de filtración y cromatografía (20).

Dado que las mutaciones en **nodABC** son epistáticas sobre **nodH** y **nodQ**, podría suponerse que los genes **nod** comunes actúan hacia arriba de los genes **hsn** durante la síntesis de los factores Had. De esta manera los factores HadVc podrían servir como presursores de la síntesis de los factores HadA (20).

Genética de Bradyrhizobium

A diferencia de **Rhizobium**, las especies de **Bradyrhizobium** no contienen plásmidos simbióticos, por lo que los genes involucrados en el proceso simbiótico están localizados en el cromosoma .

En **Bradyrhizobium** spp (**Parasponia**),los genes **nodABC** están organizados como los genes **nodABC** de **Rhizobium**. Dentro de la región **nod** común se encuentra un nuevo gen, **nodK** (58). Las mutaciones en **nodK**, no alteran el fenotipo simbiótico de la cepa de **Bradyrhizobium** que porta ésta mutación (25). A diferencia de las diferentes cepas de **Rhizobium** los genes de **nodI** y **nodJ** de **Bradyrhizobium** se encuentran a 2kb de los genes **nodABC**

En las cepas de **Bradyrhizobium japonicum**, también existe un nuevo gen (**nodY**) en la región **nod** comun. La similitud entre **nodY** y **nodK** es del 30% y ambos genes se transcriben junto con los genes **nodABC** (3)

Como en los **Rhizobia**, **Bradyrhizobium** contiene secuencias nod box entre **nodA** y **nodD** (25) , La presencia de estas secuencias sugiere que la regulación de los genes **nod** es similar entre las cepas de **Rhizobium** y **Bradyrhizobium**.

El gen **nodD** de **Bradyrhizobium japonicum**, es activado por los inductores que inducen la expresión del operón **nodYABC**. La inducción de este gen podría deberse a una segunda secuencia "nod box" presente hacia el 5' de **nodD**. Esta secuencia tiene el 67% de similitud a la secuencia consenso de la nod box localizada hacia el 5' del operón **nodABCIJ** de las cepas de **Rhizobium** (3).

Muy poco se conoce acerca de los genes que determinan la especificidad de infección. Recientemente, se identificó un locus cercano a los genes **nod** comunes, el cual se requiere para la nodulación en siratro (25).

Por los análisis de las cepas que contienen deleciones en la región **nif** de **Bradirhyzobium**, se identificaron dos regiones **nod**, denominadas **nod-1** y **nod-2**. Ambas regiones se requieren para la nodulación normal de soya (27). La región **nod-1** se encontró sobre un fragmento de DNA de 3.1-3.5Kb y parece estar involucrada en la nodulación de siratro, de mung bean y de cowpea (27). Por lo tanto, el producto de este gen contribuye en la infección de otros huespédes de **Bradirhyzobium Japonicum**. La región **nod-1** parece representar un nuevo gen, que está involucrado en nodulación, puesto que no se encontró homología con los genes **hsn** de **Rhizobium meliloti** (27).

Regulación de los genes nod y hsn.

La expresión de los genes **nod** depende de la presencia de 3 componentes (44,46,47,52,54):

1. De los compuestos liberados por la planta huésped (Flavonas).
2. De las secuencias promotoras y
3. Del producto del gen **nodD**

Flavonas.

Las flavonas son substancias derivadas de la vía fenilpropanoide . Esta vía es la responsable de la síntesis de muchos compuestos fenólicos en plantas (50).

Las flavonas son estructuras químicas basadas en un esqueleto de 15 carbonos con un anillo cromano que contiene un segundo anillo aromático, el anillo B. Dependiendo de la posición del anillo B, las flavonas se clasifican en :

A. Flavanonas y Flavonas: Compuestos que tienen el anillo B unido al carbono 2 (Figura 3).

B. Isoflavonas: Compuestos que tienen el anillo B unido al carbono 3 (Figura 3).

Las raíces de las plantas leguminosas producen una gran cantidad de compuestos flavonoides (75). El papel que juegan éstos compuestos en la activación de los genes **nod**, ha sido estudiado en varias especies de **Rhizobium** (54).

A través de los compuestos comerciales de naturaleza flavonoide se han podido identificar algunos de los compuestos inductores de los genes **nod** presentes en las raíces de las leguminosas (74).

Los exudados de las semillas de alfalfa contienen varios inductores, de los cuales el más activo es la luteolina (45). Los extractos de trébol contiene tres inductores de los cuales el más activo es el 7'4' dehidroxiflavona (13) y el exudado de semilla de chícharo contiene cuatro inductores, siendo la apigenina 7-0 glucósido el compuesto más activo (54). Los operones **nod** pueden ser activados también por los compuestos comerciales de naturaleza flavonoide, debido a la gran similitud que existe entre estos y los inductores naturales presentes en las raíces de las leguminosas (45). La expresión de los genes **nod** es inducida a concentraciones muy bajas de los inductores y a los pocos minutos de su exposición (74).

Recientemente se han reportado dos compuestos que se liberan de alfalfa. Estos compuestos se han identificado como chalcona y crysoeriol, Ambos compuestos inducen la expresión de los genes **nod** de **R. meliloti** a concentraciones más bajas en comparación a la concentración que se requiere de luteolina (28,42).

Requerimientos de los compuestos inductores.

1. El doble enlace C-2-C-3 de las flavonas el cual no se encuentra en las flavanonas, no es importante para la inducción de

los genes **nod**.

2. La hidroxilación del C-3 disminuye la actividad inductora.

3. La unión del anillo B al C-2 es de crucial importancia para la inducción y

4. La hidroxilación del C-7, C-5 y C-4 son esenciales para la induccion de los genes **nod** (74).

Compuestos inhibitorios que reprimen la acción de los compuestos inductores.

En los extractos de raíz de trébol se han identificados compuestos que reprimen la actividad de los inductores (13,22). Estas substancias inhibitorias se encuentran en concentraciones más altas con respecto a la concentración de las moléculas inductoras.

Algunos compuestos como la chrysina (una flavona) y el el kaempferol (un flavanol), reducen la transcripción de los genes **nod** en comparación con la 7'4' dihydroxiflavona, el activador de la inducción de los genes **nod** de **R. trifolii**. Tanto el inhibidor como el activador son activos a concentraciones similares, por lo que es probable que ambos compuestos compitan por el mismo sitio de unión (13). Posteriormente los experimentos in vitro muestran que la activación de los genes **nod** está determinada por la relación activador/inhibidor, debido a que fluctuaciones en las concentraciones de éstos compuestos afectan la expresión de los genes **nod** (13).

Sitios de liberación de compuestos fenólicos.

Los compuestos activadores y los compuestos inhibidores son liberados de manera regulada en distintos sitios de la raíz (51) Los inductores son liberados de las células vegetales que están por arriba de la punta de la raíz y los inhibidores ó antiinductores son liberados de las células que están en la punta de la raíz. Las células vegetales que están hacia arriba de la punta de la raíz han mostrado ser las células suceptibles a infección, así que ésta podría ser la razón de que éste sea el sitio de liberación de los compuestos inductores (51).

Secuencias promotoras.

Tanto el operón **nod** común (**nodABCIJ**) como los operones **hsn** (**nodFEG**, **nodH** y **nodMN**) están precedidos por una secuencia de 47pb la cual Rostas (55) ha denominado "nod box". Esta secuencia se caracteriza por contener secuencias (5pb,7pb y 25pb) conservadas entre los **Rhizobia**. La secuencia "nod box" se localiza a 200-220pb hacia arriba del codón de iniciación (ATG) del primer gen del operón **nod** ó **hsn** (66).

Las cepas de **Rhizobium** que llevan mutaciones o deleciones en la caja **nod**, son incapaces de inducir nodulación (66), indicando que ésta secuencia es esencial para la expreción de los genes **nod**. La actividad promotora, se encuentra en las secuencias consensos así como en las 21pb hacia abajo de las mismas incluyendo la secuencia ATTAG, ATAG ó cualquier secuencia parecida a ésta (66).

Utilizando el fragmento de 25pb de la "nod box" como detector

en experimentos de hibridización contra genomas totales de diferentes cepas de **Rhizobium** ó **Bradyrhizobium** indican que además de las secuencias "nod box" presentes en los operones **nod** y **hsn** conocidos existen otras regiones del genoma que llevan éstas secuencias (24). La presencia de otros promotores "nod box" sugiere la posibilidad de genes adicionales que podrían estar involucrados en simbiosis (24).

nodD.

El producto del gen **nodD** fué propuesto como regulador positivo de la transcripción de los genes **nod**, debido a que es el único gen **nod** que se expresa constitutivamente en **Rhizobia** de vida libre (44).

La secuencia nucleotídica de los genes **nod** (16) ha mostrado que el gen **nodD** se transcribe divergentemente de los genes **nodABCIJ**.

Las cepas de **R. meliloti** que llevan mutado el gen **nodD** son capaces de inducir nodulación en alfalfa (30). Por el contrario las cepas de **R. leguminosarum**_ y de **R. trifolii** que llevan una mutación en el mismo gen son incapaces de inducir nodulación en sus huéspedes (15). Estos fenotipos diferentes son explicados por que, en el plásmido simbiótico de **Rhizobium meliloti** existen tres copias de **nodD** y en **R. leguminosarum** y en **R. trifolii** solo existe una copia de **nodD** en sus respectivos plásmidos simbióticos (15,30).

El gen **nodD** de **R. leguminosarum** reprime su propia

transcripción (47), ésta función de autoregulación no se ha observado en los genes **nodD** de **Rhizobium meliloti** ni en el gen **nodD** de **R. trifolii.**

Una comparación de la traducción de la secuencia nucleotídica de **nodD** de especies de **Rhizobium** mostró, que proteínas regulatorias que se unen a DNA tienen homología con el producto de **nodD**. Evidencias que apoyan la unión del producto de **nodD** a DNA vienen de técnicas de retardación en gel (24). La secuencia "nod box" es la secuencia a la cual se une la proteína NodD Estos estudios bioquímicos apoyan la idea de que NodD es un activador transcripcional que se une a DNA.

El gen nodD es funcionalmente intercambiable entre algunas cepas de **Rhizobium**, por ésta característica se consideró por mucho tiempo como gen **nod** común (36). Recientemente se ha propuesto por muchos laboratorios que las flavonas interactúan con el producto de éste gen durante la transcripción de los genes **nod** y **hsn** (32,44). Sin embargo, parece ser que NodD responde de manera diferente a las distintas flavonas presentes en los exudados de raíz de las plantas leguminosas, tales respuestas pueden afectar la especificidad de infección de una cepa particular de **Rhizobium** en un huésped determinado (65).Se ha mostrado que la habilidad de **Rhizobium** para infectar y nodular otros huéspedes con los cuales nunca se asocia, depende de la transferencia del gen **nodD** entre las especies de **Rhizobium** (5). De todas éstas observaciones se ha propuesto que el gen **nodD** podría pertenecer al grupo de los genes **hsn** (65).

Finalmente, dos series de fusiones híbridas entre el gen **nodD1**

de **Rhizobium meliloti** y el gen **nodD** de **R.leguminosarum**, permitieron definir dos regiones del producto de **nodD** involucradas en su habilidad para reconocer una determinada flavona y en autoregular su propia transcripción (67):

1. El extremo amino terminal de la proteína está involucrado en la autoregulación de su síntesis y

2. El extremo carboxi terminal determina el reconocimiento del compuesto flavonoide.

Propiedades regulatorias de los genes nodD de R. meliloti.

En **R. meliloti** a diferencia de **R. leguminosarum** y de **R. trifolii** contiene tres copias del gen **nodD**. Una de éstas copias (**nodD1**) se encuentra adyacente a **nodABC** y las otras dos (**nod2** y **nodD3**) se encuentran separadas de ésta región (43).

Las propiedades regulatorias de los tres genes fueron estudiadas sobre la capacidad de cada uno de ellos para inducir la transcripción de los genes **nodABC**. Estos estudios fueron realizados con extractos de semilla ó con la flavona luteolina. La transcripción del operon fué medida en base a una fusión entre **nodC** y el gen **lacZ** de **E.coli** (43). De estos datos se obtuvo que los tres genes **nodD** inducen la expresión de los genes **nodABC** de manera distinta:

La expresión de **nodC-lacZ** por **nodD1** es dependiente del exudado de la planta. **nodD2** y **nodD3** estimulan la expresión de **nodC** con ó sin inductor.

Las cepas de **Rhizobium** que llevan clonado al gen **nodD3** presentan un fenotipo mucoide (43), ésta característica indica la presencia de exopolisacáridos. Finan (21), ha propuesto que ésta moléculas se requieren para la invasión de la bacteria en la raíz de su planta huésped. El efecto causado por **nodD3** requiere de la presencia de otro gen, **syrM** (43). Las insersiones con Tn5 en **syrM** reducen la expresión de **nodC-lacZ** y reprimen el fenotipo mucoide, esto sugiere que **syrM** puede estar involucrado tanto en la expresión del operón **nod** común por **nodD3** como en la inducción de los genes involucrados en la síntesis de exopolisacáridos (43)
El efecto regulatorio de **syrM** requiere de la presencia de **syrA**, el cual se encuentra cerca de **nodD3** y **syrM** (43). El sitio de iniciación de la transcripción del operón **nod** común es el mismo, si éste es inducido por **nodD1** más luteolina ó por **nodD3** y **syrM** (43).

La expresión de **nodC-lacZ** por **nodD1** y luteolina es muy alta en cepas que carecen de **nodD2** y **nodD3** en comparación con cepas que si los llevan (43).Esta inducción es por que existe actividad de la proteína NodD1 sin la interferencia de los productos de **nodD2** y **nodD3** (43). La posible interferencia de las proteínas NodD2 y NodD3 sobre la de NodD1, pudiera ser debida a la competencia de los tres productos por el enlace al promotor de **nodA**. Todas éstas observaciones indican que las tres copias de los genes **nodD** de **R. meliloti**, son reguladores de la transcripción del operón **nod** común y al menos los productos de **nodD1** y **nodD3** afectan el mismo promotor (23,43).

Localización subcelular de la proteína de nodD

La proteína de **nodD** se localiza tanto en la membrana citoplásmica como en el citoplasma de cepas de **Rhizobium** que sobreproducen NodD. Por el contrario en cepas silvestres, NodD se localiza exclusivamente en el citoplasma de **Rhizobium** (59). Análisis de los perfiles de hidrofobicidad de NodD apoyan la localización del producto de **nodD** en membrana citoplásmica (59).

Interaccion entre nodD y los compuestos flavonoides.

Algunos datos obtenidos por Spaink (65), indican que NodD responde de manera diferente a las flavonas. Estas observaciones sugieren que estos compuestos interactúan con el producto de **nodD**. Schlaman y colbs (59), proponen que la interacción flavona-NodD toma lugar en ó cercanamente a la membrana citoplásmica y un dominio de la proteína NodD se encuentra enlazado a la "nod box". La activación de NodD por el inductor posiblemente causa un cambio conformacional en la molécula.

Modelos para la regulación de los genes nod.

Se han hecho numerosos estudios para entender la regulación de la transcripción de los genes **nod** y **hsn**. Estos estudios se han hecho en mas detalle en **R. meliloti**, en **R. leguminosarum**_ y en **R. trifolii**.

Para monitorear la expresión de los genes genes **nod** ó **hsn** se utilizan fusiones entre el gen **lacZ** de **E.coli** y éstos genes (43,44)

El único gen **nod** que se transcribe en cepas de **Rhizobium** crecidas en medios de cultivo, es el gen **nodD**. Por el contrario, cuando las bacterias crecen en presencia del exudado de la raíz, otros genes **nod** se transcriben a altos niveles. Esta activación es dependiente del gen **nodD** (44).

Basados en éstos datos el modelo para la regulación de éstos genes es el siguiente: (figura 4).

La presencia de las secuencias "nod box"en el 5' de los operones **nod** y **hsn** sugiere que la activación de éstos operones ocurre de manera coordinada. La activación de la transcripción está mediada por la interacción de las moléculas inductoras con el producto del gen nodD con la subsecuente unión del complejo NodD-flavona a la "nod box". El resultado de esta última interacción es la transcripción de los operones **nod** y **hsn**

Presencia de moleculas represoras durante la transcripción del operon nod común.

Una característica exclusiva de ciertas cepas de **R. meliloti**, es que ademas de las moléculas activadoras existen moléculas represoras de la transcripción de los genes nod (37) La región de DNA que codifica para éste represor se delimitó sobre un fragmento de 4.4 kb y se localizó en el cromosoma de la cepa **R meliloti AK631** (37).

Los ensayos de retardación en gel y los análisis de protección con DNAsa indican que el producto del gen represor se

une a un fragmento de 33pb (el sitio de unión de la RNA polimerasa) que contiene los sitios involucrados en la iniciación transcripcional de los genes nodA y nodD (37).

Las cepas de **R. meliloti 1021** que no tienen la molécula represora sintetizan NodD1 y NodD3 en cantidades altas con respecto a las cepas de **R. meliloti AK631** que producen el represor. La cantidad de ambos genes en ambas cepas se midio por inmunodeteccion de proteinas (37). Estos resultados sugieren que la molécula represora regula la concentración del gen **nodD**. Parece ser que la unión de NodD-DNA se debilita y la unión del represor es muy fuerte en extractos de cepas de AK631 que crecieron sin inductor. Por el contrario, en los extractos de bacterias crecidas con inductor, la interacción de **nodD**-DNA se hace màs fuerte y el enlace del represor se debilita. Estos resultados sugieren que el inductor interactùa con el producto de **nodD** y por lo tanto el enlace del represor al promotor nod se inhibe (37).

Basados en éstos resultados Eva Kondorosi y colbs (37), proponen el siguiente modelo de regulación; (figura 5)

En las cepas de **R. meliloti** que carecen de la molécula represora y crecen en ausencia del inductor, la RNA polimerasa se enlaza al promotor de **nodD** y transcribe **nodD**. La proteina NodD resultante se enlaza a la "nod box".

En las cepas de **R. meliloti** que tienen la molécula represora y que crecen en ausencia del inductor, la RNA polimerasa y el represor compiten por el sitio de unión. Esto da como resultado que el enlace ocacional de la RNA polimerasa produzca bajas can-

tidades de **nodD**. Es
ta baja concentración de **nodD** y el fuerte enlace del represor debilita la unión de NodD a la "nod box".

En las cepas de **R. meliloti** que carecen de represor y crecen con inductor, la proteína **nodD** interactúa con el inductor causando probablemente un cambio conformacional en el complejo NodD-DNA, permitiendo que la transcripción de los genes nod comunes inicie y en las cepas de **R. meliloti** que llevan el represor y crecen con inductor, el complejo NodD-Inductor se enlaza a la "nod box" con alta afinidad y la formación del complejo NodD-Inductor-nod box promueve el enlace de la RNA polimerasa al promotor de **nodA**.

Dentro de los genes bacterianos existen otros genes que también están involucrados en el proceso simbiótico. Dentro de éste grupo de genes se encuentran los genes que se expresan durante la fijación biológica del nitrógeno (genes **nif** y genes **fix**) y los genes involucrados en la síntesis de exopolisacáridos (genes **exo**).

genes nif.

Los genes necesarios para la fijación biológica del nitrógeno en **Rhizobium** se han dividido en dos grupos (64)

1. Los genes **nif**, son aquellos genes de **Rhizobium** homólogos a los genes **nif** de **Klebsiella** y
2. Los genes **fix**, son aquellos genes de **Rhizobium** que no tienen

homología a los genes **nif** de **Klebsiella**.

Las cepas de **Rhizobium** que contienen mutaciones en los genes **nif** ó **fix** son capaces de inducir el desarrollo del nódulo pero la fijación del nitrógeno no se lleva a cabo (64).

Se han localizado varios de los genes involucrados en la fijación del nitrógeno en **Rhizobium meliloti**, **Rhizobium leguminosarum** bv **viceae** y bv **trifolii** y en **Bradyrhizobium** (64).

La activación de los genes **nif** depende de la presencia del gen **nifA**, pero **nifA** no es activado por el gen **ntrC** como en **Klebsiella** pneumoniae. La expresión de **nifA** depende de la concentración de oxígeno y éste efecto es mediado por los genes **fixL** y **fixJ** (64). En **Klebsiella pneumoniae**, el gen **nifL** regula el efecto del oxígeno sobre **nifA**. Hasta la fecha no se ha encontrado ningún gene de **Rhizobium** ó de **Bradyrhizobium** similar a **nifL** de **Klebsiella pneumoniae** (64),

Genes exo

Los **Rhizobia** como otras bacterias gram negativas, producen una gran variedad de polisacáridos (lipolisacáridos,LPS ó exopolisacáridos EPS). Se piensa que éstas moléculas están involucradas en el proceso simbiótico, ya que cepas de **Rhizobium leguminosarum** bv **phaseoli** (**R. phaseoli**) que no producen LPS inducen nódulos sin bacteroides y cepas de **R.meliloti** que no sintetizan polisacáridos inducen nódulos que no fijan el nitrógeno. Algunas mutaciones que afectan la producción de EPS causan que la

bacteria no pueda entrar a las células vegetales (38).

La mayoría de los genes **exo** se encuentran localizados en el cromosoma de **Rhizobium**, sin embargo, existen dos genes **exo** localizados en el plásmido simbiótico de **R.phaseoli**. Uno de éstos genes se ha denominanado **psi** (inhibición de polisacaridos). Cuando se encuentra clonado en un plásmido multicopia, se inhibe la síntesis de polisacáridos y mutaciones en este gen, causan que la cepa que contiene la mutación, induzca nódulos que no fijan nitrógeno (6,7). La transcripción del gen **psi**, es reprimida por el segundo gen, el cual se ha denominado **psr**. Cepas que contienen a **psr** en multicopia, inducen nódulos que no fijan nitrógeno (6,7).

Existen algunos otros genes **exo** en **Rhizobium meliloti** (21) y numerosos estudios se están llevando a cabo, con el objeto de conocer tanto su regulación como el papel que tienen durante el proceso simbiótico.

GENES VEGETALES.

Después de la infección de **Rhizobium** en las raices de plantas leguminosas se expresan genes de la planta que codifican proteínas especificas de simbiosis (nodulinas) (1).

Las nodulinas parecen participar en tres eventos diferentes;

1. Participan en la morfogenesis del nódulo .
2. Están involucradas en las vías especificas del carbono y del

nitrógeno y

3. Controlan la compatibilidad de la bacteria endosimbionte.

Se han aislado varios de los genes que codifican para la síntesis de nodulinas y se ha obtenido la secuencia nucleotídica de algunas de ellas (1).

La expresión de las nodulinas se ha estudiado en soya, alfalfa, chicharo, parasponia y frijol (1).Estos estudios han mostrado que las nodulinas se expresan diferencialmente, Debido a esta expresión diferencial las nodulinas se clasifican en dos grupos (1);

1. Nodulinas tempranas, las cuales estàn involucradas en los primeros pasos del desarrollo del nódulo y
2. Nodulinas Tardías, las cuales se expresan concomitante a la fijación del nitrógeno.

Recientemente se ha publicado que la presencia de los genes nod comunes es necesaria para la expresión de algunas nodulinas tempranas (26).

La necesidad de conocer los mecanismos que están involucrados durante el proceso simbiótico entre las plantas leguminosas y las bacterias fijadoras del nitrógeno ha provocado la creación de numerosas estrategias para su estudio (41). El conocimiento de los genes involucrados en este proceso ha aumentado de manera considerable. Hasta la fecha se conocen más de 20 genes bac-

terianos que son necesarios para el establecimiento de la simbiosis, Por lo tanto no esta en duda que, en un futuro proximo se conozca el papel de algunos otros genes.

ANTECEDENTES,

A partir de un banco de cósmidos de **Rhizobium phaseoli-CE3** se obtuvieron cósmidos capaces de inducir nodulación inefectiva a una cepa curada del plásmido Sym (derivada de la cepa CE3).

Para delimitar las regiones que están involucradas en este proceso, se generaron deleciones a partir de uno de los cósmidos (pSM991) y el fenotipo simbiótico de los cósmidos deletados fué buscado en frijol (9).

Los patrones de restricción de aquellos cósmidos que seguian conservando la habilidad para nodular mostraron que los fragmentos EcoR1 de 6.8, 3.5 y 0.5 kb estaban presentes en todos ellos.

Por hibridizaciones de un patrón de restricción de DNA digerido con EcoR1 de **R. phaseoli-CE3** y del cósmido 991 contra detectores especificos para genes de nodulación comunes de **Rhizobium meliloti** (9), se encontro que el fragmento de 6.8 kb lleva secuencias homólogas a estos genes.

Uno de los cósmidos deletados (991-25) con fenotipo nod+fix- en frijol, fué mutagenizado con Mud11pR13 (9). Análisis de estas mutantes mostraron que las inserciones que confieren fenotipo nod- estan agrupadas en los fragmentos de 6.8 y 3.5kb. De estos datos indican que estas regiones son necesarias para el desarrollo del nódulo en frijol.

OBJETIVO

OBTENCION DE LA SECUENCIA NUCLEOTIDICA DE LA REGION DE NODULACION DE *Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli*-CE3

MATERIAL Y METODOS

Plásmidos recombinantes.

Los plásmidos utilizados para obtener la secuencia nucleotídica se presentan en la fig 4.

Extracción de DNA.

1. Utilizar 5 ml de cultivo líquido en PY
2. Centrifugar las células en tubos eppendorff 2' en una microfuga ó 5' a 7k en tubos corex.
3. Lavar la pastilla con 500 ul de TE 50/20 (TE=tris HCl 50mm/EDTA 20mM,pH8. Resuspender la pastilla en 400 ul de TE y añadir 50ul de pronasa (5 mg/ml) y 50 ul de SDS 10% en TE. Incubar una hora a 37 C.
4. Pasar este lisado dos veces por una jeringa.
5. Extraer dos veces con fenol-cloroformo-isoamilico (25-25-1) y dos veces con cloroformo isoamílico (25-1).
6. Centrifugar 5', la fase acuosa se precipita con 1/10 de vollumen de acetato de sodio 3M y dos volumenes de etanol al 100%. Incubar a dos horas a -20 C.
7. Centrifugar 15', y lavar la pastilla con etanol al 70% .
8. Secar la pastilla con vacio y resuspender en TE 10/1 con RNAsa 20 mg/ml (tomado de tesis de Doctorado de Esperanza Martínez).

Extracción de plásmidos recombinantes.

1. Inocular 5 ml de medio con el antibiótico apropiado.

2. Poner 1.5 ml del cultivo en un tubo eppendor y centrifugar dos minutos en una microfuga.

3. Remover el medio de cultivo con aspiración.

4. Resuspender la pastilla con 100 ul de una solución fria de 50 mM de glucosa, 10 mM EDTA, 25 mM de Tris-HCl (pH8) y 4 mg/ml de lisozima.

5. Incubar 5' a temperatura ambiente.

6. Agregar 200 ul de una solución fresca de 0.2 N de NaOH,1% de SDS. Incubar en hielo 5'.

7. Adicionar 150 ul de una solución fria de Acetato de Potasio 5M,pH 4.8. e incubar en hielo por 15'.

8. Centrifugar 15' a 4 C, Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo, y extraer una vez con fenol-cloroformo-isoamilico (25-25-1) Centrifugar 2 minutos a temperatura ambiente.

9. La fase acuosa se precipita con dos volumenes de etanol al 100% y se incuba a temperatura ambiente por 2'.

10. Centrifugar 15' a temperatura ambiente, lavar la pastilla con etanol al 70% .

11. La pastilla se seca por vacio y se resuspende en 50 ul de TE 10/1 con RNAsa 20 mg/ml (35).

Clonación de los fragmentos necesarios para la obtención de la secuencia.

Los DNAs de los plásmidos recombinantes que llevan los fragmentos de interés y el DNA del vector puc19 se digirieron totalmente con las enzimas de restricción necesarias. Para ligar se utilizó una relación de 5:1 (pasajero-vehiculo) en un volumen final de 20 ul (40).

Transformación en_E.coli.

1. Crecer la cepa CMK en LB hasta la fase exponencial.
2. Agregar un volumen de TSS 2X (Medio LB con 20% de PEG, 10% de DMSO y 40-100 mM de MgSO ó MgCl) a pH 6.5.
3. Colocar la mezcla en hielo.
4. El DNA ya ligado se transforma en .1 ml de ésta mezcla y se incuba en hielo durante una hora.
5. Agregar un ml de LB sin antibiótico e incubar con agitación a 37 C.
8. Seleccionar las transformantes en el medio con el antibiótico apropiado, e incubar toda la noche a 37 C. (10).

Determinación de la secuencia nucleotídica.

La secuencia de DNA se obtuvo siguiendo el método de Sanger (57), usando el Kit de sequenase V 2.0 (USB).

Geles de secuencia.

Para separar los fragmentos marcados se utilizaron geles de acrilamida (6%-8%) con 8% de UREA. Se corrieron por periodos de 1.5-5 hrs, en TBE 1X (0.089 M de Tris base, 0.089 de Acido borico y 0.002 M de EDTA) a corriente constante de 40 Watts.

Análisis de la secuencia.

Las comparaciones al banco de secuencias GENBANK se realizaron mediante el programa fasta (41')

El análisis de la secuencia nucleotídica se realizaron con el programa SEQAID 11 versión 3.5 (39).

Los alineamientos múltiples se hicieron con el programa m-align del paquete Martínez de análisis de secuencia (41)

Los perfiles de hidrofobicidad se obtuvieron siguiendo el programa realizado por Doolittle (14).

Hibridizacion DNA-DNA.

Se utilizaron las técnicas de Maniatis et al (57).

RESULTADOS.

Las mutaciones nod- fueron localizadas en dos fragmentos BamH1, que están contenidos en el fragmento EcoR1 de 6.8 Kb, Las regiones homólogas a **nodABC** de ambos fragmentos fueron localizadas por análisis de mapeo con enzimas de restricción e hibridizaciones con detectores específicos de los genes **nodABC** de **R.meliloti** (9):

1. Un fragmento de 4.3Kb que lleva secuencias homólogas a **nodAB** y
2. Un fragmento de 1.2Kb que lleva secuencias homólogas a **nodC**

Como el interés de este trabajo era obtener la secuencia nucleotídica de los genes **nod** de **R.phaseoli CE-3**, nosotros subclonamos los fragmentos BamH1 de 4.3kb y 1.2kb en el vector de secuencia pUC19 (72). Para esto se tomó la subclona B2 que lleva el fragmento EcoR1 de 6.8kb en el vector pSUP205 (9). A partir de una digestión con la enzima BamH1 obtuvimos los dos fragmentos de interés, ambos fragmentos, se subclonaron posteriormente en el sitio BamH1 del vector pUC19 (ver materiales y métodos). La subclona que lleva el fragmento de 4.3kb se denominó pAJ9 y la subclona que lleva el fragmento de 1.2kb se denominó pAJ4 (figura 6) Se obtuvo un mapa de restricción con varias enzimas para ambas subclonas (figura 6).

Delimitación de la región nod.

Con el objeto de delimitar aún mas la región **nod** de **R. phaseoli-CE3**, se hibridizó un patrón de DNA con varias enzimas de restricción de los plásmidos que contienen los fragmentos de 4.3kb y 1.2kb con detectores específicos para **nodAB** y **nodC** de **R.meliloti**. Un fragmento BamH1-Sph1 de la subclona pAJ9 lleva secuencias homólogas a **nodAB** y un fragmento Pst1 de la subclona pAJ4 lleva secuencias homólogas a **nodC** (figura 7).

Dado que el probador de **nodAB** utilizado, no lleva la región regulatoria (secuencia "nod box), se decidió tomar el segundo sitio Sac1 de la subclona pAJ9 con el objeto de obtener en nuestra secuencia a ésta región.

Los fragmentos Sac1 de la subclona pAJ9 y los fragmentos Pst1 de la subclona pAJ4 se subclonaron en el vector pUC19 (fig 6) Finalmente se construyeron subclonas derivadas tanto de las subclonas Sac1 (pAJ99, pAJ78 y pAJ103) como de la subclonas Pst1 (pAJ5 y pAJ10), con el objeto de tener en la secuencia nucleotídica ambas cadenas de DNA (fig 6).

Secuencia Nucleotídica.

La región de DNA de todos los fragmentos subclonados se secuenció siguiendo la estrategia de la figura 6

La secuencia nucleotídica que se muestra en la fig 8 , inicia desde el segundo sitio Sac1 hasta primer sitio BamH1..

El análisis de la secuencia obtenida, permitió definir cuatro fases de lectura abierta (ORF's), los cuales se transcriben en la misma dirección (figura 9).

El primer ORF se encuentra localizado entre los nucleótidos 549 y 721 (figura 8). Una comparación de éste ORF con un banco de secuencias de DNA de bacterias, indicó que este ORF no tiene homología con algún otro gen **nod** reportado. ni existe homología con algún otro gen reportado de bacteria.

El segundo ORF inicia con un ATG en la posición 732 y finaliza en los nucleótidos 1007 (figura 8). Una comparación de éste ORF contra el mismo banco de datos indicó que a nivel de DNA , tiene homología con el gen **nodA** de **R. leguminosarum** . El porcentaje de homología es del 52% en los 234 nucleotidos que traslapan sobre la parte final del ORF que codifica para **nodA** de **R. leguminosarum** (figura 10). Por el contrario, se encontró, una homología muy pobre entre la traducción del **ORF-2** y de la traducción de **nodA** de **R. leguminosarum** (figura 11). Por éstos datos podemos sugerir que solo una parte del gen **nodA** de **R.phaseoli-CE3** se encuentra conservada.

Los productos polipeptídicos que codifica el **ORF-1** y el **ORF-2** tienen un peso molecular de 6.280 Kd y 10.477 kd respectivamente.

El tercer ORF, que está localizado entre los nucleótidos 1004-1693 (figura 8), corresponde al gen **nodB**. El codón de iniciación de éste gen traslapa con el codón de terminación del segundo ORF (nucleótidos 1004-1007). Estas secuencias que traslapan el principio de un gen con el final de otro gen se han encontado en **R.meliloti** y en_**R.leguminosarum** (52,70)._

Finalmente el cuarto ORF , localizado entre los nucleótidos 1798-3008, corresponde al gen **nodC**. (figura 8).

La distancia entre **nodB** y **nodC** de **R. phaseoli-CE3** es de 103

nucleótidos a diferencia de los 15-20 nucleótidos que se encuentran entre los genes **nodB** y **nodC** de otros_**Rhizobium** (16,52,62,70). No se encontraron secuencias terminadoras de la transcripción ni secuencias promotoras consenso de **E.coli** ó de **Rhizobium** en esta región intergénica.

Comparación de la traducción de las secuencias nucleotídicas de nodB y nodC de R. phaseoli-CE3 con los genes nodB y nodC de otros Rhizobia.

Los productos génicos de **nodB** y **nodC** de **R.phaseoli-CE3**_ (con peso molecular de 25000 y 47000 Daltones), son similares a los productos de los mismos genes de otras cepas de **Rhizobium** (16,52,62,70).

El grado de homología entre los productos génicos de **nodBC** de otros **Rhizobia** y los productos génicos de **nodBC** de **Rhizobium phaseoli-CE3** se muestran en la (figura 12)

Perfiles de Hidrofobicidad.

La traducción de la secuencia nucleotídica de los 4 ORF's fué analizada en perfiles de hidrofobicidad. (figuras 13,14,15) 1

Las cuatro proteínas codificadas por los cuatro ORF's contienen regiones hidrofóbicas. Sin embargo, es notorio que el producto del gen **nodC** es altamente hidrofóbico. La parte más hidrofóbica se encuentra en la región carboxi terminal, entre los aminoácidos 306-348 y los aminoácidos 362-380 (figura 15). Tal arreglo de regiones hidrofóbicas, se encuentran en proteínas que

se asocian a membrana (33).

La región amino terminal (figura 15) también es altamente hidrofóbica. La alta hidrofobicidad de ésta región es característica de péptidos señales de proteínas que se transportan al exterior de la membrana (33). Regiones hidrofóbicas similares, son encontradas en la proteina de **nodC** de otras cepas de **Rhizobium** (70). La alta hidrofobicidad de los extremos carboxi terminal y amino terminal de la proteína de NodC de **R,phaseoli-CE3** sugieren, que ésta proteína está asociada a membrana y es muy posible que su función sea igual ó similar a la función propuesta para NodC de otro **Rhizobia** (33).

Secuencias promotoras.

El operón de genes **nod** comunes así como los operones **hsn** (55), están precedidos por una secuencia ("nod box") que está implicada en la regulación de éstos genes. Esta secuencia se caracteriza por tener regiones altamente conservadas entre las diferentes cepas de **Rhizobium** .

Una secuencia que precede a los 4 ORF's de **R. phaseoli-CE3** y que se encuentra 33pb hacia arriba del codón de iniciación del primer ORF (figura 8), tiene un 96% de homología a la secuencia consenso de la "nod box" (fig 16). Dado que la secuencia nod box es importante para la activación de los genes **nod** y **hsn**, entonces es muy posible que la "nod box" de la región secuenciada sea necesaria para su activación.

Organización de los cuatro ORF's presentes en una región del plásmido simbiotico de R. phaseoli-CE3.

La aparente continuidad de los cuatro ORF's y la carencia de promotores ó terminadores entre los genes **nodB** y **nodC**, sugieren que los cuatro genes presentes, se encuentren organizados en una unidad transcripcional simple.

El genoma de R. phaseoli-CE3 solo contiene una copia de los cuatro ORF's.

Para determinar copias adicionales de los **ORF-1** y **ORF-2** en el genoma de **R.phaseoli-CE3**, se hicieron hibridizaciones tipo Southern de patrones de DNA total de la cepa silvestre (CE-3) y de la cepa carente del plásmido simbiótico (CFN-2001,derivada de la cepa de **R. phaseoli-CE3**), contra los siguientes detectores ;

1. Para la hibridización contra el **ORF-1**, se utilizó un fragmento Cla 1-Sph1 (figura 17).
2. Para la hibridización contra el **ORF-2**, se utilizó un fragmento Sph1-Sac1 (figura 17). Este fragmento contiene al **ORF-2** y la región amino terminal de **nodB**. Para determinar cual es la señal que corresponde al **ORF-2** , se hizo una hibridización diferencial utilizando como detector, un fragmento Pst1-BamH1 que lleva solo al gen **nodB** (fig 17) y
3. Finalmente se usó un fragmento Pst1-Pst1 que lleva la región intergénica de **nodC** (fig 17).

Como puede verse en la figura 18, no se detectó ninguna copia

adicional para el **ORF-1**. Si comparamos las señales con los detectores **ORF-1-nodB** y **nodB** (figura 18), se observa que no existen copias adicionales para ambos ORF's. Tampoco se detectaron copias extras para **nodC** (fig 19). Por lo tanto, parece ser, que cada ORF está representado solo una vez en el genoma de **R. phaseoli-CE3**.

DISCUSION.

Se encontró, por datos genéticos (9), que dos fragmentos EcoR1 de 6.8kb y 3.5kb del plásmido simbiótico de **R.phaseoli-CE3**, contienen la región involucrada en el desarrollo del nódulo en frijol .

La secuencia nucleotídica de una región de 3.262kb contenida dentro del fragmento de 6.8kb, identificó 4 ORF's que se transcriben en la misma dirección. Dos de los cuales, tienen alta homología con los genes **nodB** y **nodC** de otras cepas de **Rhizobium** (figura 12).

Varios grupos de investigación han identificado por análisis genéticos y determinación de la secuencia nucleotídica, seis genes (**nodABCIJ**) que están involucrados en el desarrollo del nódulo. Estos genes se encuentran organizados en una unidad transcripcional simple y se encuentran muy conservados entre las diferentes cepas de **Rhizobium** (16,52,62,70).

La organización de los genes **nodABC**, en **R.phaseoli-CE3** no parece ser la misma. La región que está hacia el 5' de **nodB** contiene dos ORF's. Uno de ellos consiste de 174 nucleótidos y el otro consiste de 203 nucleótidos. La distancia entre ellos es solo de 9 nucleótidos (figura 8)

La asignación de éstas dos regiones como ORF's está basada en lo siguiente :

1. Los dos ORF's están localizados entre una secuencia consenso implicada en la regulación de los genes **nod** y
2. La existencia de una secuencia que actúa como sitio de unión

a ribosoma durante la traducción, precede a ambos ORF's (figura 8).

Una comparación a nivel de DNA y de aminoácidos de la región que contiene a ambos ORF's con un banco de genes de bacterias, indica que, el primer ORF no tiene homología con alguna proteína reportada y sugiere que el segundo ORF tiene 52% de homología a nivel de DNA con los 234 nucleótidos que corresponden a la parte final del gen **nodA** de **R.leguminosarum** (figura 10). Sin embargo parece ser que a nivel de aminoácidos, no existe homología entre el gen **nodA** de **R. leguminosarum** y este ORF (figura 11). De estos datos puedo sugerir que, solo una parte del gen **nodA** de **R. phaseoli-CE3** se ha mantenido conservada.

Se sabe por diversos datos obtenidos en diferentes laboratorios, que la presencia de los genes **nodABC**, es necesaria para inducir los primeros pasos involucrados en el desarrollo del nódulo (16,52,62,70). Si tomamos esto como cierto para todas las especies de **Rhizobia**, entonces la presencia de **nodA** de **R phaseoli-CE3**, parecería ser necesaria para la formación del nódulo en frijol. Por lo tanto, si la formación de ésta estructura también depende de la presencia de los tres genes **nod**, entonces es muy posible que el gen **nodA** de ésta cepa ó algún otro gene que realice la misma función esté presente en alguna otra parte del genoma de **R. phaseoli-CE3**.

Cabe recordar aquí, que el desarrollo del nódulo en frijol por esta cepa, parece depender además de la región de 6.8kb de un fragmento EcoR1 de 3.5kb (9). Se sabe recientemente por datos ob-

tenidos del análisis de la secuencia nucleotídica de esta región (Martha Vàzquez y Carmen Quinto, datos no publicados), que el gen **nodA** de **R. phaseoli-CE3** está presente en esta región. La presencia de **nodA** en otra parte del genoma, no indica que su función sea diferente, es posible que el producto de este gen complemente la funcion de los genes **nodBC** presentes en el fragmento de 6.8kb.

Recientemente J.P.W. Young (73), mostró que el gen **nodA** de **R. phaseoli 8002** pudiera estar ausente de la región que contiene los genes **nodBC**, por lo que la separación de **nodA** de **nodBC**, no parece ser una caracteríztica exclusiva de **R.phaseoli-CE3.**

La presencia de algún otro gen dentro del operón **nod** común, tampoco es una caracteríztica particular de **R. phaseoli-CE3**. En **Bradyrhizobium** spp (**Parasponia**) se encontró un nuevo gen (**nodK**) localizado hacia arriba de **nodA** (58). Parece ser que este gen no es necesario durante los primeros pasos de la simbiosis (21) y En **Bradyrhizobium japonicum**, también existe un nuevo gen hacia arriba de los genes **nodABC**, el cual se ha denominado **nodY** (3).

La función que pudieran tener los dos ORF's localizados hacia el 5' de los genes **nodBC** de **R. phaseoli-CE3** en los primeros eventos del desarrollo del nódulo es desconocida, pero no hay que descartar la posibilidad de que funcionen en los últimos pasos del desarrollo del mismo. La construccion de fusiones entre cualqiera de los dos ORF's y el gen **lacZ** de **E. coli**, podría indicarnos si estos dos genes se transcriben junto con **nodBC** y el fenotipo involucrado en simbiosis, podría buscarse generando mutaciones o deleciones en ambos fragmentos.

El análisis de la secuencia presentada mostró que, el tercer y cuarto ORF's corresponden a **nodB** y **nodC** respectivamente. El codón de iniciación del gen **nodB** traslapa con el codón de terminación del segundo ORF (fig 6). Secuencias que traslapan el inicio de un gen con el final de otro, sugieren un acoplamiento traduccional para ambos genes (61). En **Rhizobium meliloti** se han encontrado secuencias que traslapan el inicio de **nodB** con el final de **nodA**, debido a esto la síntesis de **nodB** disminuye con respecto a la síntesis de nodA, entonces es posible que la síntesis de **nodB** de **R.phaseoli-CE3** también se vea afectada por estas secuencias y quizás la presencia del **ORF-2** sea necesaria para la regulación de la síntesis de éste gen.

Los genes **nodB** y **nodC** están separados por 104 nucleotidos (figura 8), a diferencia de los 15-20 nucleótidos encontrados entre los mismos genes de otras cepas de **Rhizobium** (16,52,62,70) . Análisis de ésta secuencia intergénica indicó que no existen terminadores ni promotores consenso de **E.coli** ó nod boxes de **Rhizobium**. El efecto que causa esta distancia en **nodC** se desconoce, pero una fusión en este gen, que contenga una deleción de la región intergénica, podría indicarnos el efecto de ésta sobre la síntesis de **nodC**.

Análisis de los perfiles de hidrofobicidad (figuras 13,14,15) muestran que, tanto la región amino terminal como la region carboxi-terminal del producto de **nodC** son altamente hidrofóbicas. Estos dominios. son caracteristicos de proteinas que se unen a membrana y de péptidos que se transportan hacia el exterior de la célula (33). La proteina NodC de diferentes cepas de **Rhizobium**

(70), presenta los mismos dominios hidrofóbicos y se han obtenido evidencias que apoyan su localización en membrana (33). M. John (33), sugiere que la proteína NodC funciona como un receptor. Dada las caracterízticas similares entre los productos polipeptídicos del gen **nodC** de **R. phaseoli-CE3** y de otras cepas de **Rhizobium**, es posible que NodC de **R. phaseoli-CE3** se encuentre asociado a membrana y funcione como un receptor.

Por la carencia de regiones altamente hidrofóbicas en el producto de **nodB**, se sugiere que como en otros **Rhizobium** (61) esta proteína se localiza en el citosol de la célula.

El **ORF-1** y el **ORF-2**, carecen también de regiones altamente hidrofóbicas, por lo que es posible que como **nodB** se localicen en el citosol de la célula.

La expresión de los operones **nod** y **hsn** dependen de la presencia del producto de **nodD**, de los compuestos excretados por la raíz de la planta huésped y de las secuencias promotoras. Las secuencias promotoras denominadas "nod box" se encuentran localizadas a 100-250pb del primer gen del operón (66) En **R phaseoli-CE3**, se localizó una secuencia con 95% de homología a la secuencia "nod box". Esta secuencia precede a los 4 ORF's y se localiza a 33pb del codón de iniciación (ATG) del primer ORF. Se desconoce hasta el momento el efecto biológico que pueda causar la distancia de la "nod box" con respecto al ATG del primer ORF. Al comparar la "nod box " de **R.phaseoli-CE3** con la de los otros **Rhizobium** se observa que se conservan las tres secuencias consenso y la distancia entre ellas (figura 16).

Los cuatro ORF's secuenciados parecen estar organizados en una unidad transcripcional simple, puesto que no se encontraron secuencias terminadoras ni secuencias promotoras consenso de **E.coli** o de **Rhizobium** en la región intergénica de los genes **nodB** y **nodC**.

Como se mencionó antes, los operones **nod** y **hsn** reportados hasta la fecha, presentan en el 5' secuencias promotoras que están involucradas en su expresión. Esta expresión depende también de la presencia de los compuestos excretados por las raíces de las leguminosas (flavonas) y del producto del gen **nodD**. La secuencia "nod box", localizada hacia el 5' del operón secuenciado, sugiere que esta región es importante para su regulación.

El gen **nodA** localizado en el fragmento de 3.5 Kb, tiene hacia el 5' una secuencia " nod box" (M. Vazquez y C. Quinto). La presencia de estas regiones en el operón secuenciado y el gen **nodA** sugiere que la expresión de estos genes depende de la presencia del compuesto flavonoide.

Dada la importancia que tiene la expresión de los genes **nodABC** para la formación del nódulo, es posible que, los productos de los genes **nodA** y **nodBC** de **R. phaseoli-CE3** se sinteticen al mismo tiempo y de esta manera contribuyan para el desarrollo del nódulo en frijol.

La presencia del producto del gen **nodD** para la activación de los genes **nod** de **R. phaseoli-CE3** pareceria no ser necesaria (9), Pero no hay que descartar la posibilidad de que otro gen con la misma función que el gen **nodD** clásico exista en el cósmido capáz de nodular en frijol (9). Si en el plásmido simbiótico de **R.**

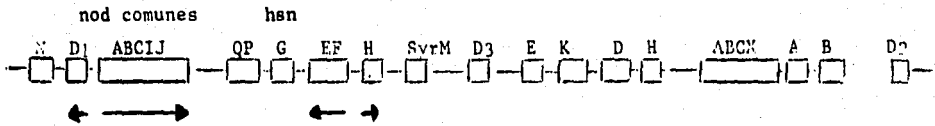
phaseoli-CE3 existen los tres componentes necesarios para la activación de los genes **nod** comunes, podriamos esperar que el mecanismo de regulación sea similar al propuesto para otros sistemas.

Finalmente, parece ser que los cuatro ORF's secuenciados se encuentran representados una vez en el genoma de **R.phaseoli-CE3** (figuras 18 y 19).

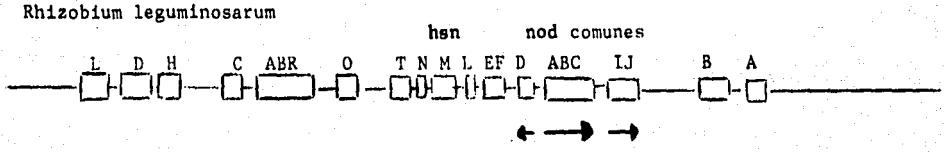
Rhizobium	Huésped
Rhizobium meliloti	Alfalfa
Rhizobium leguminosarum	
biovar **viceae**	Chicharo, Veza
biovar **trifolii**	Trebol
biovar **phaseoli**	Frijol
Bradyrhizobium japonicum	Soya
Azorhizobium caulinodans	Sesbania
Bradyrhizobium spp	Parasponia

Figura 1 **Asociación simbiótica entre Rhizobium y su planta huésped.**

Rhizobium meliloti



Rhizobium leguminosarum



Rhizobium trifolii

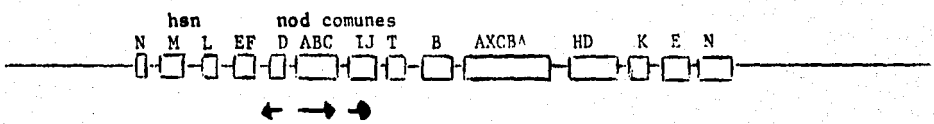
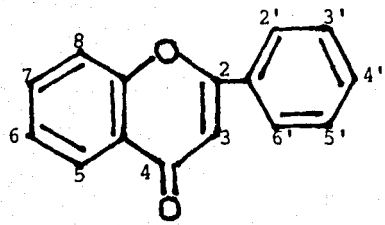
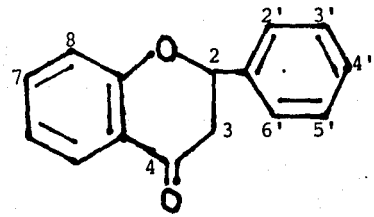


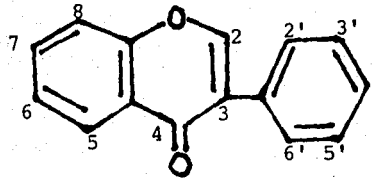
Figura 2. Organización de los genes nod comunes y hsn



Flavona



Flavanona



Isoflavona

Figura 3. Estructura de los diferentes compuestos flavonoides. Tomado de Rossen y colb.1987 TIBS 430-437.

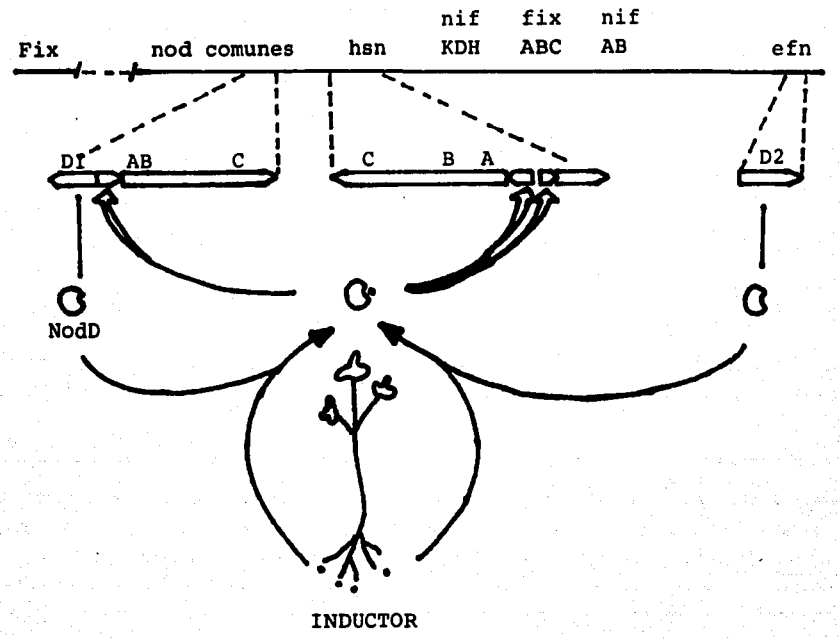


Figura 4. Modelo para la regulación de los genes nod. Tomado de Kondorosi y colbs. 1986 TIBS 11 de Julio de 1986. 296-297

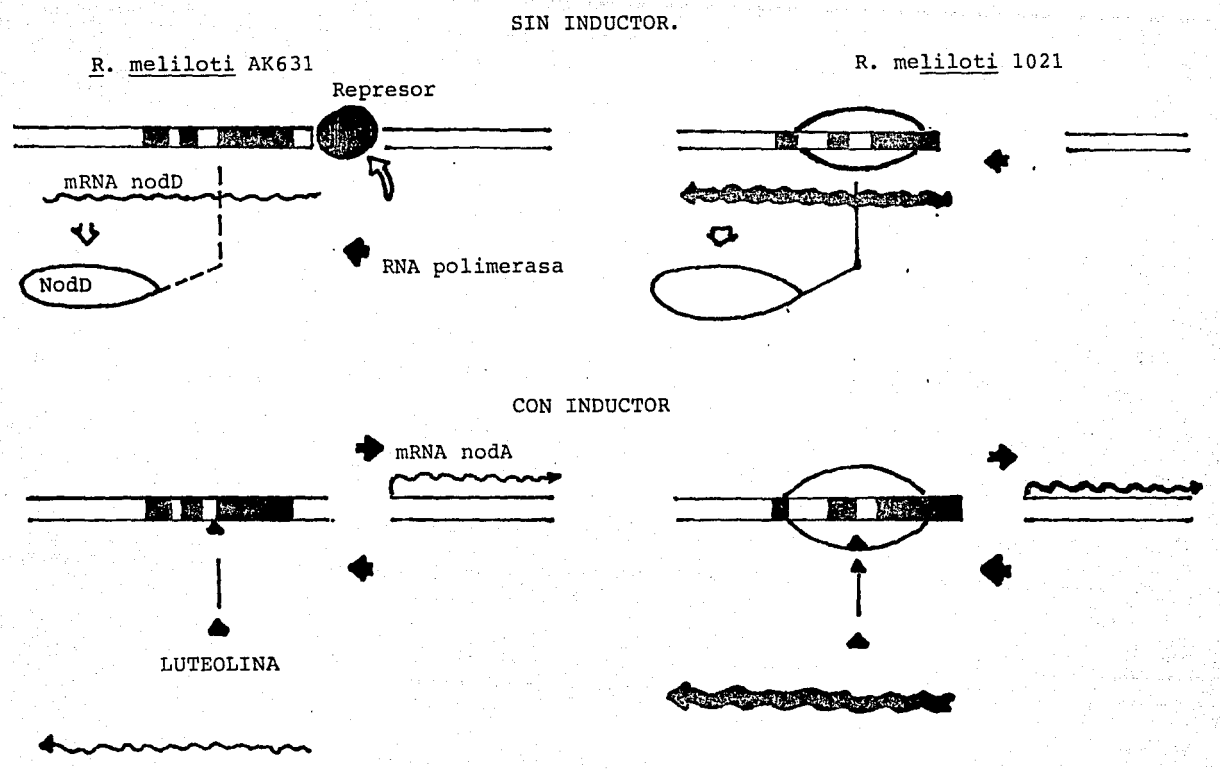


Figura 5. Modelo para la regulación de los genes nod comunes de Rhizobium meliloti. Tomado de Kondorosi y colbs 1989 The EMBO Journal 8(5): 1331-1340

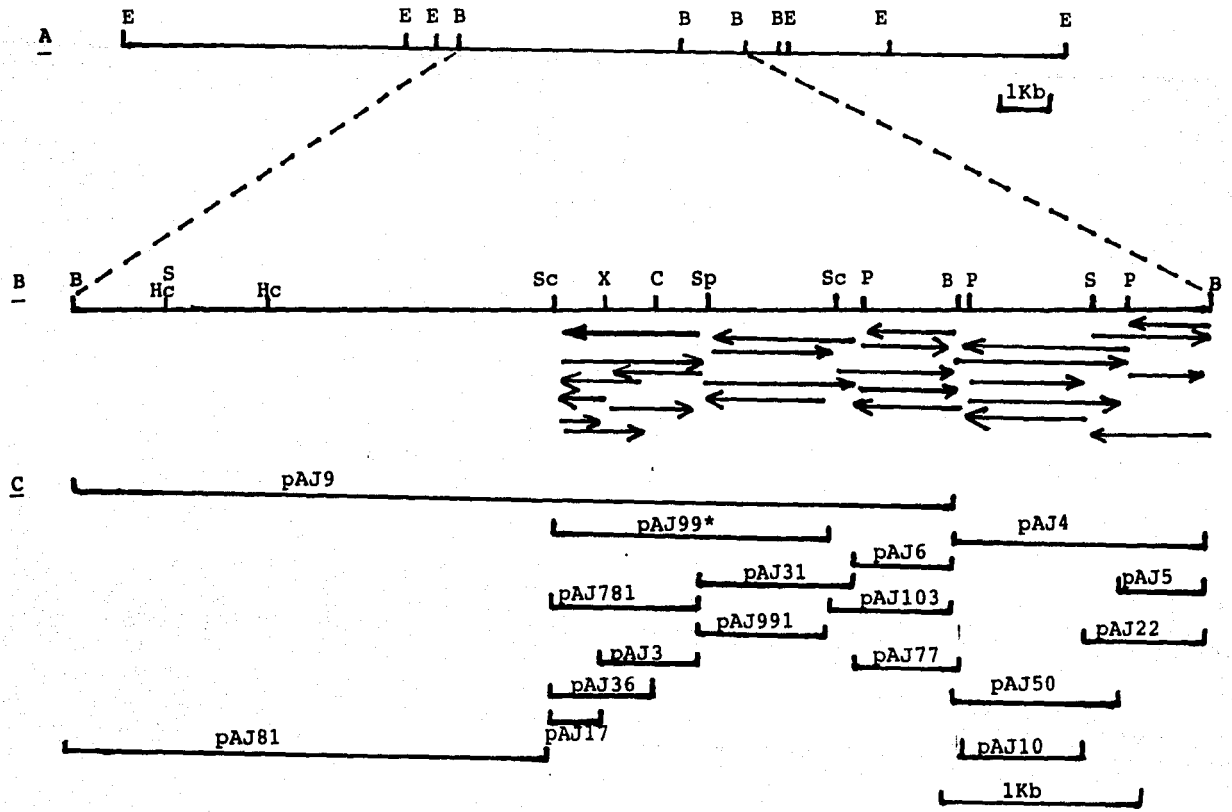


Figura 6b. A Mapa de restricción del cósmido 991-25. Tomado de Cevallos y colbs. 1989. Molecular Microbiology 3(7):879-889

B Estratégia de la secuencia nucleotídica.

C Clonas utilizadas para obtener la secuencia nucleotídica de la región nod de R.phaseoli.

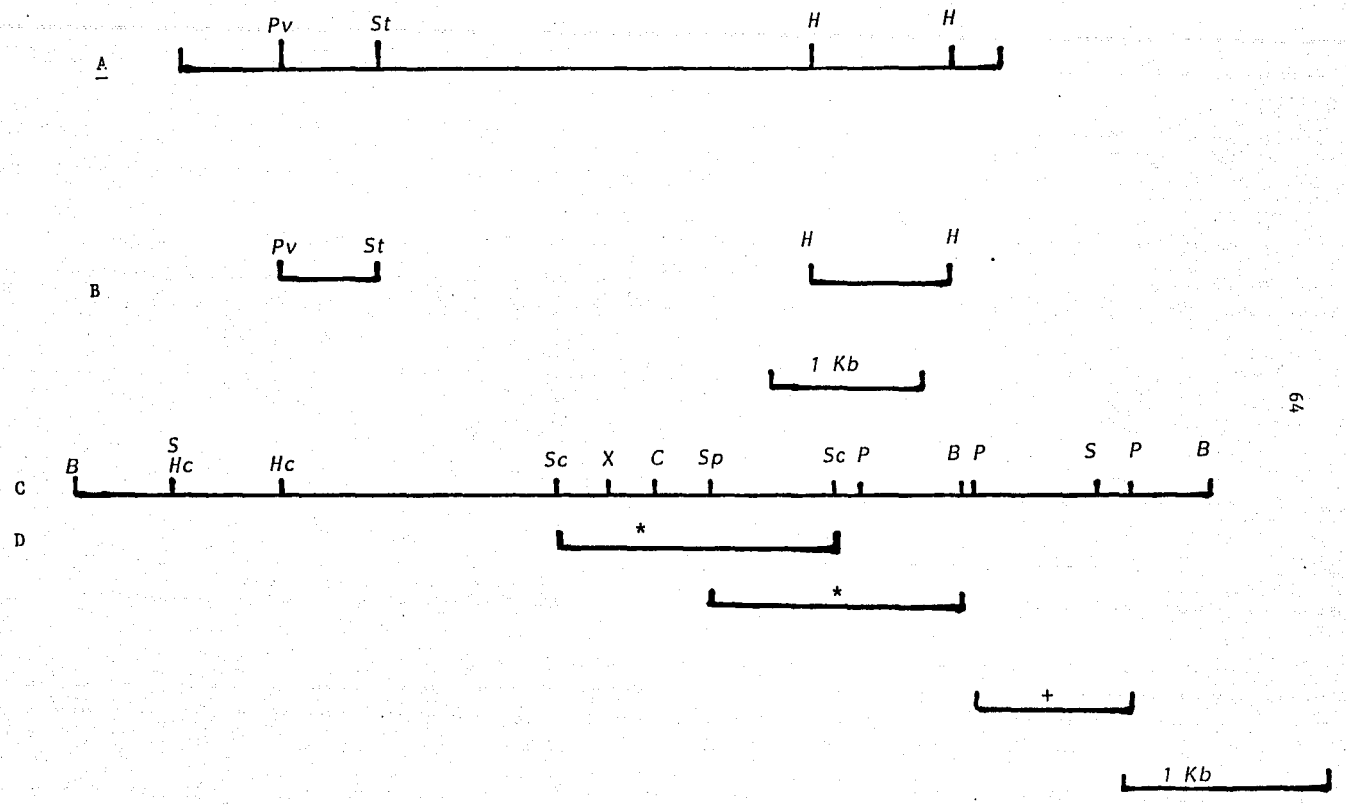


Figura 7 A. Mapa de restricción de la región nod de R. meliloti
B. Detectores específicos de los genes nod comunes de R. meliloti Tomado de Torok y colbs 1984 NAR 12(24) 9509-9524
C. Mapa de restricción de la región nod de R. phaseoli-CE3
D. Delimitación de la región nod de R. phaseoli-CE3. * Región homóloga a los genes nodAB de R. meliloti
+ Región homóloga a nodC de R. meliloti.

```
GAGCTCGGTTACCTCCACTTGGAGCCCATCGCGCCCGTTTGTTTTCCAAATGTGTTCCG -500

CGCTACGACAACAGCCTCGATCCATAGTCGCGTGGTCGTCACAGCATTATTGGACCGCCT -440

GCTTTCACCTCTCGACGGTGGTCACCATCCGGGCGACGATTATCGGCTTAGCAAAAGCGA -380

CGCTCCGACCGTCTGCGGAAGATTGGGGCCAGTGCTCGGATCTAACGAAACGCAAACCGA -320

TGCGGTCCGTTCTTAATTCGGAAGTGGGACTAGTTCTCGAGTCGTTTGACAGCCATAGCG -260

ATCAATCTATCCGCGCTCAGCTTCGATTTCATCTGTCGAGCTTACCAGAGTAGTTAGAAG -190

CGCAATGCGAGCATGATAAGTTCGTCAAGGAGCACACGAAATCCGCGTCAAGCCACACAA -130

                          ++++++++++++++++++++++++++++++++++
CAGGCTCGTCCGTAGCAGACTGTGGCTCGAATTTATCTATGCGTGGATGGGTATCATCCA - 70

++++++++++++++++++++++++++++++++++++++!!!!!
AACAATCGATTTTACGAATTGAATGGCATGATCCATTAGACGAGCATCTTGACGGAAATC - 10

AAGTCGTCGATGGCGCGCCAGTGGTGTAGAGGGGACAAATGTGTGGCTTTGGAATGTAAT   51
          M  A  R  Q  W  C  R  G  D  K  C  V  A  L  E  C  N

GCTAGCATAAGCGTTCGATCAGCCCATTGCATCATCTTGCAATCGTCGATAGGTCGGGGT  111
 A  S  I  S  V  R  S  A  H  C  I  I  L  Q  S  S  I  G  R  G

                                                          .!
TCGCGACCAATCGTCACTTTGATCGCAAGATCGATCGTTTTGGCAAATCGGCAAAGATTA  171
 S  R  P  I  V  T  L  I  A  R  S  I  V  L  A  N  R  Q  R  L

!!!!
TGAGGCCTTTGCATGCGATTTACGTGCGTTGGGAACCGTTGCGGAAAAGGAATCGCAACT  231
 *          M  R  F  T  C  V  G  N  R  C  G  K  G  I  A  T

CCGACCATGTCGAGGGAATTTACATTCGCACTCGGTACAGTCCGCAACGAGCCGCGTATT  291
 P  T  M  S  R  E  F  T  F  A  L  G  T  V  R  N  E  P  R  I

GACAGATTCAAACGAGGCGGTCTGGTGACCGTATTTTGGGAAACGGCGTACGCTACACGC  351
 D  R  F  K  R  G  G  L  V  T  V  F  W  E  T  A  Y  A  T  R

TGCCACACGCGCGTTTCGACCTGCGTCACGCGCGGCGTCATCATCTACCTTTGGGCGGCC  411
 C  H  T  R  V  S  T  C  V  T  R  G  V  I  I  Y  L  W  A  A

                                !!!!!     @@@@.
GGTCTCGAATGCCACAGGATAATTTACCGAAAGGACGAGAAGCAATGACTGCACCTGCAT  471
 G  L  E  C  H  R  I  I  Y  R  K  D  E  K  P M* T  A  P  A

TGCTGTGCGAAGTGCACGGTGAGCGCGATGACGGCACTGGTCGTCCAAGCCTTTACTTGA  531
L  L  C  E  V  H  G  E  R  D  D  G  T  G  R  P  S  L  Y  L

CGTTCGACGACGGTCCGCATCCATTTTGTACACCGGAGATTCTCGATATTCTGGCTGAAC  591
T  F  D  D  G  P  H  P  F  C  T  P  E  I  L  D  I  L  A  E
```

```
          .         .         .         .         .         .
ACCGGGTGCCGGCAACATTCTTCGTCATCGGCGAGTTCCTGGCCGATCAATCGAAACTGA  651
H  R  V  P  A  T  F  F  V  I  G  E  F  L  A  D  Q  S  K  L

          .         .         .         .         .         .
TCCAGCGAATGATTGCAGAAGGGCATCATGAAGTCGCCAACCACACAATGACGCATCCAG  711
I  Q  R  M  I  A  E  G  H  H  E  V  A  N  H  T  M  T  H  P

          .         .         .         .         .         .
ACCTGTCTGACTGCGAACCCCGACGAGTGCAACGTCAGATACTCGAGACAAACAGAGCCA  771
D  L  S  D  C  E  P  R  R  V  Q  R  Q  I  L  E  T  N  R  A

          .         .         .         .         .         .
TAAAAATGGCGTCTCCAGGCGGTGGTGCGGCACATCCTCGAGCTCCTTACGGCATCTGGA  831
I  K  M  A  S  P  G  G  G  A  A  H  P  R  A  P  Y  G  I  W

          .         .         .         .         .         .
CCGAAGAAGTGCTCAAGGCTTCGGCGAATGCGGCAACTCATGCCGTGCACTGGTCGGTAG  891
T  E  E  V  L  K  A  S  A  N  A  A  T  H  A  V  H  W  S  V

          .         .         .         .         .         .
ATCCGCGAGACTGGTCTTCCCCGGGGGCCGACGCCATTGTTAATGATGTGCTGCAGTCTG  951
D  P  R  D  W  S  S  P  G  A  D  A  I  V  N  D  V  L  Q  S

          .         .         .         .         .         .
TCCGGCCTGGGGCAATCGTGCTTTTGCACGACGGTTGTCCTCCCGATGAAATGCAGCAAG 1011
V  R  P  G  A  I  V  L  L  H  D  G  C  P  P  D  E  M  Q  Q

          .         .         .         .         .         .
GAGCTGACCACAGTCTGCGCCACCAGACTATCATGGCGTTATCTAGCATAATTCCAGCTT 1071
G  A  D  H  S  L  R  H  Q  T  I  M  A  L  S  S  I  I  P  A

          .         .         .         .         .         .
TGCATGATCGTCCGCTTTGTATTTATACACTTCGTCTTCTCGGGAGTTCTGAAGATCCGA 1131
L  H  D  R  P  L  C  I  Y  T  L  R  L  L  G  S  S  E  D  P

          .     ::::.:::::::::.:::::::::.:::::::::.::::::::::.:
TGGATATTGCTTGACACAACCCACGACTGTGGCCGTCTCCGCTAGCACTTCTTCTAGCTA 1191
M  D  I  A  *

::::::::.::::::::::.::::::::::.::::::::::.::::::::.!!!!!!::::.
TATTTCCCAGCTTGATGATCGCGACTTGTATTTGTATCCTCGGAGTTCTGAAGATCCGAT 1251
                                                            M

          .         .         .         .         .         .
GACTATGCTTGACACAACCAGCACTGTCGCCGTCTCGCTTTATGCACTTCTCTCGACTGC 1311
  T  M  L  D  T  T  S  T  V  A  V  S  L  Y  A  L  L  S  T  A

          .         .         .         .         .         .
ATATAAAAGCATGCAGGCAGTTTATTCTCTGCCGACCGATGTTTCATTGGCGTCCCACGG 1371
  Y  K  S  M  Q  A  V  Y  S  L  P  T  D  V  S  L  A  S  H  G

          .         .         .         .         .         .
CTTGGGCGGCTTTGACGAGCTGCCCAGCGTAGATGTCATCGTGCCAAGCTTCAACGAGGA 1431
  L  G  G  F  D  E  L  P  S  V  D  V  I  V  P  S  F  N  E  D

          .         .         .         .         .         .
TCCCCGCACGCTTTCGGAGTGCCTGGCTTCTATTGCGGGTCAGGAATACGGGGGAAGGCT 1491
  P  R  T  L  S  E  C  L  A  S  I  A  G  Q  E  Y  G  G  R  L
```

```
GCAGGTTTACCTAGTTGATGACGGTTCCGAAAATCGCGAGGCTTTGCGACTTGTGCACGA 1551
 Q  V  Y  L  V  D  D  G  S  E  N  R  E  A  L  R  L  V  H  E

GGCCTTCGCGCGAGACCCCAGATTCAATATTCTCCTGCTTCCCCAGAATGTCGGCAAACG 1611
 A  F  A  R  D  P  R  F  N  I  L  L  L  P  Q  N  V  G  K  R

GAAGGCACAGGATCGCTGCGATCAGCGCTCTGCTGGAGATATGGTGTTAAACGTCGACTC 1671
 K  A  Q  D  R  C  D  Q  R  S  A  G  D  M  V  L  N  V  D  S

CGACACGATCCTCGCATCTGATGTCATCAGGAAGCTCGTGCCTAAAAATGCAAGAGTCGC 1731
 D  T  I  L  A  S  D  V  I  R  K  L  V  P  K  N  A  R  V  A

TGTCGGCCGCATGGGACAGTTGACCGGCCCGCAACCGAAACGACAGTTGGCTGACCCGTT 1791
 V  G  R  M  G  Q  L  T  G  P  Q  P  K  R  Q  L  A  D  P  F

TGATGACATGGAGTACTGGCTGGCTTGCAACGAGGAGCGTTCGCAACAAGCTCGCTTCGG 1851
 D  D  M  E  Y  W  L  A  C  N  E  E  R  S  Q  Q  A  R  F  G

TTGCGTTATGTTCTGCTCGGGCTCATGTGTTATGTACCGTTTGGTCTCGGCTTCGCTGCT 1911
 C  V  M  F  C  S  G  S  C  V  M  Y  R  L  V  S  A  S  L  L

TGACCAGTACGATGCACAGTATTTTCGGAAGCAGCGATTCGGTGAGATCGACATCCATCT 1971
 D  Q  Y  D  A  Q  Y  F  R  K  Q  R  F  G  E  I  D  I  H  L

ATCTCATGCTGAAGGCAGCTTTCGAACAGAGTATCGTCCGAGCGCGCATGCAGCGACAGT 2031
 S  H  A  E  G  S  F  R  T  E  Y  R  P  S  A  H  A  A  T  V

CGTTCCGAACAAGCTAGGACCGTATCTCGGCCAACAACTACGCTGGGCGCGGAGCACGTT 2091
 V  P  N  K  L  G  P  Y  L  G  Q  Q  L  R  W  A  R  S  T  F

CCGGACAACGTTGCTTGGTGCGCCTCTGCCCAACCTCAATCGCTTCCTTATGCTCGACGT 2151
 R  T  T  L  L  G  A  P  L  P  N  L  N  R  F  L  M  L  D  V

CGTCGGACAGAACCTCGGACCGCTGCTTCTGGACCATTCAGTGCTGACGGGACTCGCACA 2211
 V  G  Q  N  L  G  P  L  L  L  D  H  S  V  L  T  G  L  A  Q

GCTTGCATTGACGGGCACCGCGCCTTGGTTGGCAGCCCTGATGATTGTGGCCATGACGAT 2271
 L  A  L  T  G  T  A  P  W  L  A  A  L  M  I  V  A  M  T  I

AGATCGCTGCAGCGTTGTAGCGCTTCGGGCCCGCCAACTACGGTTCCTCGGATTCTCTCT 2331
 D  R  C  S  V  V  A  L  R  A  R  Q  L  R  F  L  G  F  S  L

GCATACATTCATCAATATTTTTCTGCTACTGCCCTTGAAAGCCTACGCGCTGTGCACGCT 2391
```

```
 H  T  F  I  N  I  F  L  L  L  P  L  K  A  Y  A  L  C  T  L

GAGCAACATAGCGTGGCTGTCGAGTCTGCTCTGCTGGCAACTCGAATCAACATCGACGGC 2451
 S  N  I  A  W  L  S  S  L  L  C  W  Q  L  E  S  T  S  T  A

TGATGCTCGCACTACAGAATGTTCTGACATGCGGACAGCCTCGAAGCTCAGCCCCCCGCC 2511
 D  A  R  T  T  E  C  S  D  M  R  T  A  S  K  L  S  P  P  P

ATCCTGCCAGGCGAACGACGTCTGATCGCATGTGCAGCGACGAGTAAAGATCTATTTACC 3011
 S  C  Q  A  N  D  V  *

GAGGTGAACGAGTTGACACAGAGCGACAATTATCAATTGCTGAATCGGGAACTGGCTGCA 3071

CCCGATCCATGGGGCCTCGACGCCAATCCATTCGAGCGTGACGTCACACGCAAATGCTCC 3131

TTGGCGCTTGCCCAGGGATCC                                         3152
```

Figura 8. Secuencia nucleotídica de la región nod de Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli-CE3. !!! denota las secuencias Shine-Dalgarno; +++ señala la secuencia "nod-box"; @@@ apunta el traslape entre el codón de término del ORF-2 y el de inicio de nodB; y ::: indica la secuencia intergénica entre nodB y nodC. La traducción de la secuencia se muestra mediante el código de una letra y el codón de término con el símbolo *.

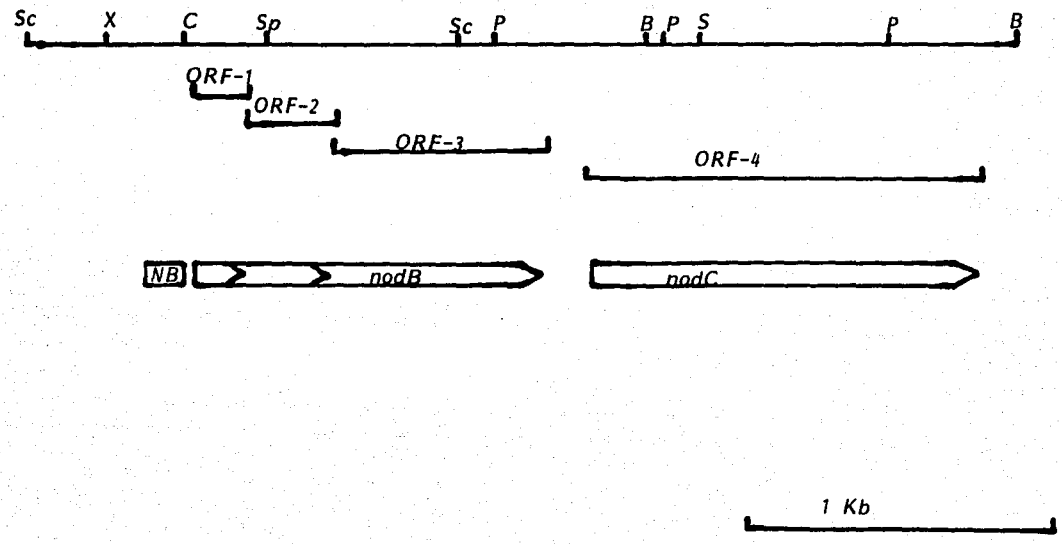


Figura 9 . Fases abiertas de lectura (ORF's) de la región nod de R. phaseoli-CE3. NB es la secuen-

```
R. leguminosarum bv phaseoli (ORF-2) atgcgatttacgtgcgttgggaaccgtt
R. leguminosarum bv viceae  nodA     ---------------------------

R. pha.     gcggaaaaggaatcgcaactccgaccatgtcgagggaatttacattcgcac-t
                          : : :: :  :  :: ::: :   :: :::: ::   :
R. leg.                  ccgattctgcgcgagttgagcg---ttccatttgc-ttt

R. pha.     cggtacagtccgcaacgagccgcg------tattgacagattcaaacgaggcg
            ::: ::::: ::: :::    :::      ::: ::  ::: :   ::::  :
R. leg.     cggaacagttcgccacgccatgcggaatcatatggaaagatactgccgagacg

R.pha.      gt-ctggtgaccgtattttgggaaacggcgtacgctacacgctgccacacgcg
            :: : :        ::    ::     : :: ::::  ::::: ::: :::::
R. leg.     gtaccgcaaatatcatgaccgggctgcgtgtgcgctcgacgcttccagacgcg

R._pha.     cgtttcgacctgc--gtcacgcgcggcgtcatcatctacctttgggcggccgg
            : :: :::::::  : :::::;;   :      ::  : : : :: ::
R. leg.     cattccgacctgccagccacgcgcactgaagatgtcctcgtattggtggttcc

R._pha.     tctcgaatgccacaggataatttaccgaaaggacgagaagcaatga
              ::::  : :  : ::     : ::     :
R. leg.     cgtcgaccgtccaatgactgagtgcccgcgggctcgttga
```

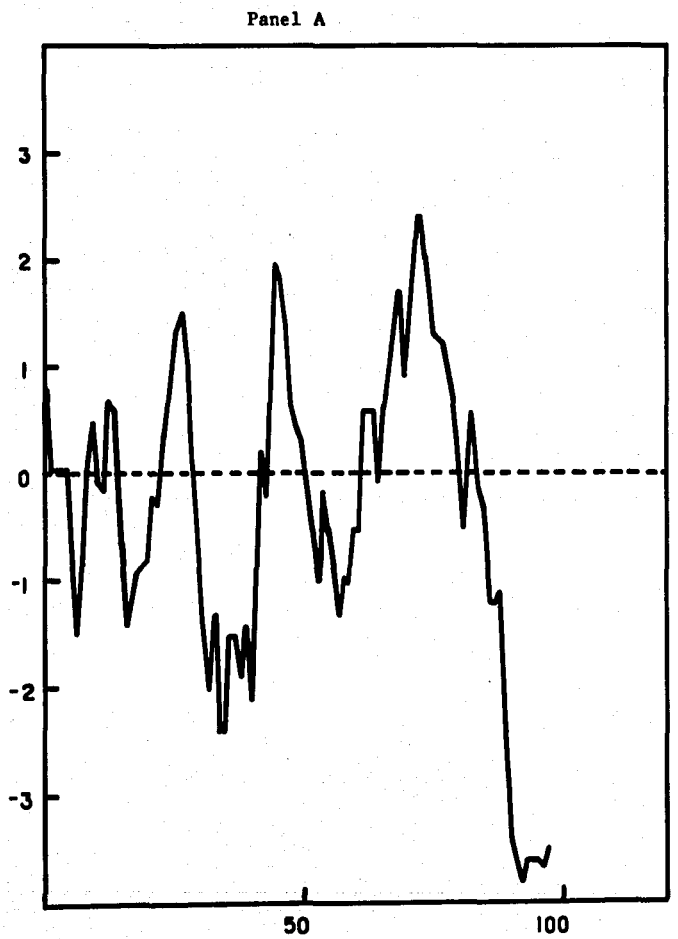
Figura 10 Comparación de las secuencias nucleotídicas del ORF-2 de R.phaseoli-CE3 y de nodA de R. leguminosarum (53)

```
R. phaseoli        mrftcvgnrcgkgiatptmsreftafal--------------------
Bradyrhizobium     mniavsrsaeepsartqvqwslrwenwlqladhaeladffrbsygptg
R. meliloti        mslkvqwklcwenqleradhgelseffrksygptgafhakpfeggrsw
R. leguminosarum
biovar viceae      mgrrerfnakpfetgrswggarperraiaydshgvashmgllrrfikv
R. leguminosarum
biovar trifolii    msagvrwkitwendlepsdhaelseffeatygptgafnakpfetgrsw

R. phaseoli_       ----------------------------------------------
Bradyrhizobium     afnaqpfegnrswagarpelraigydargvrahigllrrfikidgvdl
R. meliloti        agarperraiaydsvgiashmgvlrrfikvgetdllvaelglyavrpd
R. leg.bv.viceae   gttdllvaelglygvrpdleglgiahsvramfpilrelsvpfaf----
R. legbvtrifolii   agarperraiaydskgiashmgllrrfikvgdtdllvaelglygvrpd

R. phaseoli        ---------------------------------------GTV nepr
Bradyrhizobium___  lvaelglyavrpdleglgishsmrvmypalqqlgvpfgf GTV pale
R. meliloti        lermgiahsvgaltptlrelgvpfaf------------- GTV hamr
R. leg.bv viceae   ------------------------------------- GTV hamr
R._legbvtrifolii   leglgiphsiralapalqelavpfaf------------- GTV hamr

R. phaseoli        idrfkrgglvtvfwetayatrchtrvstcvtrgviiylwaaglechri
Bradyrhizobium     rhltrlvgrqglatlmsgvrvrstqpdvypnlspiriedvlvvvfple
R. meliloti        nhverycqngmasiltgvrvrssiaevnadlpstrtedplvvifpvgr
R._leg.bv viceae_nhverycqngmasiltgvrvrssiaevnadlpstrtedplvvifpvgr
R. legbvtrifolii_nhevrfcrdgisnivtgvrvrstlpdalpdmpstrtedvlvlvfpigr

R. phaseoli        iyrkdek-------------
Bradyrhizobium     rpigewppagtiidrngpel
R. meliloti        plnewppgtlierngsel--
R. leg.bv viceae   plnewppgtlierng-----
R._legbvtrifolii   pmsewpagslierngcel--
```

Figura 11 Comparacion de la traducción de las secuencia nucleotidica del **ORF-2** de **R. phaseoli-CE3** con la traducción de **nodA** de diferentes cepas de **Rhizobium**. Las letras en mayusculas denotan la homologia entre el **ORF-2** y **nodA**.

		R.leguminosarum	R.meliloti	R.trifolii	Bradyrhizobium
R.phaseoli CE3	nodB	60%	53%	46%	53%
	nodC	49%	51%	--	63%

Figura 12 Homologías entre los productos polipeptídicos de nodB y nodC de R.phaseoli-CE3 y los productos polipeptídicos de nodB y nodC de diferentes cepas de Rhizobium.
- indica que no se hizo la comparación.



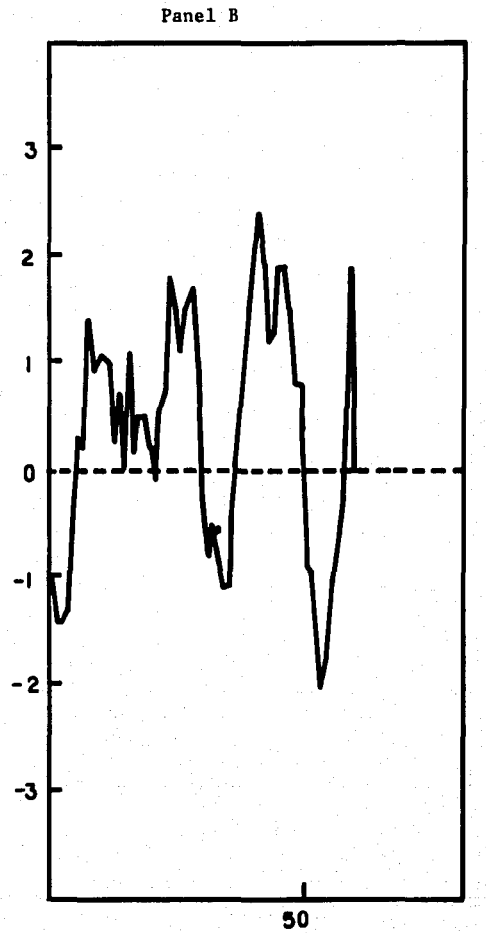


Figura 13. Perfiles de Hidrofobicidad. El grado de hidrofobicidad fué calculado como el promedio de la hidrofobicidad relativa de 12 residuos de aminoácidos. Panel A:ORF-2; Panel B ORF-1

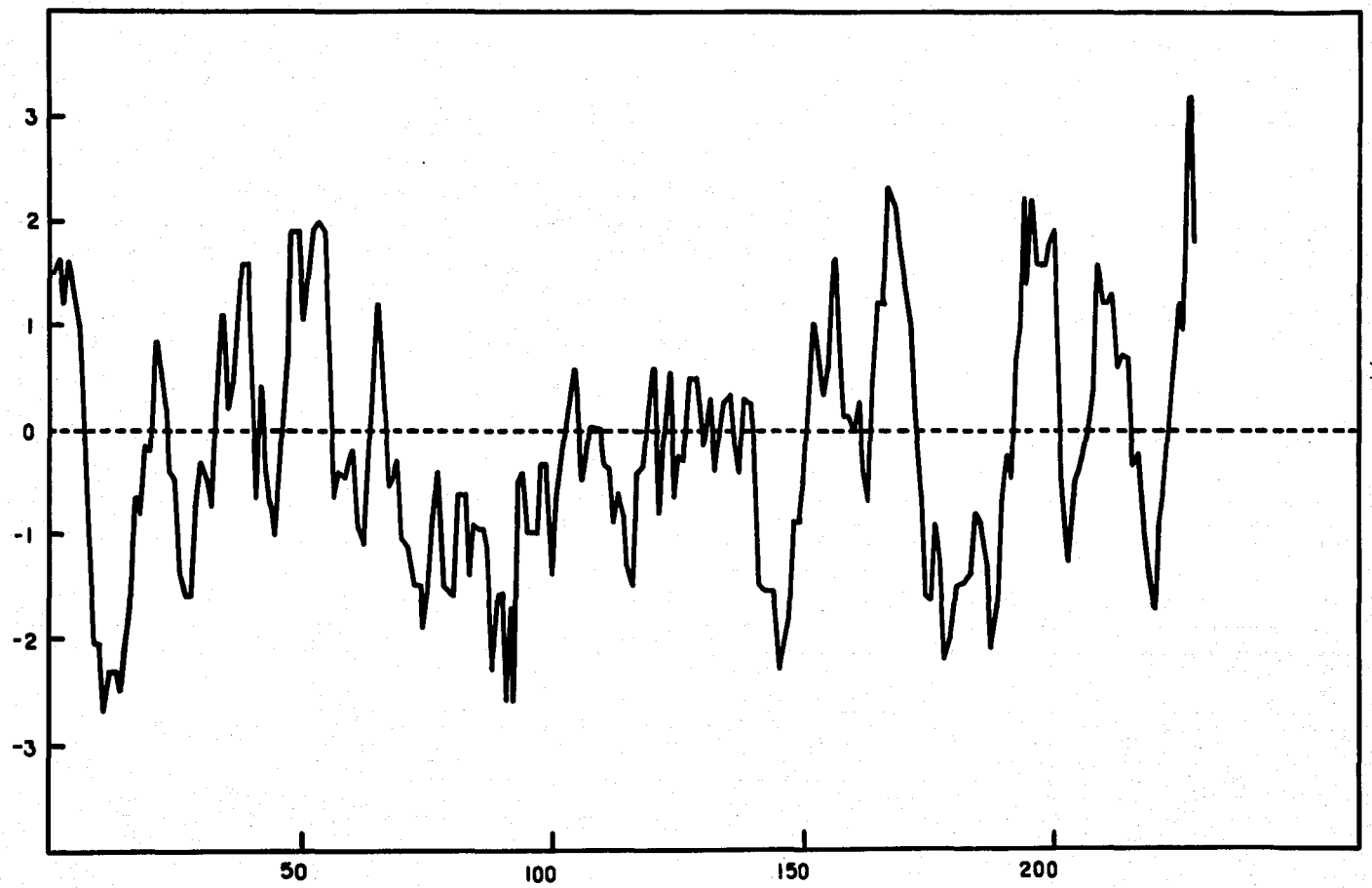
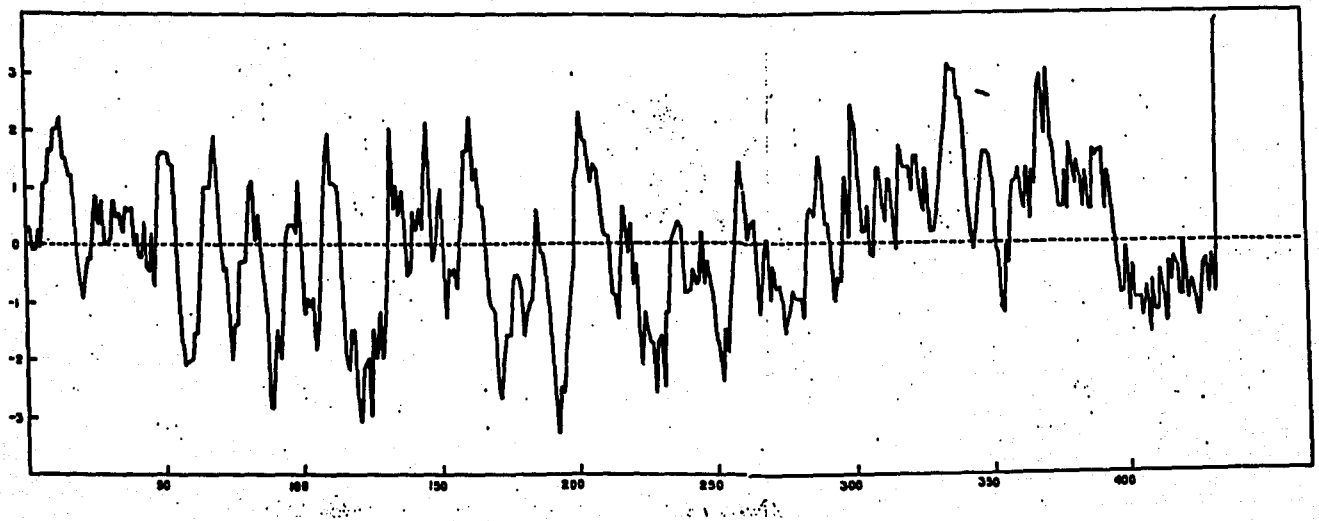


Figura 14 . Perfil de Hidrofobicidad del gen nodB de Rhizobium phaseoli-CE-3



Fugura 15. Perfil de Hidrofobicidad de nodC de R. phaseoli-CE3

Rhizobium leguminosarum bv viceae

nodA
gggttgaatatccattccatagatgattgccatccaaacaatcaattttaccaatctttcggatcacttatagaaa
nodF
cgagccacaatccatagtgtggatgcttttgatccacacaatcaattttaccaatgatgccatatgatccatagc
nodM
gtgggcgacatccatatcgtggatgtaggctatcccaacaatcaattttactaatctgtttggatttattagcac

Rhizobium leguminosarum bv trifolii.
nodA
gcattctcgatccacgctgtagatgattgcgatccaaacaatcaattttaccaatctttcggagtgcttattaga
nodF
cattccttcatccatactgcggatgctttcgatccaatcaatcaattttaccaatccttcggcatgctccatagc

Rhizobium meliloti
nodA
atgtgcggcatccatatcgcagatgatcgttatccaaacaatcaattttaccaatcttgcagagtcctattagag
nodF
gtcacagacatccatttcacggatggccgacatccaaacaatcgattttaccaatcccactgatatgtagcacaa
nodH
cgttctcatattcacaggctggatccctctcataaaaacaatcgattttaccaatctgggcgactgcgattaaaa
nod4
tctttcttatccatagggtggatgattgctatcctcataatcgattttaccaatcttgctgaatgttatttagg
nod5
gctgatgtcatccaccgcgcggataaaggtg-tccaaacaatcgattttactaatcatcaagtgtgctcgatagg
nod6
atgtgcggtatccatagcggagatgat-tgttcccaaacaatcgattttaccaatcccattagagaaccctgaaa

Bradyrhizobium parasponia
tgtgagtctatccatcgtgtggatgtattctatcgaaacaatcgattttaccagattgcggaatgttggatagca

Bradyrhizobium japonicum
gatgagtctatccatcgtgtggatgtgttctatcgaaacaatcgattttaccaaactggggg

Rhizobium leguminosarum bv phaseoli-CE3
ctcgaatttatctatgcgtg-gatgggtatcatccaaacaatcgattttacgaattgaatggcatgatccattag

CONSENSO atccay..yuyugatg....y.atc.aaacaatcuattttaccaatcy 1-13pb at(t)ag

Figura 16 Secuencias promotoras (nod box), que preceden a los operones nod comunes y hsn. nod4, nod5, nod6 son otras regiones involucradas en nodulación. Tomado de Spaink y colaboradores. 1987 Plant Molecular Biology 9:27-39

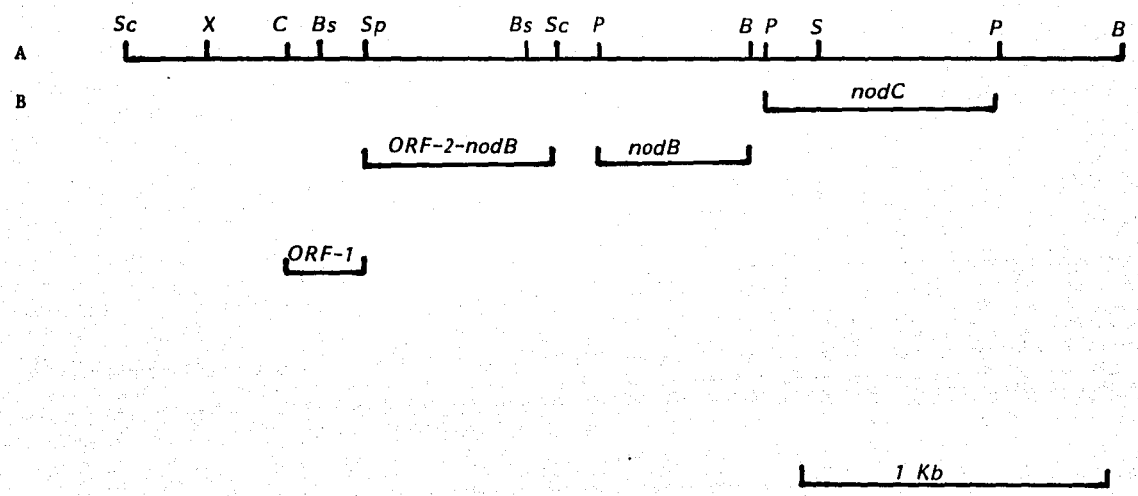


Figura 17. A: Mapa de restricción de los 4 ORF's de la región nod de R. phaseoli-CE3.
B: Detectores específicos para cada ORF

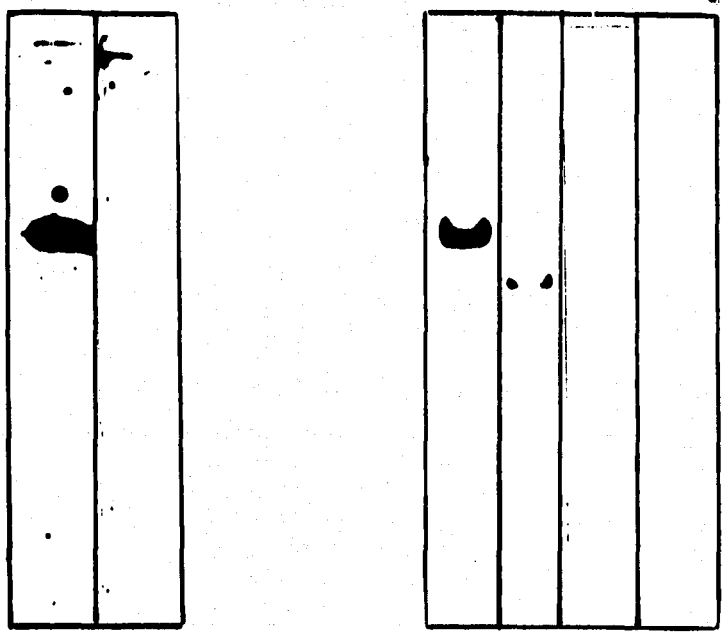
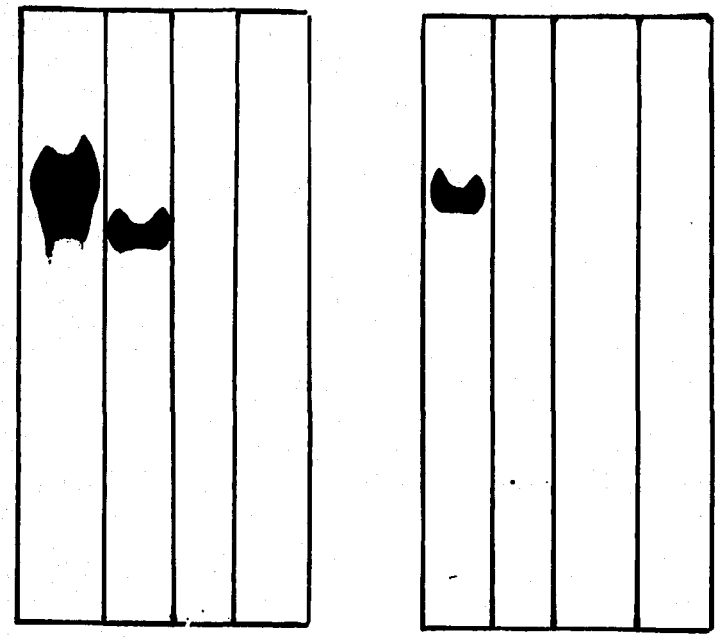


Figura 18. PanelA. Hibridización de genomas totales de las cepas de R. phaseoli-CE3 digerido con EcoRl (carril1) y de la cepa de R. phaseoli-2001 digerido con EcoRl carril 2) contra el ORF-1. Panel B. Hibridización de genomas totales de la cepa CE3 digerido con EcoRl y BamHl (carril 1 y 2) y de la cepa 2001 digerido con EcoRl y BamHl (carril 3 y 4) contra el ORF-2-nodB.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA



A B

Figura 19. Panel A. Hibridización de genomas totales de las cepas de R. phaseoli-CE3 digerido con EcoRl y BamHl (carril 1 y 2) y de la cepa R. phaseoli-2001 digerido con EcoRl y BamHl (carril3 y 4) contra el gen nodB. Panel B Hibridización de la cepa R. phaseoli CE-3 digerido con EcoRl y BamHl (carril 1 y 2) y de la cepa 2001 digerido con EcoRl y BamHl (carril 3 y 4) contra el gen nodC

BIBLIOGRAFIA

1.- Ashton J. Delavney and Desh Pal. S. Verma. 1988 Cloned Nodulin Genes for Symbiotic Nitrogen Fixation. Plant Molecular Biology Reporter.Vol 6(4): 279-285

2.- Backman K and Ptashne,M. 1978 Cell 13: 65-71

3.- Z. Banfalvi, Anthony Nieuwkoop, Maria Schell, Linda Besl,and Gary Stacey. 1988. Regulation of **nod** gene expression in **Bradyrhizobium japonicum.** Mol. Gen Genetic 214:420-424c

4.- Banfalvi, Z. and Kondorosi, A. 1989. Produccion of root hair deformation factors by **Rhizobium meliloti** nodulation genes in Escherichia coli: HsnD(**nodH**) is involved in the plant host-specific modification of the NodABC factor. Plant Molecular Biology 13:1-12

5.- Bender, G. L., Nayudu, M., Le Strange, K. K., and Rolfe, B. G. 1988.The **nodD1** Gene from **Rhizobium** strain NGR234 Is a Key Determinant in the Extension of Host Range to the Nonlegume Parasponia Molecular Plant-Microbe Interactions. 1(7): 259-266

6.- D. Boorthakur, J.A. Downie, A. W.B. Johnston and J.W. Lamb. 1985. **psi**, a plasmid-linked **Rhizobium phaseoli** gene that inhibits exopolysaccharide production and wich is required for symbiotic nitrogen fixation.. Mol.Ge Genetic 200:278-282

7.- D. Boorthakur and A.W.B. Johnston 1987 Sequence of **psi**, a gene on the symbiotic plassmid of Rhizobium phaseoli wich inhibits exopolysaccharide synthesis and nodulation and demonstration that its transcription is inhibited by psr, another gene on the symbiotic plasmid. Mol Ge Genetic 207: 149-154

8.- Cervantes, E., Sharma, S. B., Maillet, F., Vasse, J., host range nodQ gene encodes a protein which shares homology with translation elongation and initiation factors. Truchet, G. and Rosenberg. C. 1989.The Rhizobium meliloti Molecular Microbiology 3(6): 745-755.

9.- Cevallos, M. A., Vazquez, M., Davalos, A., Espin, G., Sepulveda, J., and Quinto, C. 1989. Characterization of Rhizobium phaseoli Sym plasmid regions involved in nodule morphogenesis and host range specificity. Molecular Microbiology. 3(7): 879-889.

10.- Chung, C.t., Niemela, Suzanne, L snd Miller H Roger. 1989. One-Step preparation of competent **Escherichia coli**: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. Proc. Natl Acad Sci USA. vol 86 : 2172-2175.

11.- Debelle, F. and Sharma, S. B. 1986. nucleotide sequence of **Rhizobium meliloti RCR2011** genes involved in host specificity of nodulation. NAR 14(18): 7453-7472.

12.- Debellé, F.,Marllet, F., Vasse,J., Rosenberg, C. de Billy., F. Truchet., Dénarié and Ausubel F.M. 1988. Interference betwen **Rhizobium meliloti** and **Rhizobium trifolii** Nodulation genes: Genetic Basis of R. meliloti Dominance. J. Bacteriol. 170: 5717-5727.

13.-Djordjevic, M. A., Redmond, J. W., Batley, M. and Rolfe, B. G. 1987. Clovers secrete specific phenolic compounds wich either stimulate or repress nod gene expression in **Rhizo - bium trifolii**. EMBO J. 6(5): 1173-1179.
14.-Doolittle. 1982 A Simple Method for Displaying the Hydropha tic Character of a Protein. J. Mol. Biol. 157: 105-132
15.-Downie,J.A., Knight, C.D, Johston, A.W.B.and Rossen, L. 1985 Identification of genes and gene products involved in the no dulation of peas by **Rhizobium leguminosarum**. Mol. Gen. Genet 198: 255-262.
16.-Egelhoff, T. T., Fisher, R. F., Jacobs, T. W., Mulligan, J. T., and Long, S. R. 1985. Nucleotide Sequence of **Rhizobium meliloti 1021** Nodulation Genes: **nodD** Is Read Divergently from **nodABC**. DNA 4(3): 241-248.
17.-Egelhoff,T. and S. Long. 1985. Products of early nodulation genes of **Rhizobium meliloti**. In H. J. Evans . P.J. Bottom ley and W.E. Newton (ed). Nitrogen Fixation Research Pro gress. Martinus Nijhoff Publishers.
18.-Egelhoff, T. T., and Long, S. R. 1985. **Rhizobium meliloti** Nodulation Genes: Identification of **nodABC** Gene Products, Purrification of nodA Protein and Expression of **nodA** in **Rhi- zobium meliloti** J. Bact. 164(2):591-599.
19.-Evans, I. J. and Downie, J. A. 1986.The **nodI** gene product of **Rhizobium leguminosarum** is closely related to ATP-binding bacterial transport proteins; nucleotide sequence analysis of the **nodI** and **nodJ** genes. Gene 43: 95-101.
20.-Faucher, C., Camut, S., Denarie, J. and Truchet, G. 1989. The **nodH** and **nodQ** Host Range Genes of **Rhizobium meliloti** Behave as Avirulence Genes in **R. leguminosarum** bv **viciae** and Determine Changes in the Production of Plant-Specific Extracellularr Signals. Molecular Plant-Microbe Interac tions 2(6):391-300
21.-Finan, T.M., Kunkel, B., De Vos., D.F Signer, E.R. 1986 Second symbiotic megaplasmid in **Rhizobium meliloti** ca - rryng exopolysacharide and thiamine synthesis genes. J. Bacteriol 167:66-72.
22.-Firmin,J.L.,Wilson , K.E. Rossen,L.,and Johnston, A. W. W. 1986. Flavonoid activation of nodulation genes in **Rhi- zobium** reversed by other compounds present in plants. Nature 324: 90-92
23.-Fisher, R. T. and Long, S. R. 1989. DNA Footprint Analysis of the Transcriptional Activator Proteins NodD1 and nodD3 on Inducible **nod** Gene Promoters. J. Bact. 171: 5492-5502.
24.-Gerhold, D., Stacey, G. and Kondorosi. 1989. Use of a promo- ter-specific prob to identifi two loci from the **Rhizobium meliloti** nodulation regulon. Plant Molecular Biology : 181-188.
25.-Gottfert, M., Lamb, J. W., Gasser, R., Semenza, J., and Hennecke, H. 1989. Muttational analysis of the **Bradyrhizo- bium japonicum** common **nod** genes and further nod box linked genomic DNA regions. Mol. Gen. Genet. 215: 407-415.

26.-Francine Govers, Marja Moerman,J. Allan Downie, Paul Hooykaas, Henk J. Franssen, Jeanine Louwerse, Albert van Kammen and Ton Bisseling. 1986 **Rhizobium nod** genes are involved in inducing an early nodulin gene. Nature 323:564-566

27.-Hahn, M. and Hennecke, H. 1988. Cloning and Mapping of a Novel Nodulation Region from **Bradyrhizobium japonicum** by Genetic Complementation of a Deletion Mutant. Applied and Enviromental Microbiology. 54(1): 55-61.

28.-Hartwig, U. A., Maxwell. C. A., Joseph, C. M., and Phillips, D. A. 1990. Chrysoeriol and Luteolin Released from Alfalfa Seeds Induce **nod** Genes in **Rhizobium meliloti**. Plant Physiol. 92. 126-122

29.-Hong, G. -F., Burn, J. E. and Johnston, A. W. B. 1987. Evi - dence that DNA involved in the expresion of nodulation (**nod**) genes in **Rhizobium** binds to the product of the regulatory gene **nodD** NAR 15(23): 9677-9690.

30.-Honma, M. A., and Ausubel, F. M. 1987. **Rhizobium meliloti** has three functional copies of the **nodD** symbiotic regulatory gene. Poc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 8558-8562.

31.-P. J. J. Hooykaas., A.M. Ledeber., J. Wikijne., R.A. Schil peroort ., M. P Nuti ., A.A. Lepidi., F.Casse., C. Bouchar ., J.S. Julliot and J. Dénarié. 1978 Detection, Isolation and Characterization of Large Plasmids in **Rhizobium.** I.H.J. Evans. P.J. Bottomley and W.E. Newton (Ed) Nitrogen Fixation Research Progress Martinus Nijhoff Publishers .

32.-Horvath, B., Bachem, C. W. B., Schell, J. and Kondorosi, A. 1987. Host-specific regulation of nodulation genes in **Rhizobium** is mediated by a plan-signal, interacting with the nodD gene product. EMBO J. 6(4): 841-848.

33.-John, M., Schmidt, J., Wieneke, U., Krussmann, H-D. and Schell, J. 1988. Transmembrane orientation and receptor-like structure of the **Rhizobium meliloti** common nodulation pro - tein nodC. EMBO J. 7(3): 583-588.

34.-John, M., Schmidt, J., Wieneke, U., Kondorosi, E., Kondorosi A. and Schell, J. 1985.Expression of the nodulation gene nodC of **Rhizobium meliloti** in **Escherichia coli** role of the nodC gene product in nodulation. EMBO J. 4(10): 2425-2430.

35.-Johnson, D., Roth, L. E. and Stacey, G. 1989. Immunogold Localization of the NodC and NodA Proteins of **Rhizobium meli loti.** J. Bact. 171 (9): 4583-4588.

36.-Kondorosi, E., Banfalvi, Z., Kondorosi, A. 1984. Physical and Genetic Analysis of a Symbiotic Region of **Rhizobium meliloti:** Identification of Nodulation Genes. Mol. Gen. Genet. 193: 443-452

37.-Kondorosi, E., Gyuris, J., Schmidt, J., John, M., Duda, E., Hoffmann, B., Schell, J. and Kondorosi, A. 1989. Positive and negative control of **nod** gene expression in **Rhizobium meliloti** is required for optimal nodulation EMBO J. 8(5): 1331-1340

38.-Leigh, J.A., Signer, E.R. and Walker, G.C. 1985. Exopolysacharide-deficient mutants of **Rhizobium meliloti** that form ineffective nodules. Proc Natl.Acad. Sci. U.S.A. 82: 623-634.

39.-Lipman. D.J. and Person, W.R. 1985. Rapid and Sensitive Protein Similarity Searches. Science 227: 1435-1441
40.-Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
41.-Esperanza Martínez, David Romero and Rafael Palacios.1990 The **Rhizobium** Genoma. Plant Sciences.Vol9(1):59-93
41'-Martínez, H. Sequencee Analysis Programs Manual. 1987
42.-Maxwell, C. A., Hartwig, U. A., Joseph, C. M. and Phillips, D. A. 1989. A Chalcone and Two related Flavonoids Released from Alfalfa Roots Induce nod Genes of **Rhizobium meliloti.** Plant Physiol. 91: 842-847.
43.-Mulligan, J. T. and Long, S. R. 1989.A family of Activators Genes Regulates Expression of **Rhizobium meliloti** Nodulation Genes. Genetics 122: 7-18.
44.-Mulligan, J. T. and Long, S. R. 1985. Induction of **Rhizobium meliloti nodC** expression by plant exudate requires nodD Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6609-6613.
45.-Peters, N. K., Frost, J. W. and Long, S. R. 1986. A Plant Flavone, Luteolin, Induces Expression of **Rhizobium meliloti** Nodulation Genes. Science 233: 977-979.
46.-Peters, N. K., and Verma, D. P. S. 1990. Phenolic Compounds as Regulators of Gene Expression in Plant- Microbe Interac - tions. Molecular Plant- Microbe Interactions. 3(1): 4-8.
47.-Redmond, J. W., Batley, M., Djordjevic, M. A., Innes, R. W. Kuempel, P. L. and Rolfe, B. G. 1986. Flavones induce expression of nodulation genes in **Rhizobium.** Nature 323: 632-635.
48.-Rodriguez-Quinones, F., Banfalvi, Z., Murphy, P. and Kondorosi, A. 1987. Interspecies homology of nodulation genes in **Rhizobium.** Plant Molecular Biology 8: 61-75.
49.-Rhoads, D.D. and Roufa D.J. 1989. Molecular Genetics Laboratory Center for Basic Cancer Research. Kansas State University Manhattan, K.S. U.S,A. 66506
50.-Rolfe B.G., M. Balley., J.W. Redmon., A.E. Richardson., R. J. Simpson., B.J. Bassan., C.L. Sargent., J.J. Weinman., M. A. Djorfjevic and F.B. Dazo. 1988 Phenolic compounds secreted by legumes. 405-410 Bothel de Bruijn Newton (Eds) Nitogen Fixation Hundred Years. After Gustav Fischer Suttgart New York 1984.
51.-Rolfe, B. G. 1988. Flavones and isoflavones as inducing subs tances of legume nodulation. BioFactors 1(1): 3-10.
52.-Rossen, L., Johnston, A. W. B. and Downie, J. A. 1984. DNA sequence of the **Rhizobium leguminosarum** nodulation genes **nodAB** and C required for root hair curling. NAR 12(24): 9497-9508
53.-Rossen, L., Shearman, C. A., Johnston, A. W. B. and Downie, J. A. 1985. The **nodD** gene of **Rhizobium leguminosarum** is autoregulatory and in the presence of plant exudate induces the **nodA,B,C** genes. EMBO J. 4(13)3369-3373.
54.-Rossen, L., Davis, E. O. and Johnston, A. W. B. 1987. Plant induced expression of **Rhizobium genes** involved in host speci ficity and early stages of nodulation. TIBS 12: 430-433.

55.-Rostas, K., Kondorosi, E., Horvath, B., Simoncsits, A. and Kondorosi, A. 1986.Conservation of extended promoter regions of nodulation genes in **Rhizobium**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 1757-1761.

56.-Shearman. C.A., Rossen, L., Johnston, A.W.B. and Downie J.A. 1986. The **Rhizobium leguminosarum** nodulation gene **nodF** enco des a polypeptide similar to acyl-carrier protein and is re gulated by **nodD** plus a factor in pea root exudate. EMBO J 5(4):647-652

57.-Sanger, F., N. Nicklen and Coulson A.R. 1977 DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci. U.S.A. 74: 5463-5467.

58.-Scott, K.F. 1986 Conserved nodulation genes from the non-le gume symbiont **Bradyrhizobium sp (Parasponia)**. NAR 14(7): 2905-2919

59.-Schlaman, H. R. M., Spaink, H. P., Okker, R. J. H. and Lugtenberg, B. J. J. 1989. Subcellular Localization of the **nodD** Gene Product in **Rhizobium leguminosarum**. J. Bact. 171(9):4686-4693

60.-Schmidt, J., John, M., Wieneke, U., Krussmann, H. and Schell J. 1986. Expression of the nodulation gne **nodA** in **Rhizobium meliloti** and localization of the gene product in the cytosol Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 9581-9585.

61.-Schmidt, J., Wingender, R., John, M., Wieneke, U. and Schell J. 1988. **Rhizobioum meliloti nodA** and **nodB** genes are involved in generating compounds thatt stimulate mitosis of plant cells Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 8578-8582.

62.-Schofield, P. R. and Watson, J. M. 1986. DNA sequence of **Rhi zobium trifolii** nodulation genes reveals a reiterated and po tentially regulatory sequence preceding **nodABC** and **nodFE** NAR 14(7): 2891-2919.

63.-Schwedock, J. and Long, S. R. 1989. Nucleotide Sequence and Protein Products of Two New Nodulation Genes of **Rhizobium meliloti**,**nodP** and **nodQ**. Molecular Plant-Microbe Interactions 2(4): 181-194.

64.-Sharon R, Long 1989 **Rhizobioum**-Legume Nodulation: Life Together in the Underground. Cell vol 56: 203-214

65.-Spaink, H. P., Wijffelman, C. A., Pees, E., Okker, R. J. H. and Lugtenberg, B. J. J. 1987. **Rhizobium** nodulation gene **nodD** as a determinant of host specificity Nature 328: 337-340.

66.-Spaink, H. P., Okker, R. J. H., Wijffelman, C. A., Pees, E. and Lugtenberg, B. J. J. 1987. Promoters in the nodulation region of the **Rhizobium leguminosarum** sym plasmid pRL1J1 Plant Molecular Biology 9: 27-39.

67.-Spaink, H. P., Wijffelman, C. A., Okker, R. J. H. and Lugtenberg, B. J. J. 1989. Localization of functional re - gions of the **Rhizobium nodD** product using hybrid **nodD** genes. Plant Molecular Biology 12: 59-73

68.-Spaink, H. P., Weinman, J., Djordjevic, M. A., Wijffelman, C. A., Okker, J. H. and Lugtenberg, B. J. J. 1989. Genetic analysis and cellular localization of the **Rhizobium** host spe cificity-determining **nodE** protein. EMBO J. 8(10):2811-2818.

69.-Surin, B. P. and Downie, J. A. 1988. Characterization of the **Rhizobium leguminosarum** genes **nodLMN** involved in efficient host-specific nodulation. Molecular Microbiology 2(2): 173-183

70.-Torok, I., Kondorosi, E., Stepkowski, T., Posfai, J. and Kondorosi, A. 1984.Nucleotide sequence of **Rhizobium meliloti** nodulation genes. NAR 12(24): 9509-9524.

71.-J.M. Vincent 1980 Factors Controlling the Legume-**Rhizobium** Symbiosis. Nitogen Fixation. Volume 11 Symbiotic - Associations and Cyanobacteia. Edited by William E. Newton and William H. Orm-Johnson.

72.-Yanish-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains:nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 33: 103 -119.

73.-Young, J. P. W. and Johnston, A. W. B. 1989.The Evolution of Specificity in the Legume-**Rhizobium** Symbiosis. Tree 4(11): 341-349.

74.-Zaat, S. A. J., Wijffelman, C. A., Spaink, H. P., van Brussel, A. A. N., Okker, R. J. H. and Lugtenberg. B. J. J. 1987. Induction of the **nodA** Promoter of **Rhizobium leguminosarum** Sym Plasmid prL1J1 by Plant Flavanones and Flavones. J. Bact. 169: 198-204.

75.-Zaat, S. A. J., Wijffelman, C. A., Mulders, I. H. M., van Brussel, A. A. N. and Lugetnberg, B. J. J. 1988. Root Exu dates of Various Host Plants of **Rhizobium leguminosarum** Contain Different Sets of Inducer of **Rhizobium** Nodulation Genes. Plant Physiol. 86: 1298-1303.