

03081

5
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE POSGRADO
DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES.

CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION DE NITROGENO.

CARACTERIZACION DE LOS GENES DE CITRATO SINTASA DE *Rhizobium tropici* Y SU PAPEL EN EL PROCESO SIMBIOTICO CON *Phaseolus vulgaris*.

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA.

Ismael Hernández Lucas.

CUERNAVACA MOR. MEX.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria.

A Cinthya

A Mis padres y hermanos.

Lo más importante de esta vida.

Agradecimientos.

A la Dra Martínez por darme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, y por su apoyo incondicional en todos los momentos.

A mis sinodales: Dres. Xavier Soberon, David Romero, Enrique Morett, Lorenzo Segovía, Michael Dunn, y Juan Miranda.

A Gloria Martínez Drets y Michael Hynes por revisar la tesis.

A mis tutores y amigos: Juan, Marco, y Lorenzo. La verdad es que sin ellos no se que hubiera pasado.

A Peter Young y Jos Vanderleyden, por haberme dado la oportunidad de aprender de ellos.

A David Romero y Jesús Caballero, por ser siempre excelentes profesores y amigos.

A mis amigos: Arturo, Juan, Toño, Carlos, Lalo, Toon, Ernesto, En- Tao, Adama, Jorge, Martín, Lety, Jonas, Elly, Sandra, Priscila Stan, Sandra, Alejandro, Rocio, Araceli, Edith, Ivonne, Patrick.

A Julio Martínez Romero, por todas sus enseñanzas.

A mis compañeros y amigos del laboratorio y del centro.

A todas las personas importantes que de alguna manera colaboran constantemente conmigo en lo personal y académico.

A Alma por su gran ayuda.

A los Hernández y Lucas.

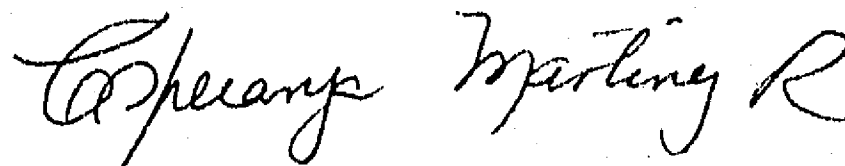
A la U.N.A.M.

Indice.	PP
Resumen	4
I.- Introducción:	
Fijación biológica del nitrógeno.	5
El microsimbionte.	6
Taxonomía de <i>Rhizobium</i> .	7
Formación del Nódulo.	9
Genes de la planta que se expresan en simbiosis.	11
Metabolismo del Carbono en <i>Rhizobium</i> .	12
Entner Doudoroff.	14
Pentosa fosfato.	15
Embden Meyerhof Parnas.	16
Acidos orgánicos.	19
Ciclo de los ácidos tricarbóxicos.	19
Malato aspartato.	22
Polihidroxitirato.	23
α -cetogluturato- glutamato.	23
Ciclo del glioxilato.	24
Enzimas Málidas.	25
Metabolismo del carbono en bacteroides de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> .	26
Formación de complejos metabólicos.	27

II.- Antecedentes particulares.	28
III.- Resultados.	30
Artículo I	
Metabolismo del carbono en <i>Rhizobium tropici</i> .	31
Artículo II	
IV.- Resultados adicionales.	34
IS3 <i>Rhizobium tropici</i> .	34
Posibles genes de la vía del glioxilato y α -cetoglutarato-glutamato en el pSym de <i>R. tropici</i> .	35
V.- Discusión.	37
VI.- Conclusiones.	46
Figuras	
VII.- Apéndice 1.	47
Artículo III	
Discusión apéndice 1	48
VIII.-Materiales y métodos no descritos ene el texto o en los artículos.	50
IV.- Bibliografía.	53

Abstract

Rhizobium tropici, a nitrogen-fixing bacterium that establishes a symbiotic association with different legumes, has a great versatility to use a large spectrum of carbon sources in the free-living state and in symbiosis. A striking feature of this bacterium is the presence of two genes that encode a citrate synthase enzyme. One of them is located on the chromosome and the other on the symbiotic plasmid. A strain mutated in both genes do not fix nitrogen and show a decrease in the number of nodules, devoid of bacteroids. A mutation in the chromosomal gene shows 38% of the number of nodules and 30% of nitrogen fixation compared to the wild type strain. Strains mutated in the plasmid gene (*pcsA*) show 70% of the number of nodules and 80% of the nitrogen fixation with respect to the wild type strain. Therefore the expression of both genes is required for the symbiotic process. The expression of the chromosomal gene copy is detected both in free-living state and in symbiosis while that of *pcsA* only in symbiosis. Since we wanted to know more about the origin and the role of the plasmid gene we sequenced the upstream region of the *pcsA* gene and found an IS3-like insertion sequence, which may be involved in the regulation of *pcsA*. We also identified other putative ORFs of anaplerotic pathways of the Krebs cycle. We show some advances in the study of these ORFs and their possible role in free-living state and symbiosis.



Vo.Bo. Esperanza Martínez Romero.

Director de Tesis.

Resumen.

Rhizobium tropici, bacteria fijadora de nitrógeno que establece asociaciones simbióticas con múltiples leguminosas, posee una gran versatilidad metabólica para la utilización de diferentes fuentes de carbono tanto en vida libre como en simbiosis. Una característica de esta bacteria es la presencia de dos genes que codifican para la enzima citrato sintasa. Uno de estos genes se encuentra en el cromosoma bacteriano mientras que el otro se localiza en el plásmido simbiótico. Mutaciones en ambos genes provocan un fenotipo Fix⁻ y una drástica reducción en el número de nódulos los cuales están desprovistos de bacteroides. Mutantes en el gene cromosomal muestran un 38% del número de nódulos y una actividad de fijación de nitrógeno del 30% con respecto a la cepa silvestre. Mutantes en el gene plasmídico (*pcsA*) muestran un 70% del número de nódulos y una fijación de nitrógeno del 80%. Por lo tanto la expresión de ambos genes esta involucrada en el proceso simbiótico. La expresión del gene cromosomal se detectó tanto en vida libre como en simbiosis, mientras que la del gene plasmídico está condicionada al proceso simbiótico. Con el propósito de conocer más acerca del papel y origen del gene plasmídico secuenciamos la región 5' del mismo y encontramos una secuencia de inserción del tipo IS3, la cual posiblemente está involucrada en la expresión del gene *pcsA*. También identificamos otros ORFS de vías anapleróticas del ciclo de Krebs. Presentamos avances del estudio de estos ORFS así como de su probable papel en vida libre y en simbiosis

Introducción

El nitrógeno constituye gran parte del peso de plantas (1-10%) y animales (10-30%) (1). El nitrógeno es indispensable para la producción vegetal. Las deficiencias de este elemento en el suelo ocasionan reducción en la producción y en la calidad de las cosechas. El nitrógeno constituye más del 70% del total de la atmósfera, y sólo puede ser asimilado por procariontes fijadores de nitrógeno. Algunos de ellos tales como *Klebsiella*, *Anabaena*, *Azotobacter* y *Azospirillum* lo fijan en vida libre para satisfacer sus requerimientos nitrogenados. Otros organismos obtienen nitrógeno de la atmósfera mediante procesos simbióticos. Un ejemplo de asociación simbiótica es la que se establece entre bacterias del género *Rhizobium* con plantas leguminosas. Esta asociación parece ser muy antigua ya que ha llevado a una serie de eventos coevolutivos entre ambos participantes, entre los que destacan el reconocimiento específico y el intercambio de señales, dando como resultado estructuras llamadas nódulos en las cuales se lleva a cabo la fijación biológica del nitrógeno (Fix^+).

Fijación Biológica del Nitrógeno.

Las leguminosas, el grupo de plantas más importantes relacionadas con la fijación biológica del nitrógeno, posee más de 15,000 especies, de las cuales aproximadamente 200 son cultivadas por el hombre. La familia está dividida en tres subfamilias. En la subfamilia *Papilionoidea* se encuentran géneros como *Medicago*, *Trifolium*, *Dalea*, *Crotalaria*, *Vicia*, *Vigna*, *Pisum* y *Phaseolus* entre otras. Un menor número de géneros se clasifican en la subfamilia *Caesalpinoidea*, mientras la *Mimosoidea* es la subfamilia más pequeña, con géneros como *Leucaena* y *Acacia*. La gran mayoría de las leguminosas forman asociaciones simbióticas con *Rhizobium*. Esta asociación en la cual se lleva a cabo la fijación de nitrógeno tiene considerable importancia ecológica como económica.

El microsimbionte.

Las bacterias del género *Rhizobium* son habitantes normales del suelo. Son bacterias Gram⁻ pertenecientes a la rama α de las proteobacterias según la clasificación de Woese (2). El tamaño de su genoma se ha calculado entre 5300 KB (3, 4) y 8700 KB (5). En teoría se calcula que *Rhizobium* posee más de 3000 genes (6). Una gran parte de su información genética reside en plásmidos de alto peso molecular (7). Uno de los plásmidos más ampliamente estudiados es el denominado plásmido simbiótico (pSym), en el que se encuentran los genes para el establecimiento de la simbiosis: los genes comunes de nodulación *nodABC*, el gene *nodD*, los genes de especificidad del hospedero y los genes *fix* y *nif* (8). Además del pSym se ha visto que en otros plásmidos reside información genética importante para la simbiosis, los procesos metabólicos, la utilización de compuestos aromáticos y de fuentes carbonadas como ramnosa, sorbitol, adonitol, homoserina, arginina, dulcitol, arabinosa, glicerol, inositol y lactosa (9, 10). Por lo tanto, se propone que en *Rhizobium*, plásmidos y cromosoma constituyen una unidad funcional que determina tanto el proceso simbiótico así como algunas funciones esenciales de la célula (10).

Taxonomía de *Rhizobium*.

Dentro de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* y *Azorhizobium* se han descrito las siguientes especies.

Género	Especie	biovar	Principal planta asociada.
<i>Rhizobium</i>			
<i>Rhizobium.</i>	<i>meliloti</i>		<i>Medicago</i> , <i>Melilotus</i> , <i>Trigonella</i>
<i>Rhizobium</i>	<i>fredii</i>		<i>Glycine max</i> , <i>G. soja</i> .
<i>Rhizobium</i>	<i>leguminosarum</i>		
		<i>bv. viciae.</i>	<i>Vicia</i> , <i>Pisum</i> .
		<i>bv. trifolii.</i>	<i>Trifolium</i> .
		<i>bv. phaseoli.</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> .
<i>Rhizobium</i>	<i>tropici.</i>		Amplio espectro de nodulación
<i>Rhizobium</i>	<i>etli.</i>		Amplio espectro de nodulación.
<i>Rhizobium</i>	<i>galegae.</i>		<i>Galega officinalis</i> , <i>G. orientalis</i> .
<i>Rhizobium</i>	<i>loti</i>		<i>Lotus spp.</i>
<i>Rhizobium</i>	<i>huakuii</i>		<i>Astragalus sinicus</i> .
<i>Sinorhizobium</i>			
<i>Sinorhizobium</i>	<i>saheli</i>		<i>Acacia</i> , <i>Sesbania</i> .
<i>Sinorhizobium</i>	<i>teranga</i>		<i>Acacia</i> , <i>Sesbania</i> .

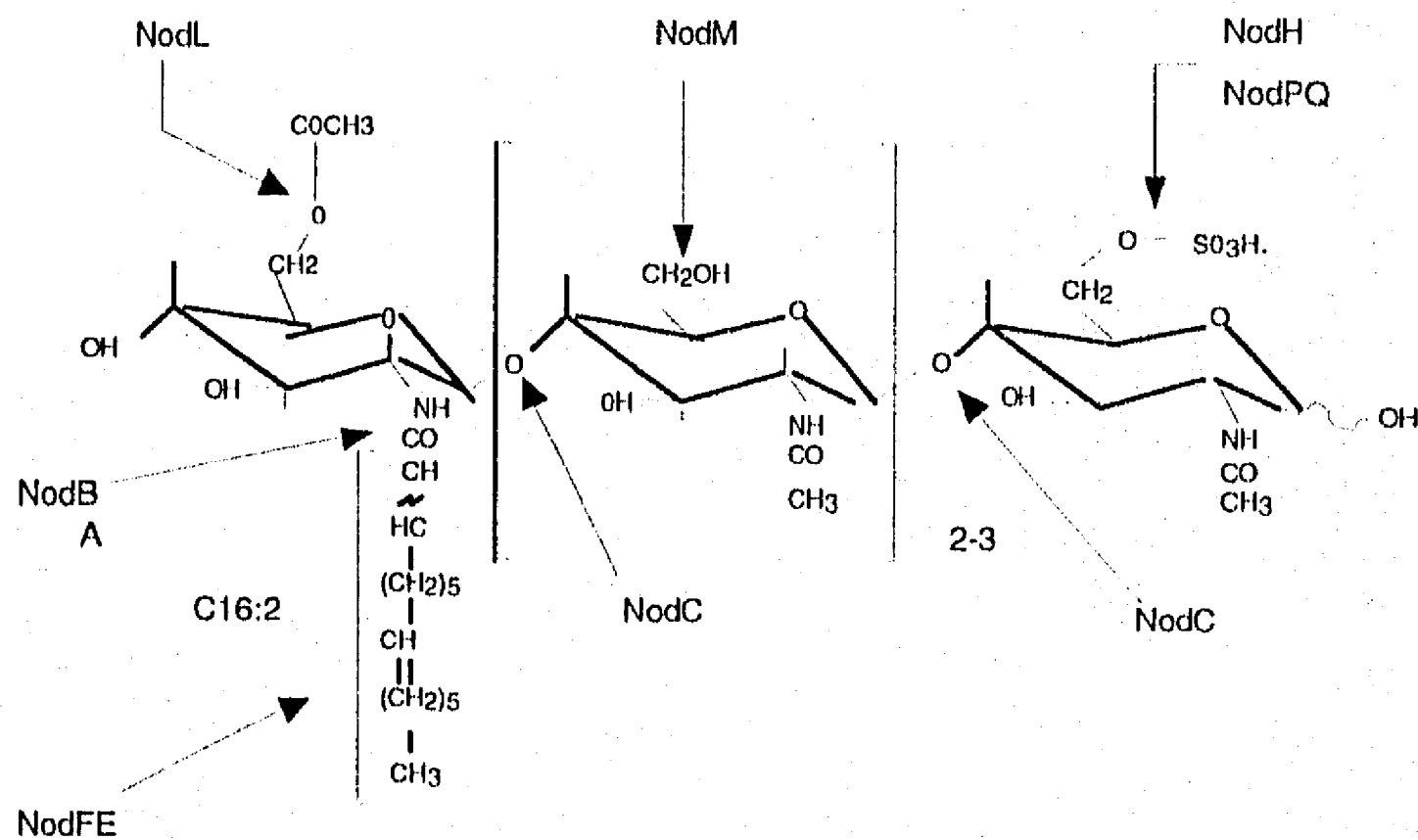
Género	Especie	Principal planta asociada.
<i>Bradyrhizobium.</i>		
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>japonicum</i>	<i>Glycine max.</i>
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>elkanii</i>	<i>G. max.</i>
<i>Azorhizobium</i>		
<i>Azorhizobium</i>	<i>caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata.</i>

Además de estas especies se han aislado una gran cantidad de bacterias que poseen la capacidad natural de formar nódulos fijadores de nitrógeno con distintas leguminosas, sin embargo estas bacterias no han sido clasificadas. Son necesarios estudios de taxonomía para poder conocer las relaciones genéticas y la posición taxonómica de éstas bacterias. También es importante explorar sus características simbióticas, ya que la mayoría nodulan diferentes leguminosas. En nuestro laboratorio se han aislado bacterias de nódulos de *Dalea leporina*, *Macroptilium gibbosifolium*, y *Clitoria ternatea*. Hemos observado que estos *Rhizobium spp* también poseen la habilidad de nodular *Phaseolus vulgaris* y *Leucaena*. Nosotros determinamos la posición filogenética de estas bacterias analizando la secuencia parcial de los genes 16SrRNA, también exploramos las capacidades simbióticas de estos aislados con varias leguminosas de las subfamilias *Mimosoidea* y *Papilonoidea*. Los resultados de este trabajo se muestran en el Apéndice 1.

Formación del Nódulo.

El establecimiento de la simbiosis *Rhizobium* - leguminosa provoca la formación de una estructura altamente diferenciada llamada nódulo. La formación de un nódulo requiere un intercambio de señales entre la bacteria y la planta. Este dialogo se inicia con el reconocimiento por la bacteria a ciertos flavonoides y compuestos fenólicos excretados por la planta (11). Los flavonoides inducen la activación de los genes de nodulación a través del producto del gene NodD (12,13), y estimulan la formación de un compuesto denominado factor de nodulación. Esta molécula es un oligomero de N-acetil glucosamina con diferentes modificaciones químicas. En la Figura A se muestra el factor de nodulación de *R.meliloti* (14) así como los genes que intervienen en la síntesis del mismo.

Fig A



En la síntesis del factor Nod participan diferentes procesos enzimáticos. NodM es similar a glucosamino sintasa (15) y sintetiza los precursores de N-acetyl glucosamina. NodC es homólogo a quitina sintetasas y polimeriza las unidades de glucosamina por medio de enlaces β 1-2. NodB remueve el grupo acetilo en el extremo no reducido, liberando el sitio donde NodA transfiere el lípido formado por NodEF. Los genes *nodHPQ* codifican para las enzimas que catalizan la sulfatación del factor de nodulación (14). Los genes *nodABC* (16) están presentes en todos los *Rhizobium* mientras que *nodHPQ* (17, 18) y *nodEF* (19) son especie específicos y son determinantes de la especificidad del hospedero. Las mutantes en los genes *nodABC* son incapaces de nodular mientras que las mutantes en genes de especificidad del hospedero alteran el rango de nodulación de la bacteria o la eficiencia de nodulación. El proceso por el cual se lleva a cabo la síntesis del factor de nodulación parece ser una vía común entre las *Rhizobiaceas*. Las variantes en el esqueleto de N- acetyl glucosamina tales como su longitud y las modificaciones químicas como el tipo de lípido, el sulfato, el carbamilo, la fucosa, la metil o acetil fucosa dependen de la especie de *Rhizobium*.

El factor de nodulación es considerado como la principal señal en el proceso simbiótico, ya que los factores purificados de *R. meliloti* y *R. leguminosarum* bv *viciae*, provocan deformaciones de los pelos radiculares, y son capaces de inducir estructuras similares a nódulos en *Medicago sativa* y *Vicia sativa* (19,20).

El factor induce la reestructuración del citoesqueleto provocando la deformación y enroscamiento de los pelos radiculares. Esto ocasiona el encapsulamiento de las bacterias y el inicio de la formación del hilo de infección, por el cual las bacterias penetran al córtex de la planta en donde se diferencian a bacteroides; los cuales llevan a cabo la fijación biológica del nitrógeno.

Genes de la planta que se expresan en simbiosis.

La presencia de *Rhizobium* así como el factor de nodulación *per se* alteran la expresión de genes de la planta. Los productos de genes de la planta que se inducen en el nódulo han sido denominados nodulinas y participan en la formación y funcionamiento de las estructuras nodulares. Las nodulinas han sido divididas en tempranas y tardías. Las tempranas intervienen directamente en la morfogénesis del nódulo. Durante la infección de las células vegetales se han identificado entre otras la RH42, la RH44 (21, 22), y la enoD 12 (23), en plantas de chícharo, soya, y alfalfa. Las nodulinas tardías crean y sustentan el ambiente apropiado para la fijación de nitrógeno y la asimilación de los compuestos nitrogenados por parte de la planta. Muchas de ellas se han clonado y secuenciado. Una de éstas es la leghemoglobina. Esta nodulina constituye hasta el 25% de la proteína soluble total del nódulo maduro dando el característico color rosado (24). Otras nodulinas como la uricasa II (25), la glutamino sintetasa (26), la sacarosa sintetasa (27) y la PEP carboxilasa realizan funciones que no sólo se restringen al funcionamiento del nódulo. Al parecer estas enzimas se adaptaron para cumplir con las nuevas necesidades fisiológicas y metabólicas que impone la simbiosis.

Mientras que los genes simbióticos tanto de nodulación como de fijación han sido ampliamente estudiados en *Rhizobium*, los genes relacionados con la sobrevivencia y el crecimiento de la bacteria durante la interacción con la planta han recibido menor atención. Se requiere una tasa de crecimiento que asegure una concentración adecuada de bacterias para infectar eficientemente las células vegetales y lograr niveles altos de fijación de nitrógeno. Para alcanzar esta tasa óptima debe existir un acoplamiento metabólico entre el *Rhizobium* y su planta hospedera.

Metabolismo del carbono en *Rhizobium*

Estudios bioquímicos del metabolismo del carbono en *Rhizobium* han revelado que esta bacteria utiliza una gran cantidad de fuentes de carbono en vida libre, como sacarosa, glucosa, fructosa, manitol, hexosas, pentosas, disacáridos, trisacáridos, ácidos orgánicos y algunos compuestos aromáticos como antranilato, protocatecato y quinato (28). Se sabe que la vía de asimilación de diferentes compuestos en algunos casos es constitutiva. Por ejemplo, el transporte de sacarosa en *R. trifolii* y *R. leguminosarum* es constitutivo, mientras que en *R. meliloti* es inducible (29). Para glucosa el sistema es constitutivo y se ha descrito en *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. Este tipo de transporte parece ser activo y requerir de energía en la membrana. El transporte de azúcares en *Rhizobium meliloti* y *B. japonicum* está sujeto a represión catabólica (30, 31, 32).

En *Rhizobium* existe una vía especializada en simbiosis para la asimilación de los ácidos dicarboxílicos. Este sistema es codificado por los genes *dctABD* (33,34). Es inducible y se expresa en presencia de succinato, malato y fumarato. En algunas especies de *Rhizobium*, como *R. loti* y *R. etli*, un transporte eficiente de ácidos dicarboxílicos requiere energía y depende de cationes como Mg^{2+} o Ca^{2+} . En algunos casos la disponibilidad de sólo el magnesio y la falta de calcio provoca una fase lag muy pronunciada en *R. etli*. En otros casos, como en *R. tropici* y *R. meliloti* no se requieren cationes para transportar los ácidos dicarboxílicos (35). Se sabe que la presencia de ácidos dicarboxílicos inhibe los sistemas de transporte de azúcares en algunas especies de *Rhizobium*.

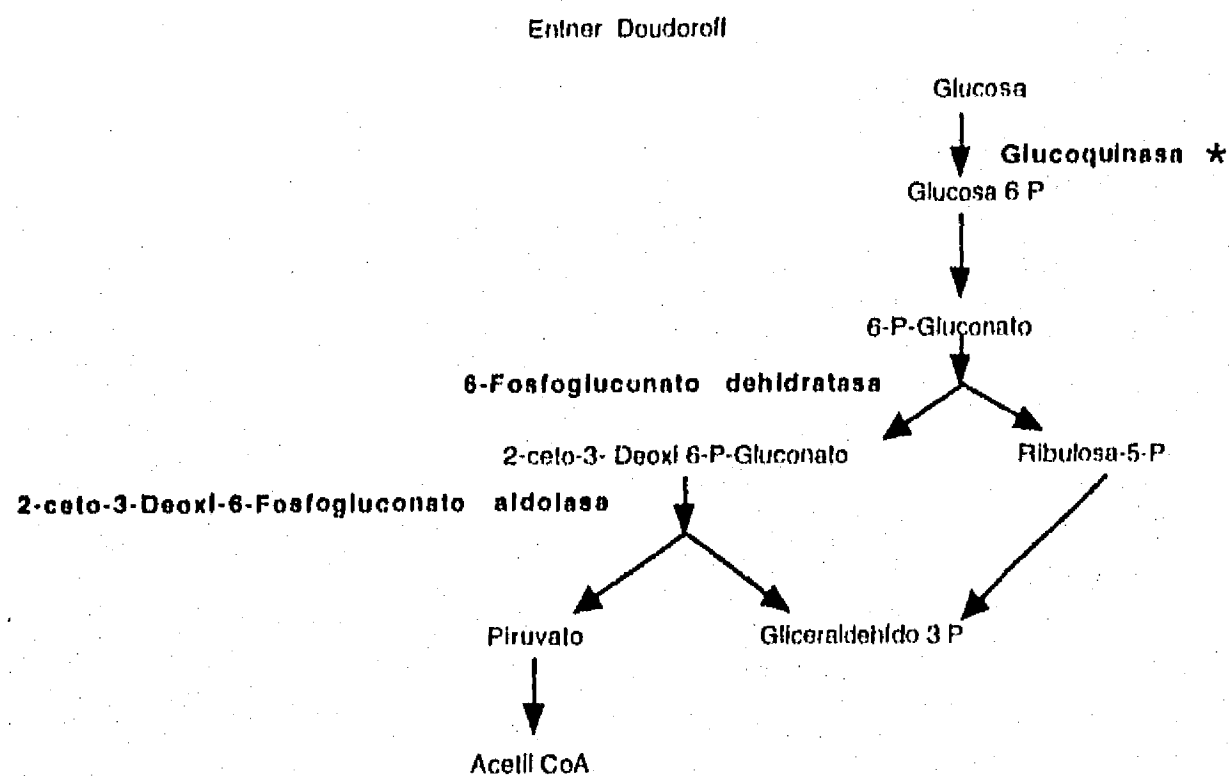
Otro tipo de compuestos que utiliza *Rhizobium* como fuente de carbono son los compuestos aromáticos. *R. leguminosarum* bv *trifoli* puede utilizar compuestos como catecol (36) protocatecato, quinato, cumarato, ferulato, dihidroxibenzoato, hidroxibenzoato y trihidroxibenzoato. *Rhizobium leguminosarum* también posee la

habilidad de utilizar los anteriores compuestos. *R. meliloti* puede utilizar antranilato, quinato, y protocatecato. *B. japonicum* y otras *Rhizobium spp* también pueden utilizar una gran cantidad de compuestos aromáticos e hidroaromáticos (37). En el ambiente rizosférico los compuestos aromáticos se encuentran en forma libre o unidos covalentemente a azúcares. Estos compuestos son producto de la degradación de la lignina y otros productos de las plantas. Se ha propuesto que estos compuestos también actúan como quimioatrayentes de las bacterias (37). La habilidad de *Rhizobium* de poder utilizar estos compuestos en la naturaleza le aseguran una sobrevivencia y competitividad importante en el suelo.

Las vías metabólicas que se han descrito en *Rhizobium* para la degradación y utilización de diferentes fuentes de carbono son Entner Doudoroff, Pentosa fosfato y Embden Meyerhoff Parnas. A continuación se presenta una sinopsis de estas vías metabólicas.

Entner Doudoroff.

Esta ruta catabólica se encuentra en *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. trifolii*, *B. japonicum* y diferentes *Rhizobium spp* (33 38). Se expresa cuando la bacteria crece en fuentes de carbono como sacarosa, fructosa y glucosa. Las enzimas principales son la 6-P-gluconato deshidratasa y la 2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconato aldolasa. El piruvato producido ocupa una posición clave en el metabolismo intermediario. Mediante la descarboxilación de éste se forma la acetil-coenzimaA (acetil-CoA) que entra al ciclo de Krebs. Esta vía ha sido descrita en muchas otras bacterias como *Pseudomonas*, *Rhodospirillum rubrum*, y *Agrobacterium*.



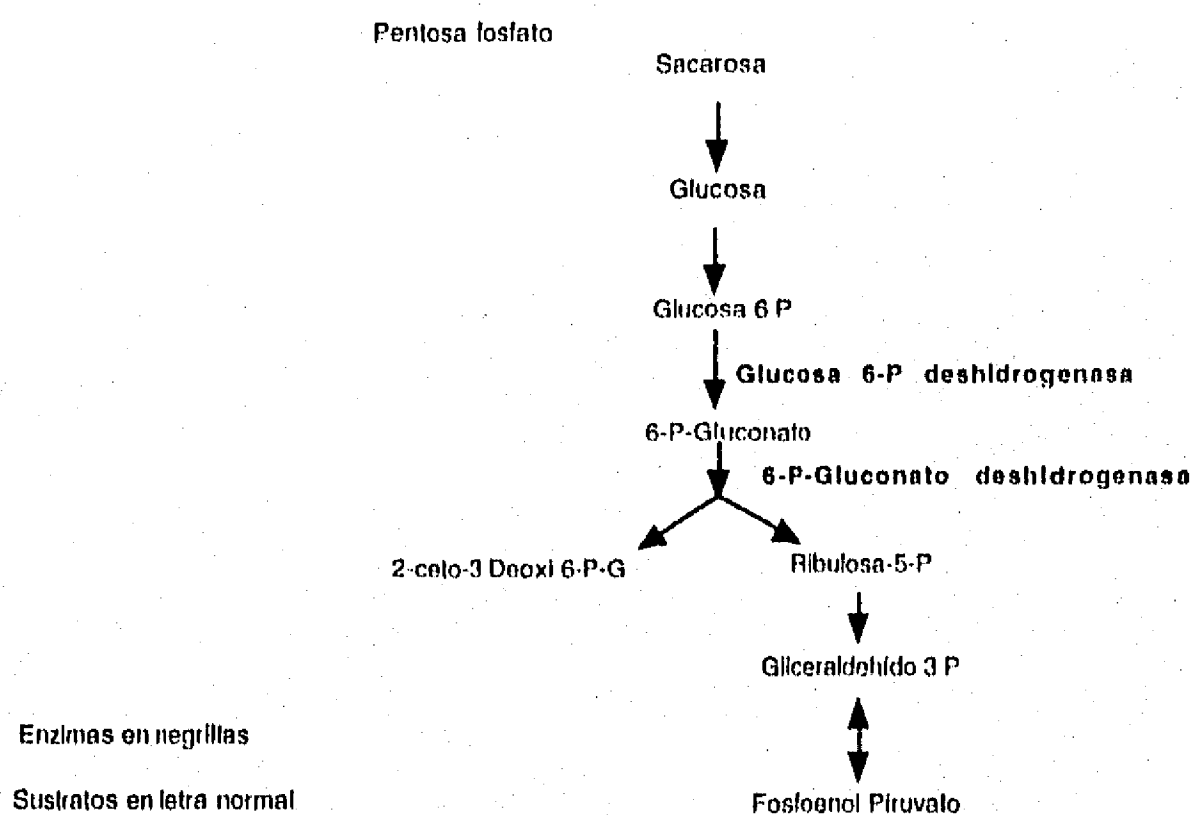
Enzimas en negrillas.

Sustratos letra normal

Mutante fix + ★

Pentosa fosfato.

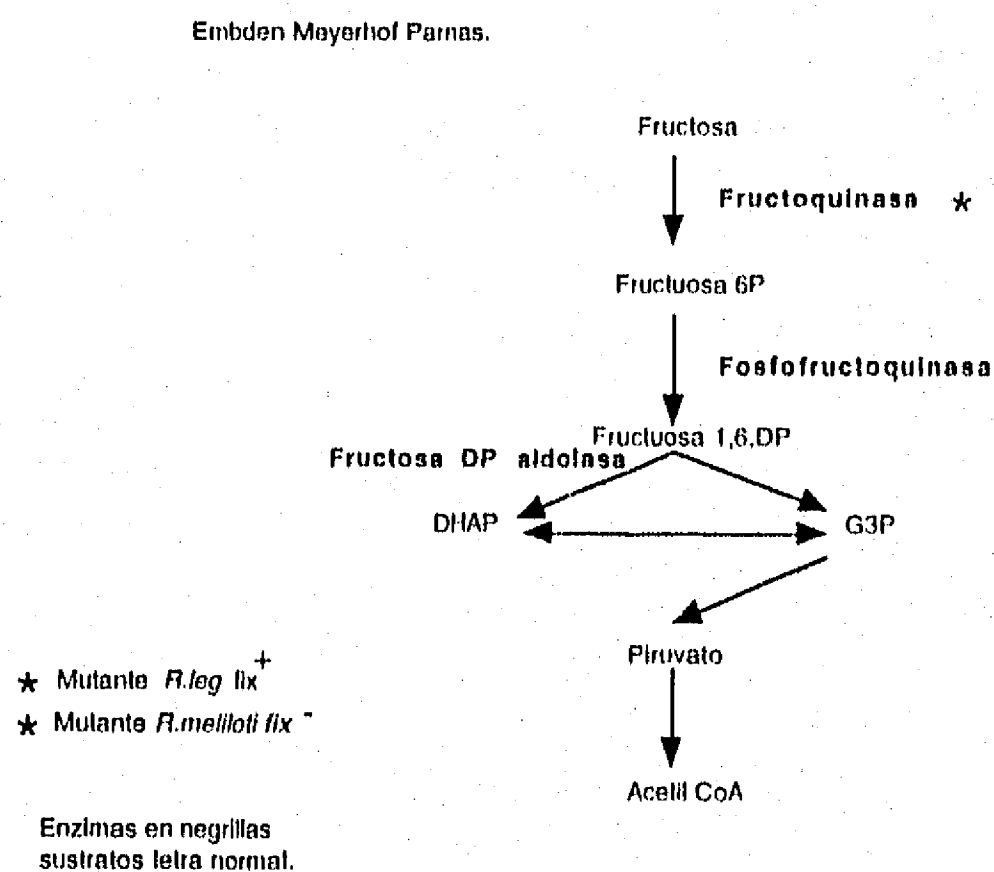
La vía de la pentosa fosfato ha sido descrita en *Rhizobium leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. trifolii*, y *R. sp.* NGR 234 (39). Opera en presencia de glucosa, gluconato, sacarosa y fructosa. Las enzimas principales son la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa la cual en algunos casos es NADP dependiente y en otros NAD dependiente. Estas enzimas funcionan sobre la glucosa-6-fosfato, la cual es deshidrogenada con la ayuda de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, formándose ácido fosfogluconico (6-P-gluconato), el cual es deshidrogenado por la 6-fosfogluconato deshidrogenasa dando como producto ribulosa 5-fosfato que a su vez es usada en la síntesis de ácidos nucleicos. Una característica de esta vía es la generación de NADH que es utilizado en la síntesis de ácidos grasos.



Embden Meyerhoff Parnas.

Parece ser que la vía Embden Meyerhof Parnas (EMP) se encuentra en algunos *Rhizobium* como *Rhizobium sp* 32H1 y *Bradyrhizobium japonicum* pero en otros no, como en *R. trifolii* (40,41). Esta ruta utiliza como sustrato fructosa, glucosa, manosa. La fructosa es fosforilada por una fructoquinasa produciendo fructosa-6-fosfato, que es de nuevo fosforilada por una fosfofructoquinasa produciendo la fructosa 1-6-difosfato que es hidrolizada por una aldolasa a dihidroxiacetona-fosfato y gliceraldehido-3-fosfato, que a su vez puede transformarse en piruvato y dar finalmente acetil CoA. Esta vía ha sido también estudiada en *R leguminosarum*, *R sp.* NGR234; sin embargo no se ha detectado la actividad de una de las enzimas principales, la fosfofructoquinasa.

La forma de metabolizar la glucosa a piruvato por la vía EMP puede ser usada por muchos microorganismos anaeróbicos como levaduras o bacterias fermentativas.



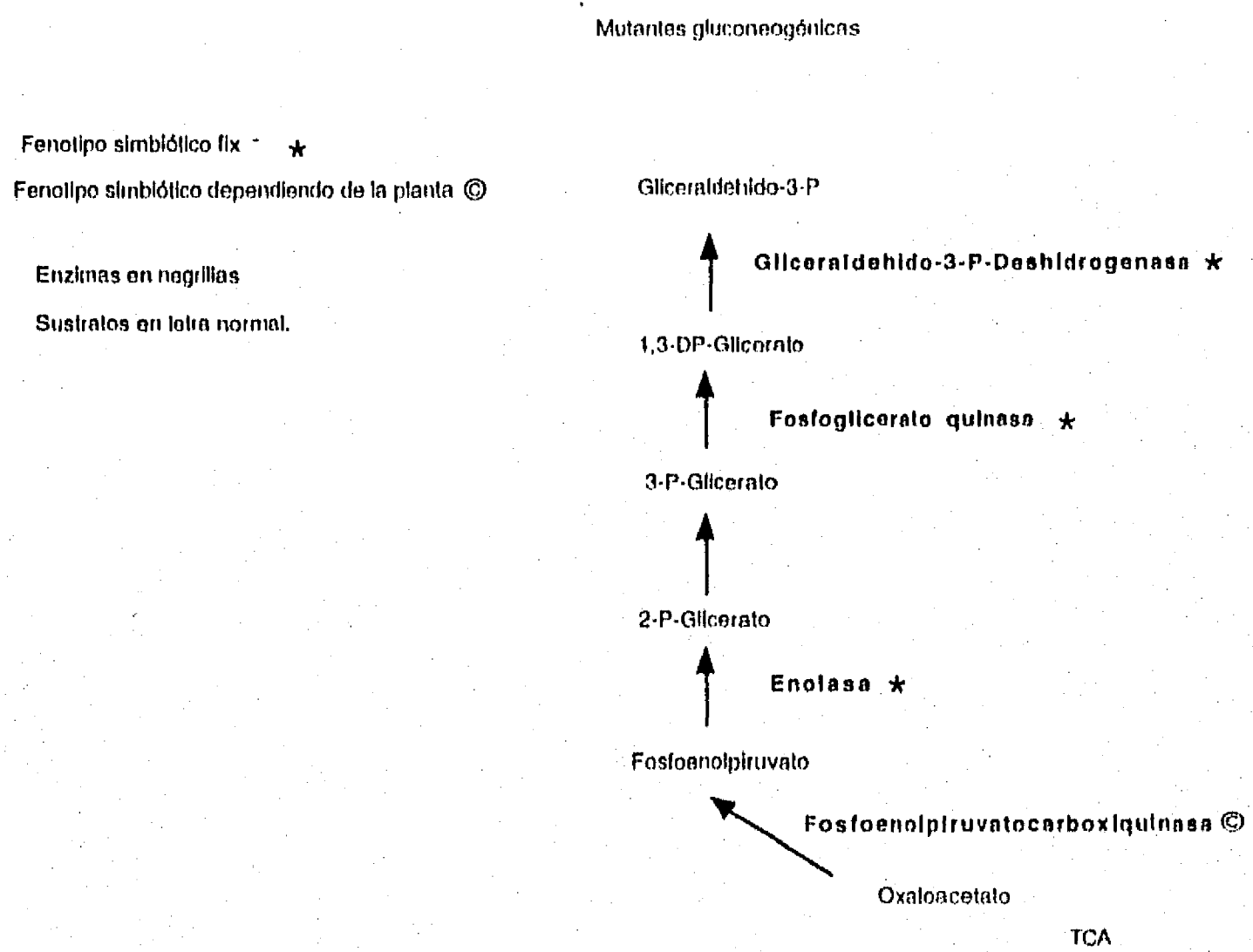
Además, *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* son capaces de utilizar compuestos de 3 carbonos (C3) tales como glicerol a través de la vía glicero quinasa y glicerol fosfato deshidrogenasa para formar gliceraldehido-3-fosfato que producirá piruvato (42). Las dos enzimas participantes son inducibles.

Compuestos de dos carbonos como el acetato son metabolizados a través del ciclo del glioxilato por las enzimas isocitrato liasa y malato sintasa (43). Estas enzimas son inducibles y se ha observado que la isocitrato liasa se reprime en presencia de succinato o azúcares como glucosa. El producto final del ciclo del glioxilato es la formación de succinato y malato que participan directamente en ciclo de Krebs.

Es importante hacer notar que las diferentes formas de utilización de fuentes de carbono antes mencionadas han sido ampliamente estudiadas en *Rhizobium* en vida libre, pero existe escasa información sobre estas vías en los bacteroides. Sin embargo, sí se ha analizado el papel de los distintos azúcares y ácidos dicarboxílicos en simbiosis.

Ciertos azúcares como glucosa, sacarosa o fructosa son los principales fotosintatos translocados de la planta al nódulo. Sin embargo, no son rápidamente metabolizados o son transportados a una tasa muy baja por los bacteroides. Algunos reportes mencionan la posible impermeabilidad de la membrana peribacteroidal a los azúcares (44). Otros reportes indican que la glucosa, fructosa y sacarosa parecen ser transportados por difusión (45). Las mutantes que pierden la actividad de glucoquinasa o fructoquinasa (46) en algunos casos poseen la habilidad de nodular y fijar nitrógeno a los mismos niveles de sus correspondientes cepas silvestres. Aparentemente la capacidad de utilizar azúcares no es esencial para el establecimiento de una simbiosis efectiva. Sin embargo, se sabe que la glucosa y la fructosa pueden ser usados como fuente de carbono para poder llevar a cabo la fijación de nitrógeno, medida como reducción de acetileno (47). También existen reportes del metabolismo de hexosas en bacteroides de *R. leguminosarum* (46) y se ha reportado contrario a lo descrito por Glenn en 1984 que una mutante en fructoquinasa en *R. meliloti* nodula pero no fija nitrógeno (Fix^-) (48). Mutantes en fosfoglucosa isomerasa

tienen retardo en nodulación y la fijación de nitrógeno se encuentra disminuida (49). De igual forma mutantes de *R. meliloti* en enolasa, fosfoglicerato quinasa, y gliceraldehído-3-fosfato-dehidrogenasa son incapaces de fijar nitrógeno. Otro tipo de mutantes en gluconeogénesis, en la enzima fosfoenol piruvato carboxiquinasa (*pckA*), muestran una fijación de nitrógeno reducida aunque en bacteroides de la cepa silvestre no se detecta la actividad de esta enzima (50). En *R. leguminosarum* la misma mutación no ocasiona un fenotipo simbiótico deficiente; sin embargo, se observa actividad de esta enzima en el bacteroide en bajos niveles (51). Otra mutante en *pckA* en *R. sp.* NGR234 muestra en *Leucaena* y *Macroptilium* una eficiencia de fijación de nitrógeno del 60% y 20% respectivamente. Sin embargo en *Vigna* esta mutación presenta un fenotipo Fix⁻ (52).



El hecho que una misma mutante tenga un diferente efecto simbiótico dependiendo de la planta sugiere que cada planta proporciona diferentes compuestos carbonados al bacteroide. Los datos anteriores demuestran que los diversos azúcares podrían jugar algún papel en simbiosis.

Acidos orgánicos.

Los ácidos orgánicos son de particular interés ya que son la principal fuente de carbono para mantener la fijación de nitrógeno. Los intermediarios del ciclo de Krebs son la mejor fuente de energía para el bacteroide. El sistema de transporte de ácidos dicarboxílicos se encuentra muy activo en el bacteroide y puede transportar fumarato, malato y análogos de succinato. Mutaciones en los genes de transporte de ácidos dicarboxílicos (*dct*) de *Rhizobium* provocan la formación de nódulos inefectivos en *Trifolium repens* o *Pisum sativum* (53).

Ciclo de los ácidos Tricarboxílicos

Otro ciclo importante tanto en vida libre como en simbiosis es el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). La funcionalidad del ciclo de Krebs se ha evaluado en experimentos de radiorespirometría, y análisis de mutantes (54, 55). De este ciclo se derivan una gran cantidad de precursores para biosíntesis, tales como α -cetoglutarato, el cual produce glutamato para síntesis de proteínas, glicoproteínas, y otros aminoácidos como prolina y arginina. El TCA también provee oxaloacetato que es precursor de ácido aspártico para la síntesis de pirimidinas (DNA), proteínas y aminoácidos como treonina, metionina, isoleucina y leucina. A partir de oxalacetato se regenera piruvato que vuelve a utilizarse en

el ciclo. En este ciclo también se genera succinil-CoA que es importante para la respiración.

Una de las funciones principales del TCA es generar poder reductor que es utilizado por la cadena transportadora de electrones produciendo la moneda energética de la célula, el ATP.

Las enzimas que participan en el ciclo de Krebs son las siguientes: citrato sintasa, aconitasa, isocitrato deshidrogenasa, α -cetoglutarato deshidrogenasa, succinil-coA sintetasa, succinato deshidrogenasa, fumarasa y malato deshidrogenasa.

Los genes del ciclo de Krebs en diferentes bacterias se encuentran en grupos. Por ejemplo en *E. coli* (56) se localizan juntos *gltA*, *sdhC'DAB*, *sucABCD*, en *Bacillus subtilis* (57) *gltA* es el primer gene de un cluster tricistronico que tambien incluye *icD* y *mdH*. En *R. leguminosarum b.v. viciae* tambien se encuentran contiguos *mdh-sucC'DAB* (58). Al parecer la conservación de la organización de los diferentes genes del ciclo de Krebs se ha mantenido en bacterias Gram⁻ como en Gram⁺. Otra característica relevante en cuanto a conservación es que todas las enzimas del ciclo de Krebs tienen alta de similitud entre los diferentes organismos. Sin embargo en cuanto a propiedades moleculares, enzimas como citrato sintasa de bacterias Gram⁻ y Gram⁺ difieren considerablemente (59).

En *Rhizobium leguminosarum* (60), *Bradyrhizobium japonicum*, y *R. meliloti* (61) se han estudiado las enzimas del ciclo de Krebs encontrándose altas actividades en vida libre y en simbiosis. Enzimas como isocitrato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa muestran altas actividades en bacteroides cuando se lleva a cabo la máxima fijación de nitrógeno. Al parecer la malato deshidrogenasa expresa alta actividad debido a que la planta provee al bacteroide de grandes cantidades de malato. En cuanto a la isocitrato deshidrogenasa, no se sabe cuál es el sentido de su expresión en este estadio (62).

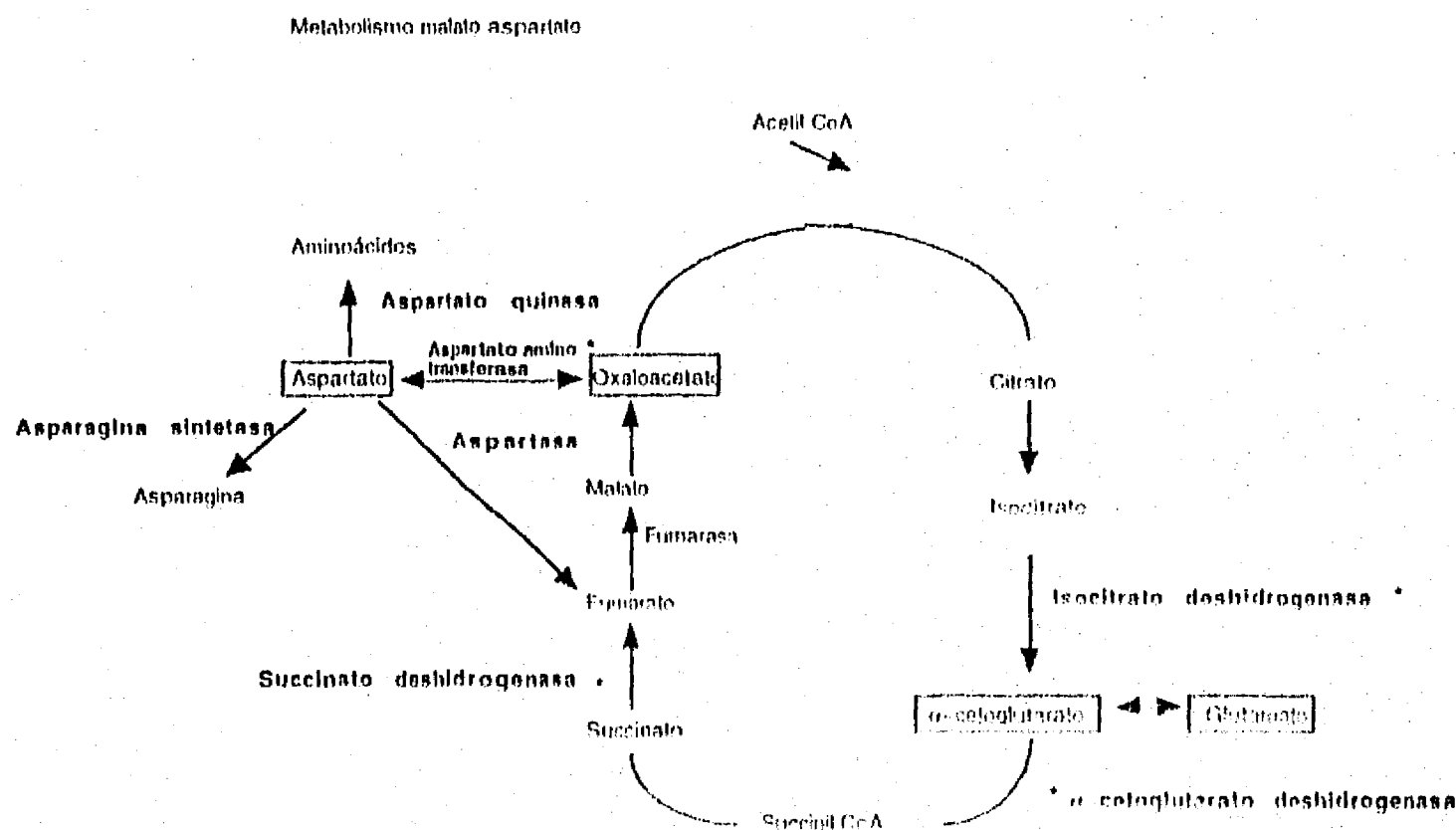
Mutantes de *Rhizobium* en succinato deshidrogenasa (55), α -cetoglutarato deshidrogenasa (54) e isocitrato deshidrogenasa (63) muestran nodulación pero son

incapaces de fijar nitrógeno. Esto confirma que se requiere el funcionamiento del ciclo de Krebs completo para una simbiosis efectiva.

En diferentes organismos se ha encontrado que existen otras vías relacionadas al ciclo de Krebs, estas son ciclos que le suplen precursores para mantenerlo activo en diferentes condiciones. Algunos de estos han sido estudiados en el proceso simbiótico y se ha encontrado que son determinantes en la simbiosis.

Malato aspartato

La aspartato aminotransferasa es la enzima clave en la vía malato aspartato. Las mutantes en esta enzima no crecen en aspartato como fuente de carbono y son incapaces de fijar nitrógeno. Este fenotipo se debe a que el aspartato parece ser esencial para el bacteroide como fuente de nitrógeno (64). Si la bacteria usara el aspartato como fuente de nitrógeno entonces no sería necesario asimilar nitrógeno en forma de amonio. Esto es consistente con diferentes estudios de mutantes de glutamato sintasa y glutamino sintetasa, enzimas necesarias para la asimilación de amonio. *R. meliloti* posee tres glutamino sintetasa pero ninguna es esencial para una simbiosis eficiente (65,66). Mutantes en glutamato sintasa también son Fix^+ (67,68). La ruta malato aspartato puede servir para no inhibir la succinato deshidrogenasa por oxaloacetato. El que este oxaloacetato sea convertido en aspartato por la vía malato aspartato podría ser una característica adaptativa para no inhibir la succinato deshidrogenasa y por lo tanto el ciclo de Krebs.



Los compuestos en cuadros son sustratos para la aspartato aminotransferasa

* Fenotipo simbiótico Nod^+ Fix^+

Enzimas con neqruilas

Sustratos letra normal

Polihidroxibutirato.

Este polímero es acumulado por una gran cantidad de bacterias. Por ejemplo, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* acumulan polihidroxibutirato (PHB) tanto en vida libre (69) como en simbiosis (70,71,72). *R. meliloti* acumula PHB en vida libre y en los primeros pasos de la simbiosis pero no se ha detectado la presencia de éste cuando se da la fijación de nitrógeno. La síntesis de PHB consume energía y carbono, y lo más importante, poder reductor que previene la inhibición de varias enzimas del ciclo de Krebs. Una mutante que no produce PHB presenta mayor fijación de nitrógeno y mayor contenido de nitrógeno en las semillas de frijol (73). Estos resultados muestran que el PHB no sustenta la fijación de nitrógeno como lo sugiere Bergensen (74). Además, la enzima final (acetoacetato-succinil-CoA transferasa) para producir acetil CoA a partir de PHB se encuentra en muy bajos niveles en bacteroides de *Bradyrhizobium* (71), esto indicaría que el PHB no se recambia. Posiblemente en otras especies de *Rhizobium* en las que si hubiera recambio de PHB, este podría producir acetoacetato que sería utilizado para darnos acetil CoA que participaría en el ciclo del glioxilato.

α -cetoglutarato - glutamato

Esta ruta se propone en *B. japonicum* e involucra la transformación de α -cetoglutarato para dar glutamato por las enzimas glutamato deshidrogenasa y glutamino oxoglutarato aminotransferasa. El glutamato puede ser convertido a ácido- γ -aminobutírico (GABA) por la glutamato descarboxilasa. El GABA es transformado en semialdehído succínico por la enzima gama-amino-butírico glutámico transaminasa y finalmente el succinato semialdehído produce succinato por la enzima succinato semialdehído deshidrogenasa. Kouchi 1988 (75) sugiere que este ciclo del gaba es el principal para generar glutamato en

bacteroides de *Bradyrhizobium japonicum*. El glutamato generado en esta ruta anaperótica podría ser utilizado como fuente de nitrógeno por el bacteroide.

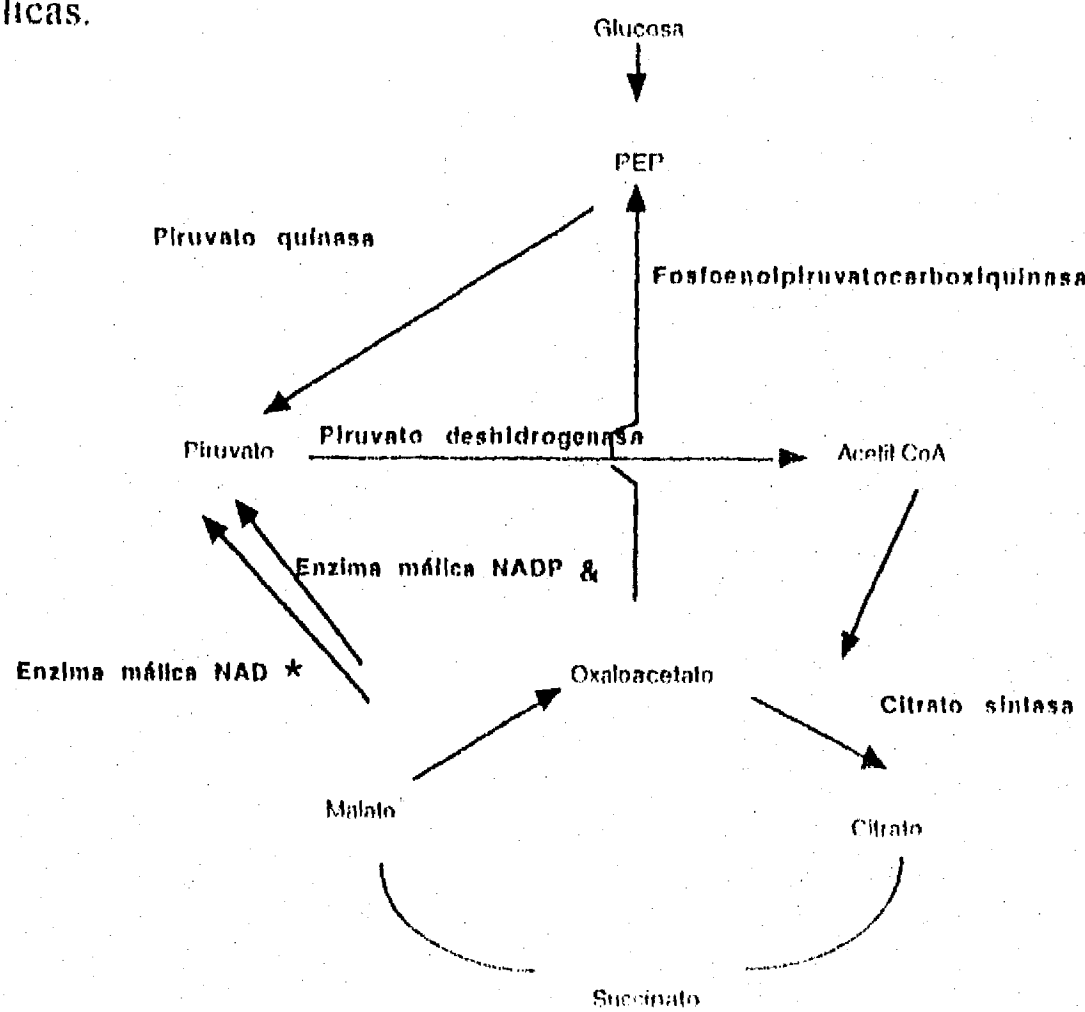
No se tienen reportes de los genes que codifican para las enzimas degradadoras del GABA en *Rhizobium*. Sería interesante generar mutantes en cualquiera de estos genes para evaluar su verdadero papel en simbiosis.

Ciclo del Glioxilato.

Este ciclo no ha sido ampliamente estudiado en *Rhizobium*. En él interviene la isocitrato liasa que genera ácido glioxílico y succinato a partir de isocitrato. Posteriormente el glioxílico es metabolizado por la malato sintasa para producir malato. Se tienen reportes de malato sintasa en bacteroides de *Bradyrhizobium japonicum* (76), *R. meliloti* (54) y en los tres biovares de *R. leguminosarum* (77). La expresión de esta enzima se ha observado también en vida libre en diferentes fuentes de carbono como sacarosa. Por otra parte la expresión de la isocitrato liasa sólo se ha detectado en nódulos de 28 días cuando las plantas se encuentran en obscuridad o los nódulos han sido removidos. En ambos casos se da una incubación de tres días en obscuridad. La expresión de la isocitrato liasa se observa también cuando existe una disminución en la cantidad de PIIB en bacteroides de *Bradyrhizobium japonicum* (78). La expresión de este gene en vida libre se ha observado cuando la bacteria crece en acetato como fuente de carbono y se inhibe en presencia de succinato (79). Sin embargo, no se tienen mutantes en estos genes y no es posible evaluar si tienen algún papel en simbiosis.

Enzima málica

Ya que málico y succínico son las principales fuentes de carbono para el bacteroide, la enzima málica podría jugar un papel importante en simbiosis, debido a que interviene en la síntesis de precursores de acetil-CoA, molécula determinante en el TCA. La enzima málica, a través de malato, genera piruvato que es transformado por la piruvato deshidrogenasa en acetil-CoA. Se han encontrado altos niveles de esta enzima en bacteroides. *R. meliloti* posee dos enzimas málicas NAD y NADP dependientes. Mutantes en la enzima dependiente de NAD muestran nodulación pero no fijación de nitrógeno (80). Mutantes en la enzima NADP dependiente son Fix^+ (81). Esto demuestra que la enzima málica dependiente de NAD junto con la piruvato deshidrogenasa son parte importante para la generación de acetil-CoA en el bacteroide. Al parecer, de cada dos moles de malato uno de estos es para oxaloacetato mientras que el otro es metabolizado hacia piruvato que nos produce acetil CoA. Otros organismos como *E. coli* también poseen dos enzimas málicas.



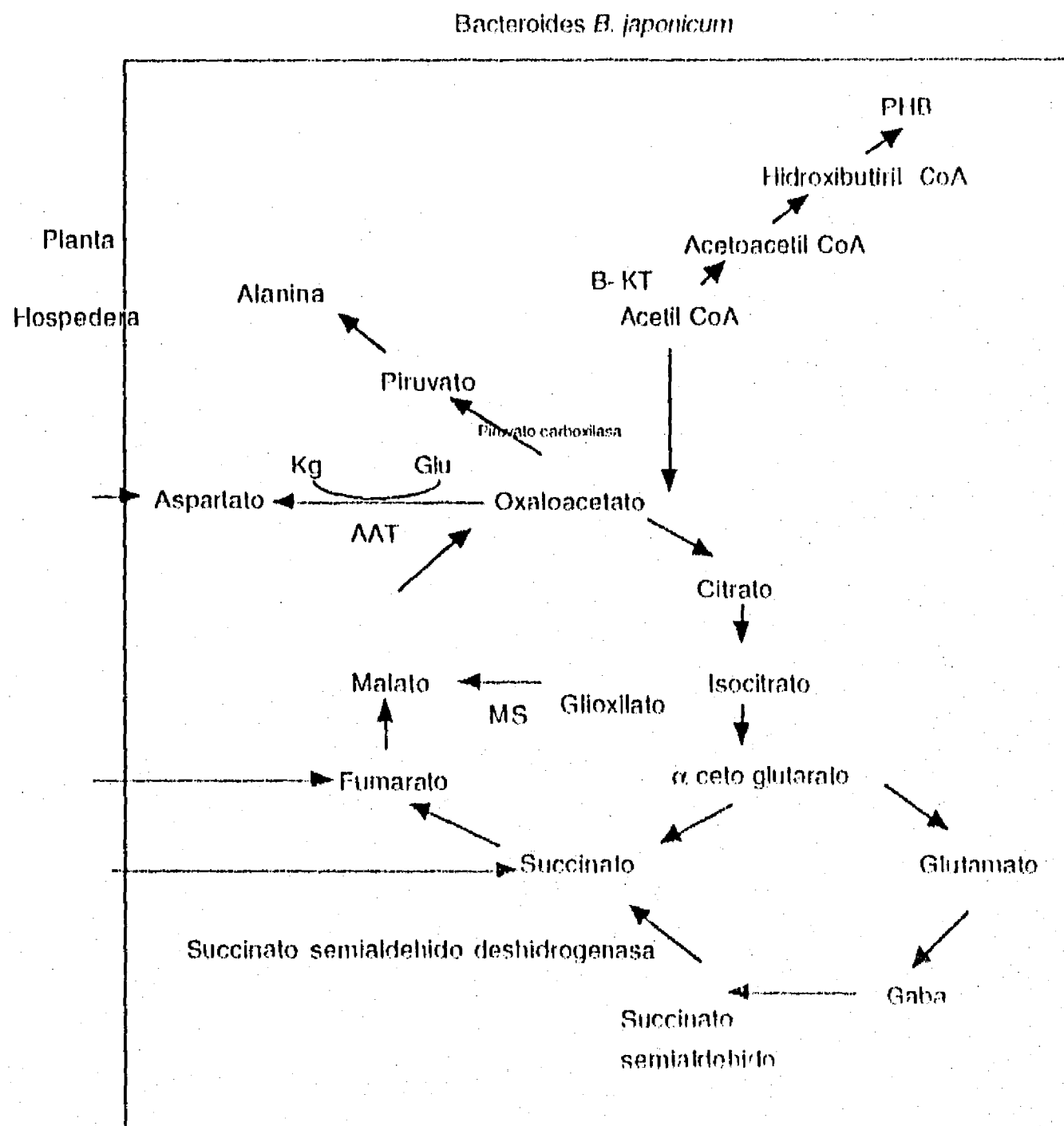
R. meliloti & Mutante Fix^+
 ★ Mutante fix^-

Enzimas con neotillas

Metabolismo del carbono en bacteroides de *Bradyrhizobium japonicum*.

En bacteroides de *Bradyrhizobium japonicum* (76) se han propuesto las siguientes vías metabólicas. Ciclo de Krebs, malato aspartato, síntesis de polihidroxibutirato, α -cetoglutarato-glutamato y un ciclo parcial del glioxilato (esquema 1). Con excepción de una reacción, (piruvato carboxilasa) todas las demás rutas se tienen bien documentadas mediante actividades enzimáticas o con isótopos radioactivos. Sin embargo el flujo de carbono o la contribución de cada una de estas rutas al proceso simbiótico queda por esclarecerse.

Esquema 1



Formación de complejos metabólicos.

Las enzimas que participan en las vías metabólicas de los organismos no deben de ser vistas como unidades separadas. Se propone que existe una relación estrecha entre las enzimas constituyendo complejos enzimáticos (metabolones) que aseguran el buen funcionamiento celular (82). El flujo a través de una vía puede estar regulado por contactos físicos entre las enzimas consecutivas para la canalización segura de los metabolitos. Al parecer las asociaciones se dan específicamente entre las enzimas de la misma vía. Por ejemplo se han detectado asociaciones entre enzimas de glicólisis y entre las enzimas de gluconeogénesis. La aldolasa se asocia con triosa-fosfato-isomerasa y gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa. Estas enzimas trabajan en una misma vía para producir piruvato. (83)

Las enzimas del ciclo de Krebs, tales como malato deshidrogenasa y fumarasa, también se asocian (83). Esta asociación se ve inhibida en condiciones de alta energía, pero se reasocian cuando baja el contenido energético, favoreciendo las reacciones del TCA. Esto indica que las dos enzimas están íntimamente ligadas y su interacción depende del estado energético de la célula. La citrato sintasa también se asocia con malato deshidrogenasa o fumarasa (84). Otra enzima que forma complejos con citrato sintasa es la piruvato deshidrogenasa. Parece ser que la piruvato deshidrogenasa se encuentra saturada con moléculas de citrato sintasa *in vivo*. Esto podría explicar porqué el acetil-CoA formado del piruvato es incorporado en citrato más que en cuerpos cetónicos (85). También se tiene evidencia de reconocimiento específico entre citrato sintasa y el transportador mitocondrial de citrato (86). El transportador de citrato puede ser parcialmente purificado al inmovilizar citrato sintasa.

Las enzimas del ciclo de Krebs también se asocian con las de la vía aspartato- malato. La aspartato aminotransferasa se asocia con malato dehidrogenasa y fumarasa formando un complejo terciario. Se podría especular que dependiendo de las concentraciones intracelulares de oxaloacetato éste se drenaría hacia el ciclo de Krebs o la vía del malato - aspartato, dando una respuesta fisiológica rápida y eficiente. También se ha demostrado que las enzimas del ciclo del glioxilato malato sintasa e isocitrato liasa se asocian específicamente (87).

En general la teoría de que las enzimas metabólicas se organicen como metabolones permite explicar que se alcancen altas tasas de catálisis con un número restringido de intermediarios y que los metabolitos puedan ser específicamente dirigidos hacia una u otra vía. Los intermediarios son protegidos ya que su tiempo de vida media es reducido. Es concebible que la célula organice de esta manera algunas de sus complejas vías metabólicas (88,89).

Antecedentes particulares

El conocer cómo funcionan metabólicamente los organismos es una tarea que debe llevarse a cabo. Parte de mi proyecto se centró en tratar de establecer las vías para el metabolismo del carbono que operan tanto en vida libre como en simbiosis de una bacteria fijadora de nitrógeno, *R. tropici* (90). Esta bacteria establece asociaciones simbióticas con varias leguminosas (Ver Hernández Lucas- et al. Apéndice 1). Es resistente a metales pesados y a acidez, también posee una sola copia de los genes de la nitrogenasa. La caracterización de *R. tropici* es considerada como una de las contribuciones más importantes del grupo de investigación al que pertenezco, y fue el resultado del análisis polifásico de poblaciones de *Rhizobium* aislados de nódulos de frijol. En *R. tropici* los genes para nodulación y fijación de nitrógeno se encuentran en un plásmido de aproximadamente 400 Kb. Este plásmido al ser transferido a una bacteria relacionada con

Rhizobium, *Agrobacterium*, confiere a éste la capacidad de nodular y fijar nitrógeno en frijol (91). En otros casos en los que se había transferido el plásmido simbiótico de otras especies de *Rhizobium* a *Agrobacterium*, se encontró que se transfería sólo la capacidad de nodulación pero no la de fijar nitrógeno. Estos resultados sugirieron que el plásmido simbiótico de *R. tropici* constituía un paquete genético bastante completo para dirigir una simbiosis efectiva en frijol. De ahí que surgiera el proyecto de analizar este plásmido simbiótico y se diseñó una estrategia para obtener mutantes en dicho plásmido. El análisis de una de estas mutantes mostró que en el plásmido de *R. tropici* CFN299 se encontraba un gene del ciclo de Krebs, el gene *pcsa*, que codifica para la citrato sintasa (92). Mutantes en este gene tenían una capacidad de nodulación reducida. También observamos que existía otra copia de este gene en el cromosoma de *R. tropici*. Fue de mi interés entender tanto el papel del gene plasmídico de citrato sintasa como el del gene cromosomal por lo que propuse participar en dos aspectos diferentes de esta investigación. Por un lado, en el análisis bioquímico de las vías metabólicas de utilización de carbono en *R. tropici*, y por otro lado el estudio del gene cromosomal de citrato sintasa de la misma bacteria. La parte medular de mi tesis se refiere a este último punto y su objetivo general fue describir los papeles de cada una de las enzimas de citrato sintasa, la codificada en el cromosoma y la del plásmido simbiótico, así como definir las relaciones genéticas entre ambos genes. Para cumplir con el objetivo se planteó clonar y secuenciar el gene cromosomal de citrato sintasa y compararlo con el gene plasmídico y con otros genes reportados. Además se requirió obtener mutantes sencillas y dobles de cada uno de los genes para analizar sus fenotipos en simbiosis y en vida libre. Los resultados se reportaron en los dos artículos que presento a continuación y en la sección de resultados adicionales se analizan datos de la secuencia de la región 5' adyacente al gene plasmídico de citrato sintasa. Esta región fue estudiada con el propósito de tener más elementos para esclarecer el papel y origen de este gene.

Resultados

Carbon Metabolism Enzymes of *Rhizobium tropici* Cultures and Bacteroids

VASSILY I. ROMANOV,^{1,2*} ISMAEL HERNÁNDEZ-LUCAS,² AND ESPERANZA MARTÍNEZ-ROMERO²
A.N. Bach Institute of Biochemistry, RAS, Moscow 117071, Russia,¹ and Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México²

Received 24 November 1993/Accepted 14 April 1994

We determined the activities of selected enzymes involved in carbon metabolism in free-living cells of *Rhizobium tropici* CFN299 grown in minimal medium with different carbon sources and in bacteroids of the same strain. The set of enzymatic activities in sucrose-grown cells suggests that the pentose phosphate pathway, with the participation of the Entner-Doudoroff pathway, is probably the primary route for sugar catabolism. In glutamate- and malate-grown cells, high activities of the gluconeogenic enzymes (phosphoenolpyruvate carboxykinase, fructose-6-phosphate aldolase, and fructose biphosphatase) were detected. In bacteroids, isolated in Percoll gradients, the levels of activity for many of the enzymes measured were similar to those of malate-grown cells, except that higher activities of glucokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and NAD-dependent phosphogluconate dehydrogenase were detected. Phosphoglucomutase and UDP glucose pyrophosphorylase showed high and constant levels under all growth conditions and in bacteroids.

Nitrogen fixation in legume root nodules is driven by photosynthates, mainly in the form of sucrose, that are produced in the shoots. The reducing power and ATP indispensable for nitrogenase function are produced in bacteroids by the oxidation of these host plant-provided carbon compounds (2, 26, 30).

One of the approaches used to gain insight into the C-metabolic pathways in bacteroids has been to determine the activities of key enzymes in different biochemical pathways and to compare the activities obtained from bacteroids with those of free-living bacteria grown under different conditions. The general conclusion from this type of work, which has been performed on *Rhizobium* sp. strain NGR234, (25), *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae (16), and *R. meliloti* (4, 9), is that carbohydrate-catabolic enzymes in bacteroids have low activities whereas tricarboxylic acid cycle enzymes have high activities. This conclusion supports the generally accepted concept that the major carbon source for bacteroids are the C₄-dicarboxylic acids: malate, succinate, and fumarate (2, 30).

R. tropici was recently identified as a new species on the basis of DNA-DNA hybridization, ribosomal gene sequences, electrophoretic mobilities of metabolic enzymes, and phenotypic characteristics. Strains of *R. tropici* are capable of nodulating *Phaseolus vulgaris* beans as well as several other legumes. The bacteria are highly tolerant to stress conditions such as high temperature, acidity, and the presence of heavy metals, and they have highly stable symbiotic properties (14). These characteristics make *R. tropici* an attractive subject for research.

Here we report the results of comparative studies of carbon-metabolic enzymes by using *R. tropici* bacteroids isolated from *P. vulgaris* root nodules and free-living cells of *R. tropici* grown on several carbon sources.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial cultures and growth conditions. A spectinomycin-resistant derivative of *R. tropici* CFN299 was used. Cultures grown for 1 day on PY agar medium plates (20) were used to inoculate liquid minimal medium (MM). The basal MM had the following composition (per liter of demineralized water): K₂HPO₄, 0.25 g; KH₂PO₄, 1.0 g; MgSO₄ · 7H₂O, 0.2 g; NH₄Cl, 0.375 g; CaCl₂, 0.2 g; FeCl₃, 0.01 g; biotin, 1 mg; H₃BO₃, 3.17 mg; Na₂MoO₄, 1.0 mg; MnSO₄ · 4H₂O, 1.52 mg; ZnSO₄ · 7H₂O, 0.25 mg; and CuSO₄ · 5H₂O, 0.087 mg. The pH was adjusted to 6.8 with 1 N NaOH. The basal MM was supplemented with 2 g of carbon source per liter, and NH₄Cl was omitted from the MM containing glutamate. Cultures were grown at 30°C with shaking at 220 rpm.

Preparation of cell extracts. *R. tropici* CFN299 cultures in the mid- to late exponential phase of growth were centrifuged at 15,000 × g for 10 min at 4°C. The pellets were washed twice in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) and were resuspended in a small volume of the same buffer. The cells were sonicated on ice six times for 45-s intervals with 1-min rest periods by using a Soniprep (MSE). The lysates were centrifuged at 36,000 × g for 30 min at 4°C to remove cell debris. The supernatants were divided into two samples. The first sample was immediately used for the citrate synthase, invertase, and maltase assays. To the second sample were added 2-mercaptoethanol (0.2% vol/vol) and 0.1 mM disodium EDTA (9), and it was stored on ice and used for the other enzymatic assays within 5 h after preparation.

The protein concentration in crude extracts (including bacteroid extracts [see below]) ranged from 0.9 to 2.6 mg/ml. The final protein concentration in the assay mixtures ranged from 5 to 13 μg/ml for malate dehydrogenase and 200 to 500 μg/ml for invertase. For other enzymes, 20 to 260 μg of protein per ml was used as appropriate to give similar rates of change in A₃₄₀ in all assays.

Bacteroid isolation. *P. vulgaris* seeds (cv. Negro Xamapa) were surface disinfected and germinated as previously described (13). Three-day-old seedlings were inoculated with *R. tropici* CFN299, planted in sterile vermiculite, and grown aseptically in a greenhouse. The pots were treated with a

* Corresponding author. Mailing address: Symbiotic Nitrogen Fixation Group, A.N. Bach Institute of Biochemistry, RAS, Leninsky Prospect, 33, Moscow, Russia 117071. Phone: (7-095) 952 3863. Fax: (7-095) 954 2732.

nitrogen-free nutrient solution twice per week and with water once per week (13).

The identities of the bacteria in nodules were determined as described previously (13). Pink nodules (3.5 g) from 24-day-old plants were removed from the roots and gently crushed in a chilled mortar containing 2 ml of phosphate-buffered saline (PBS; 0.15 M NaCl in 0.05 M KH_2PO_4 [pH 7.6]). The homogenate was filtered through four layers of cheesecloth, and bacteroids were isolated by centrifugation through self-generating Percoll gradients as described by Reibach et al. (21), except that a Sorvall RC-SB centrifuge with a SS-34 rotor was used at $45,000 \times g$ for 55 min.

The bacteroid fraction was collected, washed with PBS, and centrifuged at $25,000 \times g$ for 15 min. The pellet was washed twice with 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) with centrifugations at $15,000 \times g$ for 15 min. The bacteroid pellet was suspended in 4 ml of the same buffer, and the crude extract was obtained as described above for bacterial cultures.

Enzyme assays. Invertase (EC 3.2.1.26) and maltase (EC 3.2.1.20) were assayed as described by Hoelzle and Streeter (8), but the reaction mixture was incubated for 20 min at 30°C. Reactions were terminated by boiling for 5 min, and glucose production was measured with a Boehringer Mannheim kit. Boiled extracts were used as controls, and the glucose values obtained were subtracted from the values obtained with the experimental samples. Malic enzymes (NAD dependent [EC 1.1.1.38] and NADP dependent [EC 1.1.1.40]) were assayed by measuring the production of pyruvate from L-malate as described by McKay et al. (15), but the final absorbance was measured at 445 nm (3). Other enzyme assays were carried out with reaction volumes of 1 ml and a Perkin-Elmer Lambda 3A spectrophotometer at room temperature.

Citrate synthase (EC 4.1.3.7) was assayed in a reaction mixture containing 50 μmol of Tris-HCl buffer (pH 8.0), 0.1 μmol of acetylcoenzyme A, 0.25 μmol of 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) and 0.2 μmol of oxalacetate. The reaction was initiated by the addition of oxalacetate, and enzyme activity was determined by monitoring the increase in A_{412} .

Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37) (25), β -hydroxybutyrate dehydrogenase (EC 1.1.1.30) (25), isocitrate dehydrogenase (EC 1.1.1.41) (19), phosphoenolpyruvate (PEP) carboxykinase (EC 4.1.1.49) (7), phosphoglucomutase (EC 1.7.5.1) (12), UDP glucose pyrophosphorylase (EC 2.7.7.9) (24), and sucrose phosphorylase (EC 2.4.1.7) (18) were assayed spectrophotometrically by monitoring the change in A_{340} .

Fructose biphosphatase (EC 3.1.3.11) was assayed as described by Stowers and Elkan (27) but with 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0). PEP carboxylase (EC 4.1.1.31) was measured as described by Gordon and Kessler (6) but with 50 mM MOPS (morpholinepropanesulfonic acid [pH 8.0]) or 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8). Entner-Doudoroff (ED) enzymes (6-phosphogluconate dehydratase [EC 4.2.1.12] and 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase [EC 4.1.2.14]) were assayed by two methods as described by Lessie and Vander Wyk (11). In the first method, the rate of the reaction was monitored spectrophotometrically with lactate dehydrogenase and NADH (11). In the second method, pyruvate formation was measured by using 2,4-dinitrophenylhydrazine (11), with modifications as described above for malic enzymes (15). Both methods gave similar results.

Glucokinase (EC 2.7.1.2) was assayed in a reaction mixture containing 50 μmol of Tris-HCl buffer (pH 8.5), 5 μmol of MgCl_2 , 0.5 μmol of NADP, 2 μmol of ATP, 50 μmol of glucose, and 7 U of glucose-6-phosphate dehydrogenase. The reaction was initiated by the addition of glucose. Fructokinase

(EC 2.7.1.4) was assayed in the same mixture, but glucose was replaced by fructose and 7 U of phosphoglucose isomerase was added. Fructose biphosphate aldolase (EC 4.1.2.13) was assayed in a mixture containing 50 μmol of Tris-HCl buffer (pH 8.0), 3 μmol of fructose 1,6-bisphosphate, 1 μmol of NAD, 5 μmol of MgCl_2 , 1 μmol of Na_2HAsO_4 , 8 U of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and 5 U of triosephosphate isomerase. Fructose 1,6-bisphosphate was added to start the reaction.

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.49) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (EC 1.1.1.44) were assayed in a reaction with 50 μmol of Tris-HCl buffer (pH 8.5); 5 μmol of MgCl_2 , 0.5 μmol of NADP, and 1 μmol of glucose 6-phosphate or 6-phosphogluconate, respectively. NAD-dependent 6-phosphogluconate dehydrogenase (EC 1.1.1.43) was assayed in the same mixture but with 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.6). All reactions were initiated by the addition of substrates.

Corrections were made for background NADH-oxidase or NAD- and NADP-reductase activities in all assays. Leghemoglobin was determined as described by LaRue and Child (10) with an SLM Aminco fluorimeter. Bovine hemoglobin was used as the standard. The excitation wavelength was 405 nm, and the fluorescence was measured at 600 nm. Protein was determined by using a Bio-Rad kit with bovine serum albumin as the standard.

Chemicals. ATP, ADP, DTNB, EDTA, PEP, pyruvic acid, isocitric acid, oxaloacetic acid, malic acid, glutathione (reduced form), and bovine hemoglobin were from Sigma. All other chemicals and enzymes were from Boehringer Mannheim.

RESULTS AND DISCUSSION

Carbon metabolism enzymes in free-living cells. Invertase activity was 3.0- to 4.5-fold higher in *R. tropici* CFN299 cells grown in sucrose than in those grown in glutamate or malate (Table 1). There was no detectable sucrose phosphorylase activity in extracts of sucrose grown-cells, suggesting that invertase is the sole enzyme responsible for sucrose cleavage. Similar results were reported for *Rhizobium* sp. strain NGR234 (25).

In sucrose-grown cells, high activities of the key enzymes of the pentose phosphate pathway (glucose-phosphate dehydrogenase and phosphogluconate dehydrogenase), high activities of the ED enzymes, and very low activities of a key enzyme of the Embden-Meyerhof-Parnas pathway (phosphofruktokinase) were found. There were no significant differences between enzyme activities of glucose- and fructose-grown cells and the data for sucrose-grown cells listed in Table 1, except for fructokinase (low when grown in glucose) and invertase and maltase (in glucose and fructose, these activities were similar to those found in malate). In general, the results in Table 1 agree with those obtained with other species of fast-growing rhizobia, *R. leguminosarum* bv. trifolii (23) and bv. viciae (16), *R. meliloti* (5, 9), and *Rhizobium* sp. strain NGR234 (25). Taken together, these results indicate that the pentose phosphate pathway, with the participation of the ED pathway, is the primary route for sugar catabolism in *Rhizobium* spp.

We found that the activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase and of the ED enzymes in C_1 substrate-grown cells were only 30 to 38% of the activities in sucrose-grown cells. In contrast, NADP-phosphogluconate dehydrogenase activities were similar in cells grown on any of the carbon sources tested.

In comparison with sucrose-grown cells, bacteria grown in glutamate and malate had sharply increased levels of PEP carboxykinase and fructose-6-phosphate aldolase activities.

TABLE 1. Activities of selected carbon metabolism enzymes in free-living cells growing in different carbon sources and in bacteroids of *R. tropici* CFN299

Enzyme	Activity ^a (nmol/min/mg of protein) of:			
	Sucrose-grown cells	Glutamate-grown cells	Malate-grown cells	Bacteroids isolated in Percoll gradients
Invertase	87 ± 4	29 ± 3	19 ± 5	16 ± 3
Maltase	148 ± 8	61 ± 4	37 ± 6	31 ± 7
Glucokinase	467 ± 25	176 ± 22	372 ± 50	624 ± 47
Fructokinase	385 ± 40	161 ± 8	215 ± 24	144 ± 17
Glucose-6-phosphate dehydrogenase-NADP	538 ± 38	206 ± 24	184 ± 25	379 ± 29
Phosphogluconate dehydrogenase				
NADP dependent	171 ± 22	140 ± 40	179 ± 20	156 ± 15
NAD dependent	105 ± 10	43 ± 12	47 ± 6	188 ± 20
ED enzymes	88 ± 9	28 ± 4	25 ± 12	34 ± 7
Phosphofruktokinase ^b	3	1	1	18
Fructose biphosphate aldolase	19 ± 5	75 ± 10	112 ± 15	53 ± 5
Citrate synthase	161 ± 12	93 ± 9	160 ± 17	178 ± 18
Malate dehydrogenase	3,698 ± 275	5,367 ± 600	10,100 ± 1170	8,970 ± 640
Isocitrate dehydrogenase	644 ± 45	515 ± 43	811 ± 87	596 ± 55
Malic enzymes				
NAD dependent	213 ± 21	206 ± 21	293 ± 21	354 ± 39
NADP dependent	133 ± 9	166 ± 14	157 ± 16	125 ± 15
Hydroxybutyrate dehydrogenase	10 ± 3	64 ± 11	4 ± 1	901 ± 130
PEP carboxykinase	8 ± 2	211 ± 26	432 ± 130	205 ± 15
Fructose biphosphatase	119 ± 30	90 ± 10	94 ± 11	231 ± 18
Phosphoglucomutase	341 ± 40	327 ± 20	269 ± 20	333 ± 34
UDP glucose pyrophosphorylase	352 ± 15	363 ± 37	339 ± 40	273 ± 32

^a Each value is the mean ± standard deviation of three or four independent experiments.

^b Data were obtained from a single experiment.

This confirms previous reports that these two enzymes play an important role in gluconeogenesis in rhizobia (16, 17). A high activity of the PEP carboxykinase in succinate- but not glucose-grown *R. meliloti* cells has also been shown (4, 5).

Phosphoglucomutase and UDP-glucose phosphorylase, which drive glucose 6-phosphate into biosynthetic pathways, does not appear to be regulated by the carbon source in *R. tropici*, because high activities were obtained in different carbon sources. Activities of the malic enzymes and the tricarboxylic acid cycle enzymes citrate synthase and isocitrate dehydrogenase showed only slight variations as a result of carbon source, but malate dehydrogenase activity was 2.7-fold higher in malate- than sucrose-grown cells.

Carbon metabolism enzymes in bacteroids. We confirmed that the bacteria occupying the nodules used for bacteroid isolation were only *R. tropici* CFN299 by identifying individual colonies from nodules for their antibiotic resistance and by observing their growth characteristics in selective media. Bacteroids were isolated from nodules in four different experiments, and the cell extracts obtained were completely free from leghemoglobin and had no activity of PEP carboxylase.

Bacteroids contained carbohydrate-catabolizing enzymes at similar or even higher levels compared with free-living bacteria grown in malate. It should be mentioned that the activity of the NAD-dependent phosphogluconate dehydrogenase in bacteroids was higher than that found in free-living bacteria grown on any of the carbon sources tested. The product of these enzymes in rhizobia is not clear (reviewed in reference 26), but the activity found in bacteroids leads us to suggest that it has a role in the symbiotic form of *R. tropici*. An unexpected finding was the presence of invertase activity in bacteroids, since it has been shown that bacteroids from soybean nodules have maltase activity but not invertase activity (29). This is why invertase is considered to be an enzymatic marker for the plant cytosol (21). Very low invertase activity has been reported in

Rhizobium sp. strain NGR234 bacteroids (25). It is not clear if invertase plays some role in *R. tropici* bacteroids, but we believe that invertase activity should not be considered a marker enzyme of the plant cytosol in the legume root nodules formed by *Rhizobium* spp.

It has been shown that gluconeogenesis probably does not occur in *R. leguminosarum* bv. *viciae* (17) and in *R. meliloti* (4, 5) bacteroids. As shown in Table 1, *R. tropici* bacteroids have high activities of PEP carboxykinase, fructose biphosphate aldolase, and fructose biphosphatase. This suggests that the gluconeogenic pathway is operating in *R. tropici* bacteroids.

We found high activities of tricarboxylic acid cycle enzymes, as has been reported before for *Rhizobium* bacteroids (2, 4, 5, 9, 16), with the exception of strain NGR234 (25). In addition, we found high activities of malic enzyme, in agreement with other reports (3, 15).

The activity of one of the key enzymes involved in poly-β-hydroxybutyrate degradation, β-hydroxybutyrate dehydrogenase, was dramatically higher in bacteroids than in free-living cells. This increased activity in bacteroids ranged from 14-fold when compared with glutamate-grown cells to 220-fold when compared with malate-grown cells. This fact leads us to postulate that in *R. tropici* bacteroids the poly-β-hydroxybutyrate cycle is actively operating, as has been shown in *Bradyrhizobium* bacteroids (1, 22).

General remarks. The regulation of carbon-metabolizing enzymes in rhizobia by carbon source is species dependent. In succinate-grown cells of *Bradyrhizobium* strain 32H1, none of the carbohydrate-catabolizing enzymes assayed for were detectable (28). In *Rhizobium* sp. strain NGR234, key enzymes of the pentose phosphate and ED pathways in glucose-grown cells had 3- to 18-fold-greater activity than in succinate-grown cells (25), and similar data have been obtained with *R. meliloti* (4, 5). For another *R. meliloti* strain (9) and for *R. leguminosarum* bv. *viciae* (16), it has been shown that the response of

the sugar-catabolizing enzymes, in relation to growth on organic acids, was weak and more selective. Considering the data presented in Table I, we suggest that in *R. tropici* CFN299, many enzymes involved in sugar metabolism are probably not highly regulated by the carbon source.

In bacteroids, the high activities of the malic and tricarboxylic acid cycle enzymes, in concert with the high activities of the gluconeogenic enzymes (PEP carboxykinase, fructose-6-phosphate aldolase, and fructose biphosphate), support the general point of view that *R. tropici* bacteroids assimilate C₄ dicarboxylates. In addition, bacteroids contained high activities of glucokinase, glucose-6-phosphate-dehydrogenase, and phosphoglucose dehydrogenases (NADP and NAD dependent). This fact makes it possible to speculate that *R. tropici* bacteroids can simultaneously assimilate organic acids as well as some sugars. This proposal has also been made for *R. leguminosarum* bv. viciae bacteroids (17). To clarify this point, more work should be done with isolated bacteroids and with *R. tropici* mutants defective in carbon transport and metabolism.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge Marco A. Rogel for technical help and Michael Dunn for reading the manuscript.

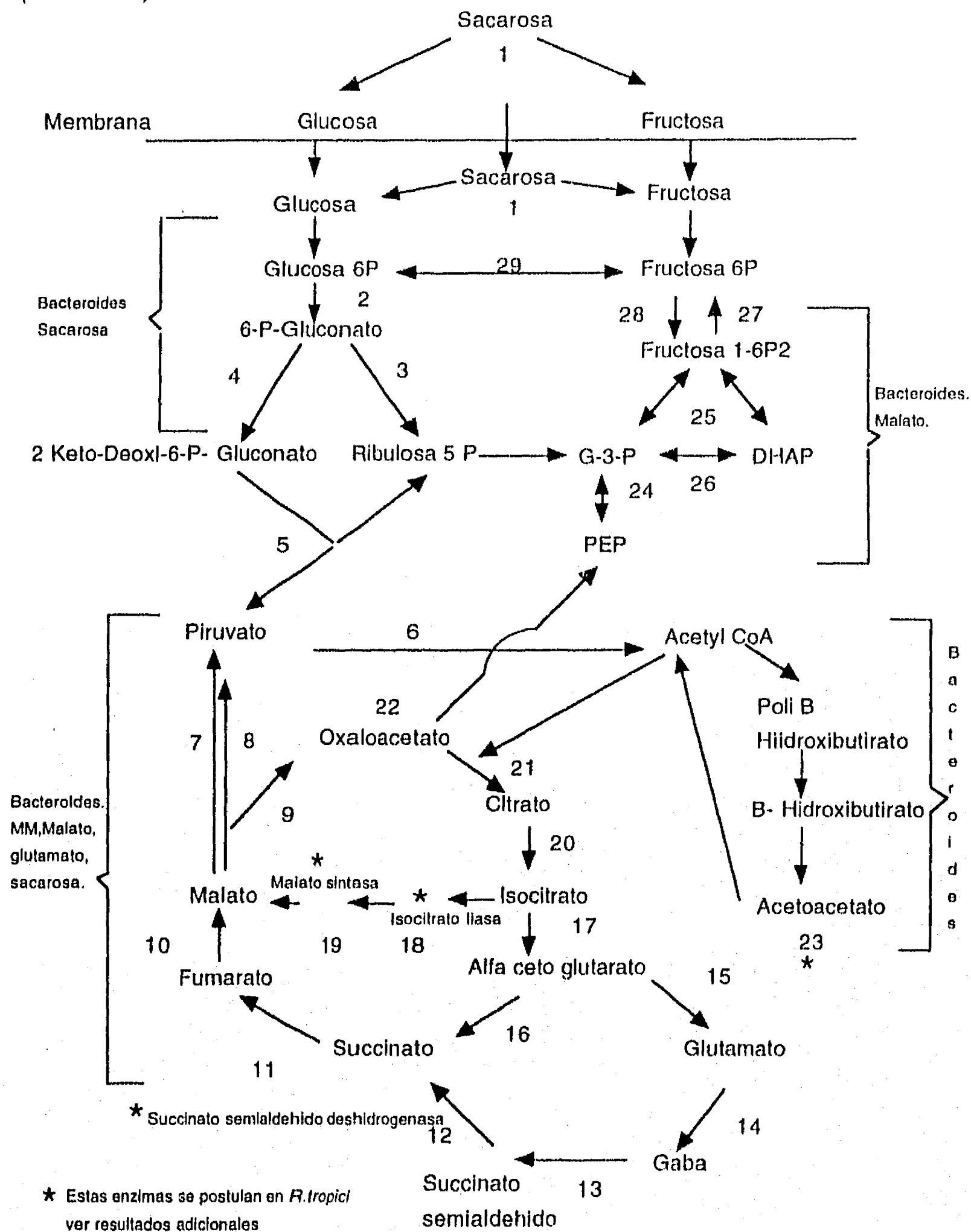
Partial financial support was obtained from DGAPA grant IN203691 from the National University of México (UNAM) and a VLIR-ABOS grant from Belgium. V. I. Romanov was supported by CONACYT-México Cátedras Patrimoniales de Excelencia, Nivel II.

REFERENCES

- Bergersen, F. J., and G. L. Turner. 1990. Bacteroids from soybean root nodules: accumulation of poly- β -hydroxybutyrate during supply of malate and succinate in relation to N₂ fixation in flow-chamber reactions. *Proc. R. Soc. London Ser. B* **240**:39-59.
- Day, D. A., and L. Copeland. 1991. Carbon metabolism and compartmentation in nitrogen-fixing legume nodules. *Plant Physiol. Biochem.* **29**:185-201.
- Driscoll, B. T., and T. M. Finan. 1993. NAD⁺-dependent malic enzyme of *Rhizobium meliloti* is required for symbiotic nitrogen fixation. *Mol. Microbiol.* **7**:865-873.
- Finan, T. M., E. McWhinnie, B. Driscoll, and R. J. Watson. 1991. Complex symbiotic phenotypes result from gluconeogenic mutations in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**:386-392.
- Finan, T. M., I. Oresnik, and A. Bottacin. 1988. Mutants of *Rhizobium meliloti* defective in succinate metabolism. *J. Bacteriol.* **170**:3396-3403.
- Gordon, A. J., and W. Kessler. 1990. Defoliation-induced stress in nodules of white clover. II. Immunological and enzymic measurements of key proteins. *J. Exp. Bot.* **41**:1255-1262.
- Hansen, R. J., H. Hinze, and H. Holzer. 1976. Assay of phosphoenolpyruvate carboxykinase in crude yeast extracts. *Anal. Biochem.* **74**:585-591.
- Hoelzle, I., and J. G. Streeter. 1990. Stimulation of α -glucosidases from fast-growing rhizobia and *Agrobacterium tumefaciens* by K⁺, NH₄⁺, and Rb⁺. *Can. J. Microbiol.* **36**:223-227.
- Irigoyen, J. J., M. Sanchez-Diaz, and D. W. Emerich. 1990. Carbon metabolism enzymes of *Rhizobium meliloti* cultures and bacteroids and their distribution within alfalfa nodules. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:2587-2589.
- LaRue, T. A., and J. J. Child. 1979. Sensitive fluorometric assay for leghemoglobin. *Anal. Biochem.* **92**:11-15.
- Lessie, T. G., and J. C. Vander Wyk. 1972. Multiple forms of *Pseudomonas multivorans* glucose-6-phosphate and 6-phosphoglucose dehydrogenases: differences in size, pyridine nucleotide specificity, and susceptibility to inhibition by adenosine 5'-triphosphate. *J. Bacteriol.* **110**:1107-1117.
- Maino, V. C., and F. E. Young. 1974. Regulation of glucosylation of teichoic acid. I. Isolation of phosphoglucosyltransferase in *Bacillus subtilis* 168. *J. Biol. Chem.* **249**:5169-5175.
- Martínez-Romero, E., and M. Rosenblueth. 1990. Increased bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodulation competitiveness of genetically modified *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:2384-2388.
- Martínez-Romero, E., L. Segovia, F. Martins Mercante, A. A. Franco, P. Graham, and M. A. Pardo. 1991. *Rhizobium tropici*: a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**:417-426.
- McKay, I. A., M. J. Dilworth, and A. R. Glenn. 1988. C₃-dicarboxylate metabolism in free-living and bacteroid forms of *Rhizobium leguminosarum* MNF3841. *J. Gen. Microbiol.* **134**:1433-1440.
- McKay, I. A., M. J. Dilworth, and A. R. Glenn. 1989. Carbon catabolism in continuous cultures and bacteroids of *Rhizobium leguminosarum* MNF 3841. *Arch. Microbiol.* **152**:606-610.
- McKay, I. A., A. R. Glenn, and M. J. Dilworth. 1985. Gluconeogenesis in *Rhizobium leguminosarum* MNF3841. *J. Gen. Microbiol.* **131**:2067-2073.
- Mieyal, J. J. 1972. Sucrose phosphorylase from *Pseudomonas saccharophila*. *Methods Enzymol.* **28**:935-945.
- Miller, R. W., D. G. McRae, and K. Joy. 1991. Glutamate and γ -aminobutyrate metabolism in isolated *Rhizobium meliloti* bacteroids. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**:37-45.
- Noel, K. D., A. Sánchez, L. Fernández, J. Leemans, and M. A. Cevallos. 1984. *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. *J. Bacteriol.* **158**:148-155.
- Reibach, P. H., P. L. Mask, and J. G. Streeter. 1981. A rapid one-step method for the isolation of bacteroids from root nodules of soybean plants, utilizing self-generating Percoll gradients. *Can. J. Microbiol.* **27**:491-495.
- Romanov, V. I., N. G. Fedulova, I. E. Tchermenskaya, V. I. Shramko, M. I. Molehanov, and W. L. Kretovich. 1980. Metabolism of poly- β -hydroxybutyric acid in bacteroids of *Rhizobium lupini* in connection with nitrogen fixation and photosynthesis. *Plant Soil.* **56**:379-390.
- Ronson, C. W., and S. B. Primrose. 1979. Carbohydrate metabolism in *Rhizobium trifolii*: identification and symbiotic properties of mutants. *J. Gen. Microbiol.* **112**:77-88.
- Rudick, V. L., and R. A. Weisman. 1974. Uridine diphosphate glucose pyrophosphorylase of *Acanthamoeba castellanii*. *J. Biol. Chem.* **249**:7832-7840.
- Saroso, S., M. J. Dilworth, and A. R. Glenn. 1986. The use of activities of carbon catabolic enzymes as a probe for the carbon nutrition of snakebean nodule bacteroids. *J. Gen. Microbiol.* **132**:243-249.
- Stowers, M. D. 1985. Carbon metabolism in *Rhizobium* species. *Annu. Rev. Microbiol.* **39**:89-108.
- Stowers, M. D., and G. H. Elkan. 1983. The transport and metabolism of glucose in cowpea rhizobia. *Can. J. Microbiol.* **29**:398-406.
- Stowers, M. D., and G. H. Elkan. 1985. Regulation of hexose catabolism in *Rhizobium* sp. 32111. *FEMS Microbiol. Lett.* **26**:45-48.
- Streeter, J. G. 1982. Enzymes of sucrose, maltose, and α , α -trehalose catabolism in soybean root nodules. *Planta* **155**:112-115.
- Streeter, J. G. 1991. Transport and metabolism of carbon and nitrogen in legume nodules. *Adv. Bot. Res.* **18**:129-187.

Metabolismo del carbono en *R. tropici*

A partir de los datos anteriores se puede proponer el siguiente esquema del metabolismo del carbono en *R. tropici*, en vida libre (medio mínimo sacarosa) como en simbiosis (bacteroides).



Enzimas

- 1.- Invertasa.
- 2.- Glucosa 6- P-deshidrogenasa.
- 3.- 6-P-Gluconato deshidrogenasa.
- 4.- 6-P-Gluconato dehidratasa.
- 5.- 2-ceto-3-deoxigluconato aldolasa.
6. Piruvato deshidrogenasa
- 7.- Enzima málica, NAD dependiente
- 8.- Enzima málica, NADP dependiente.
- 9.- Malato deshidrogenasa
- 10.- Fumarasa
- 11.- Succinato deshidrogenasa
- 12.- Succinato semialdehído deshidrogenasa.
- 13.- Gama aminobutirico transaminasa.
- 14.-Glutamato descarboxilasa
- 15.- Glutamato deshidrogenasa.
- 16.- α -ceto-glutarato deshidrogenasa.
- 17.- Isocitrato deshidrogenasa.
- 18.- Isocitrato liasa.
- 19.- Malato sintasa.
- 20.- Aconitasa.
- 21.- Citrato sintasa.
- 22.- Fosfoenol piruvato carboxiquinasa.
- 23.-Acetoacetato succinil CoA transferasa, se postula debido a que *R.tropici* probablemente tiene alto recambio de PHB.
- 24.- Gliceraldehído- 3- P- deshidrogenasa.

Enzimas

- 1.- Invertasa.
- 2.- Glucosa 6- P-deshidrogenasa.
- 3.- 6-P-Gluconato deshidrogenasa.
- 4.- 6-P-Gluconato deshidratasa.
- 5.- 2-ceto-3-deoxigluconato aldolasa.
6. Piruvato deshidrogenasa
- 7.- Enzima málica, NAD dependiente
- 8.- Enzima málica, NADP dependiente.
- 9.- Malato deshidrogenasa
- 10.- Fumarasa
- 11.- Succinato deshidrogenasa
- 12.- Succinato semialdehído deshidrogenasa.
- 13.- Gama aminobutirico transaminasa.
- 14.-Glutamato descarboxilasa
- 15.- Glutamato deshidrogenasa.
- 16.- α -ceto-glutarato deshidrogenasa.
- 17.- Isocitrato deshidrogenasa.
- 18.- Isocitrato liasa.
- 19.- Malato sintasa.
- 20.- Aconitasa.
- 21.- Citrato sintasa.
- 22.- Fosfoenol piruvato carboxiquinasa.
- 23.-Acetoacetato succinil CoA transferasa, se postula debido a que *R.tropici* probablemente tiene alto recambio de PHB.
- 24.- Gliceraldehído- 3- P- deshidrogenasa.

25.- Fructosa difosfato aldolasa.

26.- Triosa fosfato isomerasa.

27.- Fructosa 1- 6- bipofofatafa.

28.- Fosfofructoquinafa.

29.- Fosfoglucofa isomerafa.

Rhizobium tropici Chromosomal Citrate Synthase Gene

I. HERNÁNDEZ-LUCAS, M. A. PARDO, L. SEGOVIA,† J. MIRANDA,
AND E. MARTÍNEZ-ROMERO*

Departamento de Genética Molecular, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno,
Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México

Received 15 May 1995/Accepted 29 August 1995

Two genes encoding citrate synthase, a key enzyme in the Krebs cycle, have been found in *Rhizobium tropici*. One of them is in the bacterial chromosome, while the other is in the symbiotic plasmid. We sequenced the chromosomal gene and found that it is very similar to the previously reported plasmidic gene sequence in its structural region but not in its regulatory region. The chromosomal gene is able to complement an *Escherichia coli* citrate synthase mutant. In *R. tropici*, a mutant in the chromosomal citrate synthase gene has a diminished citrate synthase activity (in free-living bacteria), a diminished nodulation capacity, and forms nitrogen-fixing nodules. In contrast, the citrate synthase double mutant forms ineffective nodules devoid of bacteroids and forms less nodules than the single chromosomal mutant. It is inferred that both genes are functional and required during the nodulation process in *R. tropici*.

Citrate synthase catalyzes the condensation of acetyl coenzyme A and oxaloacetate to produce citrate and is considered the limiting step in the Krebs cycle (35). Its activity is important for carbon assimilation and for energy generation. In organisms such as *Bacillus subtilis* (10) and *Saccharomyces cerevisiae* (27), two citrate synthase genes are localized in the chromosome. In *Rhizobium tropici*, the nitrogen-fixing bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris* and other legumes (15), a citrate synthase gene is found in the bacterial chromosome (this work) and another is found in the symbiotic plasmid (19). The plasmid-borne gene (*pcsA*) has homology to the citrate synthase genes of protobacteria, and mutants of *pcsA* show a 30 to 50% decrease in nodule number compared with the wild-type strain (19).

In this study we addressed the question of the relative roles of the plasmid-borne gene and the chromosomal copy of the citrate synthase gene in *R. tropici* by analyzing the phenotypes of single or double mutants in free-living and symbiotically associated cells. In addition, a comparison of the nucleotide sequences of both genes showed that there is a large degree of conservation in the structural gene but not in the regulatory region. Our results support the hypothesis that these genes may be differentially expressed.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and media. The strains used in this study are listed in Table 1. Strains of *Escherichia coli* were grown in Luria broth, and *Rhizobium* strains were grown in PY medium (16) or in minimal medium (19) complemented with glutamate (200 mg/liter).

Cloning of the chromosomal citrate synthase gene of *R. tropici*. A DNA library was constructed from *R. tropici* CFNE 299-10, which has a deleted symbiotic plasmid and therefore lacks the *pcsA* gene. The genomic DNA was digested with *Sall*, and fragments of between 1 and 2 kb were gel purified, ligated into the *Sall* site of pBluescript SK⁺ (Stratagene), and transformed into *E. coli* DH5 α (9). From the 1,250 transformants obtained, plasmids were isolated from 50 clones and analyzed for insert size after digestion with *Sall*. All contained 1- to 2-kb

fragments. This library was hybridized with *pcsA*. Four positive clones were obtained, three with a 1,628-bp insert and the other with a 1,208-bp insert.

Sequencing. The 1,628-bp (RT1) and 1,208-bp (RT2) clones and a PCR product (to fill the sequence gap between the two clones) were sequenced with synthetic primers by the method of Sanger et al. (29).

Citrate synthase mutants. Site-directed mutants were generated by double recombination of a 650-bp internal fragment of the *pcsA* gene interrupted with a *Bam*HI fragment from interposon pHP45 Ω carrying spectinomycin resistance (5). This construct was cloned in the vector pWS233 (31). Mutants were obtained after mating *E. coli* (*pcsA::\Omega*) with strain CFNE 299-10 and selecting transconjugants in PY medium containing 7.5% sucrose, streptomycin (0.05 mg/liter), and spectinomycin (0.05 mg/liter), after which the mutants were tested for gentamicin sensitivity.

Hybridization conditions. DNA was purified as previously described (28) and transferred from agarose gels to nitrocellulose filters (32). Probes were labeled with ³²P by nick translation (25), and hybridization was carried out under high stringency conditions (28).

Assay for nodulation and nitrogen fixation. *Phaseolus vulgaris* cv. Negro Jamapa nodulation assays were performed in flasks with agar or vermiculite (13). Nitrogenase activity was measured by acetylene reduction 21 days after inoculation. Student's *t* test was performed to analyze the differences between nodule numbers in the different treatments.

Bacteroid isolation. Nodules from 6 to 10 plants harvested 23 and 28 days after inoculation were crushed in a mortar and filtered to eliminate debris as described previously (26). Bacteroids were isolated by centrifugation through Percoll gradients (23). The bacteroid fraction was collected, washed, and suspended in 1 ml of Tris-HCl (50 mM, pH 8) and sonicated three times for 1 min with 1-min rest periods. The homogenate was centrifuged, and the supernatant was used to measure citrate synthase activity.

Citrate synthase assays. Bacteroids or cells grown for 12 h in PY medium were harvested and disrupted by sonication as described above, and citrate synthase activity was measured spectrophotometrically at 412 nm by 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid reduction (8). Citrate synthase activity measurements were performed at least three separate times for free-living bacteria. Determinations for bacteroids were performed twice in independent assays.

Sequence analysis and primers. Sequence alignments were carried out with the PC/Gene program (Intelligenetics, Inc., and Gensoft, S.A.) and the gap program from the Genetics Computer Group program suite (3). We synthesized the citrate synthase chromosomal gene by PCR using total DNA from the CFNE 299-10 strain. The primers used were CTCGAATTCGTCGACGCCCGCCAA GTCTCG and CTCGAATTCAAACCGGCCATCTCTGACC. A 2.2-kb PCR product containing the whole chromosomal citrate synthase gene (*ccsA*) was cloned in vector pRK7813 (33) and used for the complementation assays.

Nucleotide sequence accession number. The sequence of the chromosomal citrate synthase gene is in the Genome Sequence Database under accession number L41815.

RESULTS

Chromosomal citrate synthase gene sequence. The sequencing strategy used to determine the complete nucleotide sequence of the chromosomal citrate synthase gene is presented

* Corresponding author. Mailing address: Centro de Investigación Sobre Fijación de Nitrógeno, Ap. P. 565-A, Cuernavaca, Morelos, México. Phone: (73) 13-16-97. Fax: (73) 17-55-81. Electronic mail address: emartine@cifn.unam.mx.

† Present address: Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62271, México.

TABLE 1. Bacterial strains used in this study

Strain	Relevant characteristic(s)	Reference or source
<i>R. tropici</i>		
CFN 299	Wild type	15
CFNE 299-10	Sym plasmid deleted	14
CFNE 130	<i>pcsA1::Tn5-mob</i>	19
CFNE 140	<i>ccsA1::Ω</i> , sym plasmid deleted	This work
CFNE 150	<i>ccsA1 pcsA⁻</i>	This work
CFNE 160	<i>ccsA1 pcsA1</i>	This work
CFNE 170	<i>ccsA1 pcsA1</i> (pRK7813 <i>ccsA1⁺</i>)	This work
<i>E. coli</i>		
DH5α		9
DH5α1	<i>pcsA2::Ω</i>	This work
MX1152	<i>F⁻ gltA</i> mutant	17
MX1152(<i>ccsA1⁺</i>)	MX1152(pRK7813 <i>ccsA1⁺</i>)	This work

in Fig. 1. Two positive clones, RT1 and RT2, obtained from a genomic library, were partially sequenced in both strands. The internal citrate synthase gene fragment that lies between RT1 and RT2 was obtained by PCR synthesis with DNA from CFNE 299-10 and primers obtained from sequencing the RT1 and RT2 clones.

The coding region of *ccsA* is 90% identical to that of *pcsA* at the nucleotide level when the first ATG, 5 bp downstream from the chromosomal gene's Shine-Dalgarno sequence (Fig. 2A), is considered the protein initiation site. However, if the protein encoded by *pcsA* were smaller, starting at the ATG 114 bp downstream from the first ATG, then the identity between the two genes would be 98% at the nucleotide level. Most of the nucleotide differences between the two genes do not affect the primary structure of the protein, and there are no differences in the amino acids that are considered to be involved in the active site of the enzyme (Fig. 2B) (1, 36). In contrast, the regulatory regions of the two genes have only a 49.8% similarity (Fig. 2A).

Site-directed mutagenesis. The chromosomal citrate synthase gene of *R. tropici* was mutated in the CFNE 299-10 strain (lacking *pcsA*) by homogenization with an interrupted *pcsA* fragment, as described in Materials and Methods. These mutants were hybridized with *pcsA*, and the hybridization pattern is shown in Fig. 3. The wild-type strain CFN 299 shows two hybridizing fragments, a 9-kb fragment corresponding to the chromosomal citrate synthase gene and a second band of 6 kb corresponding to the plasmidic gene. CFNE 299-10 has only the 9-kb band. The mutant strain CFNE 140 showed the expected 11-kb band because of the 2-kb interposon insertion in

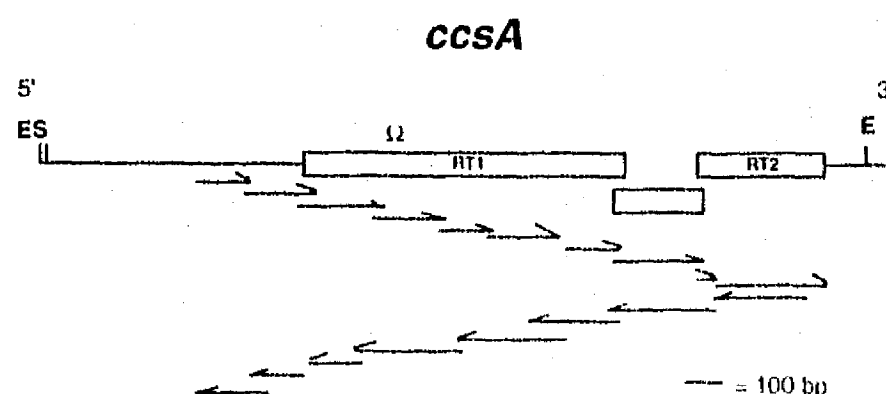


FIG. 1. Diagram of chromosomal citrate synthase gene (*ccsA*) showing Ω insertion to generate the *ccsA* mutant in *R. tropici*. The arrows delineate the extent and direction of the nucleotide sequencing procedure. Restriction sites: E, *EcoRI*; S, *SalI*.

the 9-kb *ccsA*. A substantially lower citrate synthase activity was observed in this mutant (Table 2).

The symbiotic plasmid of the wild-type *R. tropici* strain CFN 299 was introduced by conjugation to the CFNE 140 strain to substitute a wild symbiotic plasmid for the deleted pSym, thus generating a *CesA⁻ PcsA⁺* mutant strain (CFNE 150). To obtain the citrate synthase double mutant (CFNE 160), the symbiotic plasmid carrying the mutated *pcsA1* gene from CFNE 130 was transferred to the CFNE 140 mutant strain. The double and the chromosomal mutants required glutamate for growth in minimal medium containing sucrose as the carbon source. In such conditions, mutants had growth rates identical to that of the wild type. Only a slight decrease in growth rate in minimal medium without glutamate was observed with the plasmid single mutant CFNE 130, as we have previously reported (19).

Genetic complementation analysis. A 2.2-kb PCR product containing the entire *ccsA* structural gene was introduced in an *E. coli gltA* mutant, MX1152 (17), and the transconjugant MX1152(*ccsA⁺*) recovered the citrate synthase activity (Table 2). When the chromosomal citrate synthase gene was introduced in the *R. tropici* double mutant strain, CFNE 160, citrate synthase activity was recovered in the transconjugant strain, CFNE 170 (Table 2).

Symbiotic phenotypes of the citrate synthase mutants of *R. tropici*. Figure 4 shows the nodulation kinetics of the different citrate synthase mutants compared with the wild type. Both the chromosomal mutant (CFNE 150) and the double mutant (CFNE 160) have a large reduction in nodule number per plant; at 21 days these differences were highly significant ($P < 0.01$, by Student's *t* test), but no significant difference was detected between CFN 299 and CFNE 130, although CFNE 130 consistently showed a reduction in nodule number (Fig. 4). Nodules from the double mutant were white and did not fix nitrogen when measured by the acetylene reduction assay. From six plants analyzed, the average activity was almost undetectable, being 0.58% of the average activity obtained per plant nodulated by the wild-type CFN299. Furthermore, the microscopical analysis of nodules from the double mutant showed that they contained no bacteroids. The nodules obtained from both of the single mutants were *Fix⁺*, with acetylene reduction values ranging from 30 to 40% of those obtained with the wild type. By microscopic analysis, they were seen to contain bacteroids (data not shown).

The transconjugant-complemented strain, CFNE 170, recovered its citrate synthase activity and formed the same number of nodules as the CFNE 130 strain.

Citrate synthase activity from bacteroids. Bacteroids from both of the single mutants CFNE 130 and CFNE 140 had reduced specific citrate synthase activities at two different times after inoculation (Table 2). Even though there was no visible bacteroid fraction in the double mutant, the corresponding sample was assayed and no citrate synthase activity was found. This also demonstrated that the plant citrate synthase activity was not contaminating the bacteroid fraction.

DISCUSSION

Citrate synthase genes from many organisms have been sequenced and reported. The chromosomal citrate synthase gene sequence of *R. tropici* is very similar to that of the *pcsA* gene that is located on the symbiotic plasmid. We suggest that the plasmid-borne gene resulted from a duplication of the chromosomal citrate synthase gene in *R. tropici*. In *Rhizobium* spp., there are other genes for which additional copies have been found in the genome; for example, *glnS* has a counterpart,

A

ccsA
pcsA

1 100
GACCTCCACTTCGGATCCGGTGCCTCTAAATPAGGCATACATCAAAAGCGGTACGGAAAACCTACAGCTAAAGCGAGAGTPTTGGCGTCACTATPAGGTGA
CCTG GTT GCCGCTGTCAA A GGCT CTT CC CTC T ACCGTATGTGGCGAG C TCTTG C C A GATGA ACTGCC CCC

200
TTTCAACTGAAATCCGTGGTTCCTTCCATAAATGACGGCAATTCATCGTTCCGGACGGCAAGCCGGTCTACCCCATTCGCCAAAAGTTGATACPT
CCGG TGGATGC G C TCA GG A CCATCCGG TGG TCG CA A TCCAGGT A TTT T GGT GT T GCT AT TC GC TCC

300
GCAATGCACAATTCAGCGTAAGGATAACTTGGCATPAGGCTCTGGATCATATAGCTAATCGTTAGTGGCTTAACCCTTTGGCGCTTTTAAGGCG
TTCTCA GAGT GG C CC CGA CC GCGGTT A CCCC TGGGG AMG CAA AACACAG TCAGTT A C AGC G GTT C

400

CCAATCCCGCAAATTCGTGGAGGATCAGCAATACCGGAACAAAGCGGAAACTAAGTTGGGGTCAAAAGACGGTGGATTTGGCGTTAAGACCGAACCATC
AGC AG AGCCC GAG A AA ATCATG TAAC AC TCGTTGTGTCTAG C ACG CC TAGT CC A GAAACT CG TCAA C G

500
GGCCCAAGTGTCAATGATATPAGTGGCCCTTTATAAGAACACCTCCACTPTTACCTATGATCCCTGGCTTCACCTTCGACTGGGTGGTCCGAGTCCAGCATC
T G AC C C GC AT C CG C G GAAC A.T

600
ACCTPTATPAGATGGCGAAGCGGTTCGTGTCATCGCGGTATCCGATCGAAGCAGCTTGGCGAGCACGGCGACTTCCTCGAAGTCTGTATACCTGCTGC

700
TCTACGGCGAATTCGCCGACCCGACGCCAGAGGAGGACTTCGACTATCCGGTCTGGTCCACACACCAATGGTGCATGAACAAATGTCCCGCTTCCTCACCGG

800
TTTCCCGCGGATGGCATCCGATGCCGCTCATGTGCGGCTGGGTCCGGCTCTGTGGCCCTTCATCAAGACTCCAGCCGACATCACCATCCGCACCCAG
C

900
CGCATGGTTCGAAGCCPTCGTATGATCGCCAAGATGCCGAGGCTTGGCGCATGGCCPACAAGTACCATATCGGCCAGCCCTTCGPTTACCCGAAGAAGC

1000
ATCTCGACTATGATCGAACPTCCCTGGCATGTGCTPTGGCGTGGCCCTGGGAGGAATATGTGGTCAATCCGGTGGCTTGGCCCGGCCATGGACCGCACTPT
G T

1100
CATCTGCACGGGATCATTGAGCAGAACGCATCGACCTCGACGGTTCGCCPTTGGCGCTCTTCGGGGCCAAATCCCTTTGCTTGCATCGCCGCGGCATC
A C

1200
GCATGCCCTTGGGGCCGGCCATGGCGGGCCCAACGAAGCTGGGCTCAACATGCTTACGGGAATCGGCACGGTGGACCGCATTCGGGAATATATCGCCC
C CG G

1300
GGCCCAAGGACAAGAACGATCCGTTCCGATPAGATGGGCTTCGGTCAATCGGCTTTACAAGAACTACGATCCGGCGCCAAAGATCATGCAGAAGACGGCGCA

1400
CGAGGTCTTCGGGAACTCGGCATCAAGGACGATCCCTGCTCGACATTCGGATCGAAGTGGAGCGTATCGCCCTGACCGATGACTATTTATCGAGAAG
G

1500
AAGCTTTACCCGAATGTGACPTCTATTCGGTATCACGCTGAAAGGGCTCGCCPTCCCCACGACCATGTTACCGTACTGTTTGGCTTGGCCGAACCG
C A C C

1600
TCGGCTGGATTCGCCAGTGAACGAGATGATCGAAGATCCGGATCAGCGTATCGCCCGCCCGCCGACGCTCTATACCGCGCCACCGCTGCGCGAATACGT
GC

1700
TCCGGTTTCCAAGCGTTTGGC . CGAAAGGTTCAGAGAGCAAAAACCCGGTTCAGAGATCGCCGGGTTTPTTCCCTGGATAAGACATCGAGAACGATCGCCGGC
C A C G GAC TCC G TGA A G T CTGCTC GCTG ATC CGCAGGGTNGA T CA G C C A AGTG T

1771
CTTTTGGCAGGCGCTCTTCGGTCTGCATTCGCTGCCAGACAGATCGTAGCCCTGAGCATGGCTTCGAGCTCC
GC GA G AT TTG CC TGG AGGC AG GCGAGCATG A A GPT A A CGAC GTTCTG

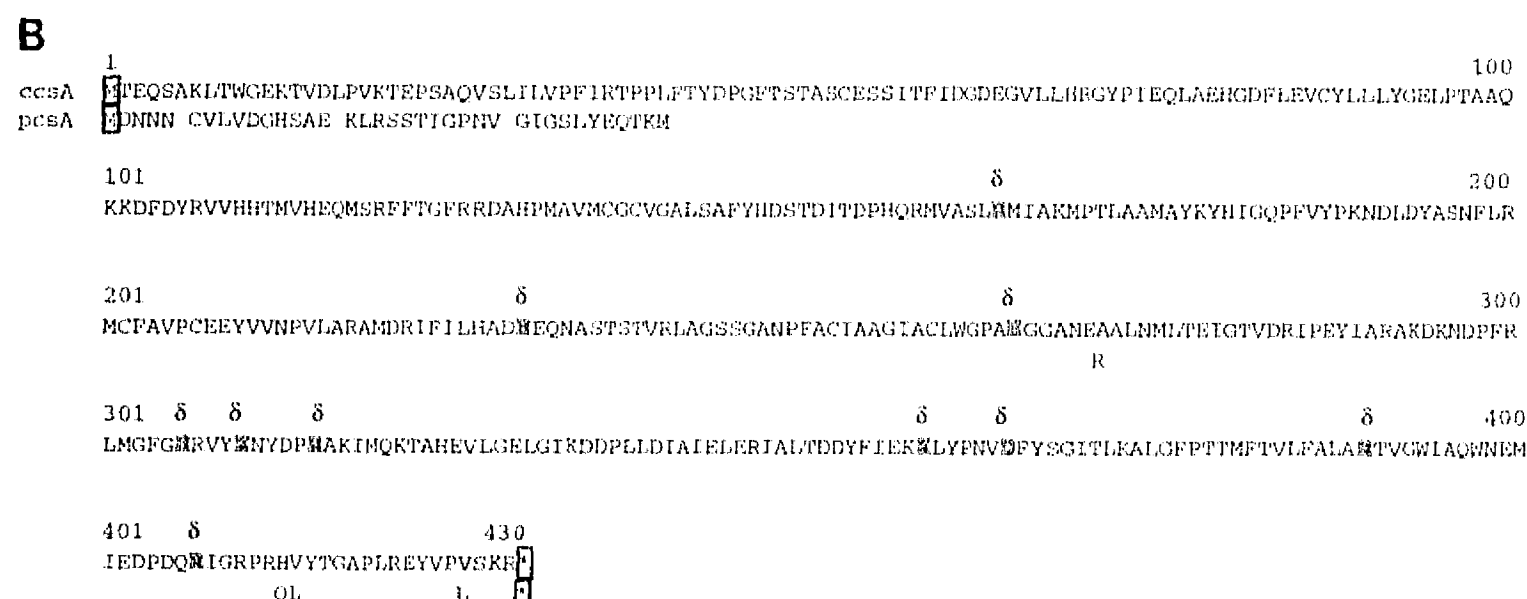


FIG. 2. (A) Chromosomal citrate synthase gene sequence and its comparison with the plasmid-borne gene. The nucleotides that are different are marked in the *pcsa* sequence. The putative Shine-Dalgarno sequence is marked with asterisks, the start and stop codons are underlined, and the putative terminal sequences are marked with dotted lines. The second ATG in the *pcsa* sequence is boxed. (B) Deduced amino acids of the chromosomal citrate synthase protein and comparison with the plasmid protein of *R. tropici*. The amino acids that are different are presented in the *pcsa* protein. Amino acids involved in substrate binding are outlined and marked with a δ . The starts and ends of the proteins are in boxes. Asterisks correspond to the stop codon of the gene.

nodM, that is specialized for symbiosis in *Rhizobium leguminosarum* (12); there are two copies of *nodPQ* (30) and two *fixN* regions in *Rhizobium meliloti* (24) and two *nifHDK* operons in *Rhizobium elii* (22). The additional copies of these genes may be the result of gene duplication. In the case of the *R. tropici* citrate synthase genes, the duplication seems to be ancient since the DNA sequence has clearly diverged outside the coding region, while there is a high degree of similarity in the coding regions of both genes. Besides duplication, there could be other explanations for the presence of *pcsa*; for example, lateral gene transfer between bacteria could have occurred and through recombination mechanisms with the chromosomal gene, the high degree of nucleotide similarity could have been obtained.

The promoter regions of the two genes are very different, and so the two genes could be regulated in different ways. In this respect, we could express the activity of only the chromosomal gene in bacteria grown in rich medium (PY) and in *E. coli*.

However, the contribution of each of these genes to the nodulation process is important. If either of the genes is present, the nodules formed are effective. This shows that both

genes are involved in symbiosis and provide the required enzymatic products for nitrogen fixation. If the *ccsA* gene is mutated, a delay in nodulation is observed and only 30 to 40% as many nodules are produced relative to the wild-type strain (Fig. 4). In contrast, when *pcsa* is inactivated, 60 to 70% of nodules are produced without any delay in nodulation. It seems that the greatest activity, both in free life and in symbiosis, is provided by the chromosomal gene, while *pcsa* might constitute an acquired and specialized gene participating in the symbiotic process. This is supported by the fact that we detected citrate synthase activity in bacteroids in both of the single mutants (Table 2).

Delayed nodulation and ineffectiveness characterize the double mutant (CFNE 160). Similarly, in *R. meliloti* succinate dehydrogenase (7), α -ketoglutarate dehydrogenase (4) and isocitrate dehydrogenase (11) mutants also form ineffective

TABLE 2. Activities of citrate synthase genes from free-living bacteria and bacteroids

Strain	Activity (nmol/min/mg of protein)
<i>E. coli</i>	
MX1152	11 ^a
MX1152(<i>ccsA</i> ⁻)	178
DH5 α	125
<i>R. tropici</i>	
CFN 299	210
CFNE 140	12 ^a
CFNE 150	11 ^a
CFNE 160	11 ^a
CFNE 170	228
CFNE 299-10	206
CFNE130	207
Bacteroids	
CFN 299	128
CFNE 130	108
CFNE 150	75
CFNE 160	ND ^b

^a Unspecific reaction.

^b ND, not detected, since there is no bacteroid fraction with CFNE 160 (see the text).

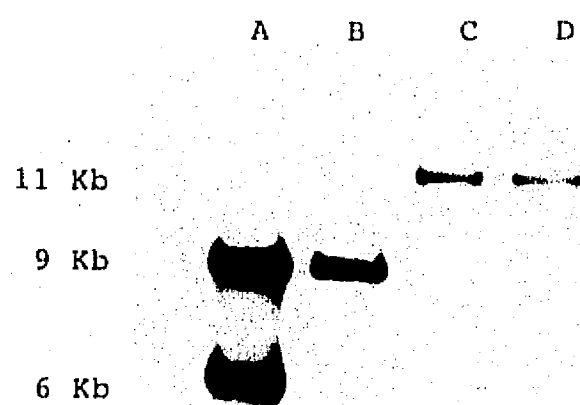


FIG. 3. Autoradiogram of *EcoRI*-digested genomic DNAs hybridized with the *pcsa* gene. The 6-kb hybridizing band corresponds to *pcsa*. The 9-kb hybridized band corresponds to *ccsA*. The 11-kb hybridized band corresponds to the *ccsA* pHP 45 Ω insertion mutant. Lanes: A, CFN 299; B, CFNE 299-10; and C and D, CFNE 140.

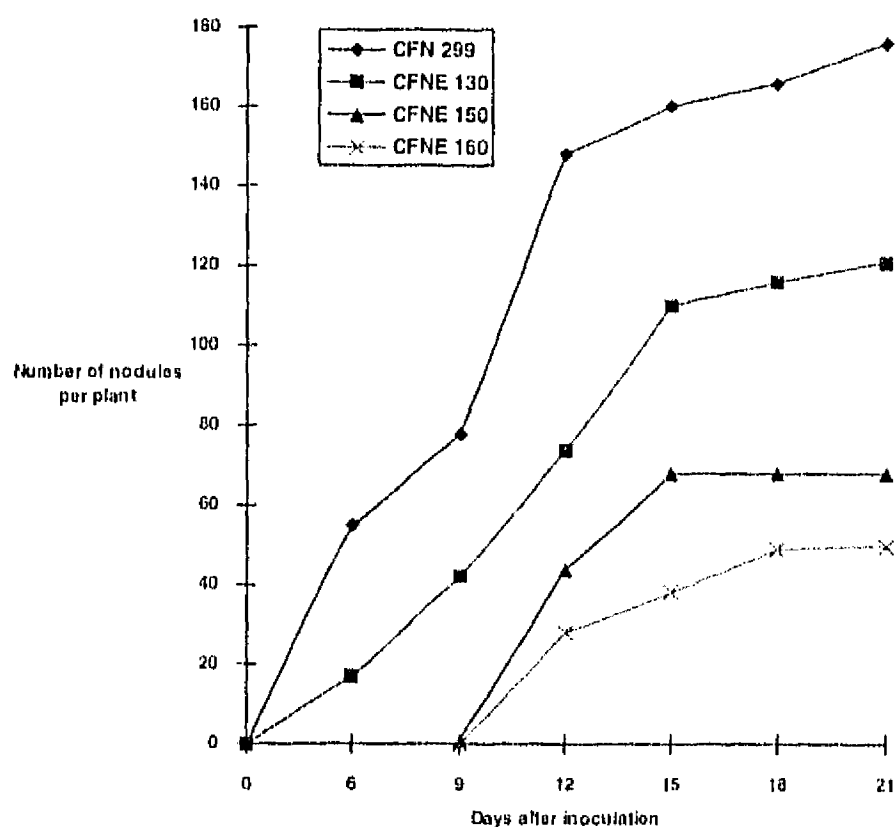


FIG. 4. Kinetics of nodule formation in bean plants (*P. vulgaris*) elicited by *R. tropici* CFN 299 wild-type and citrate synthase mutants CFNE 130, CFNE 150, and CFNE 160. This experiment was repeated three times.

nodules on alfalfa. A complete Krebs cycle is needed for symbiosis, because the C4 dicarboxylic acids (succinate, malate, and fumarate), provided by the tricarboxylic acid cycle, constitute the best carbon source for bacteroids and therefore for an efficient symbiosis (2, 34).

The reduced nodulation capacity of the citrate synthase mutants may be a consequence of their auxotrophy, as they require glutamate for growth. It has been reported that citrate synthase mutants in other bacteria such as *E. coli* also require glutamate for growth (21).

Citrate synthase constitutes one of the limiting steps in the Krebs cycle and contributes to the formation of biosynthetic intermediates through pathways like the tricarboxylic acid and glyoxylate cycles (35). Citrate synthase has also been described as a regulator of *citB*, which codes for aconitase in *B. subtilis* (18). In *E. coli*, it seems to be repressed by *arcA* (20). It also seems to be involved in the acetic acid resistance in *Acetobacter acetii* (6). Previously we have shown that an efficient nodulation in *R. tropici* is conditioned by *pesA*. All this supports the supposition that citrate synthase plays an important role as a housekeeping enzyme, but it may evolve and diverge to have different functions.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to E. Morett and X. Soberón for critical discussions, M. Dunn for reviewing the manuscript, J. Martínez for help in the computer analyses, Paul Gaytán and Eugenio López for oligonucleotides synthesis, and A. Leija for help with the microscopical analysis of the nodules.

I.H.-L. is a recipient of a doctoral studentship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Partial financial support was obtained from a VLIR-ABOS grant from Belgium.

ADDENDUM

We found a second band of the citrate synthase gene in *R. tropici* type B CIAT 899^T. In search of additional copies of citrate synthase in other *Rhizobium* species, we hybridized *R. etli* CFN42^T, *R. leguminosarum* biovar trifolii USDA 2046 and

USDA 2489, *R. meliloti* Rme2, *Rhizobium fredii* USDA 191, and *Agrobacterium* sp. strains K-Ag3 and Ch-Ag4, and only single bands were observed, indicating that most were probably unique citrate synthase copy genes. Two hybridizing bands were obtained with *Rhizobium galegae* 625 and *Rhizobium* sp. strain NGR234; it remains to be established if these bands correspond to additional citrate synthase genes and where they are located.

REFERENCES

1. Bhayana, V., and H. W. Duckworth. 1984. Amino acid sequence of *Escherichia coli* citrate synthase. *Biochemistry* **23**:2900-2905.
2. Day, D. A., and L. Copeland. 1991. Carbon metabolism and compartmentation in nitrogen-fixing legume nodules. *Plant Physiol. Biochem.* **29**:185-201.
3. Devereaux, J., P. Haeberli, and O. Smithies. 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* **12**:387-395.
4. Duncan, M. J., and D. G. Fraenkel. 1979. α -Ketoglutarate dehydrogenase mutant of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **137**:415-419.
5. Fellay, R., J. Frey, and H. Krisch. 1987. Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for in vitro insertional mutagenesis of gram-negative bacteria. *Gene* **52**:147-154.
6. Fukaya, M., H. Takenura, H. Okamura, Y. Kawamura, S. Horinouchi, and T. Beppu. 1990. Cloning of genes responsible for acetic acid resistance in *Acetobacter acetii*. *J. Bacteriol.* **172**:2096-2104.
7. Gardiol, A., A. Arias, C. Cerveñansky, and G. Martínez-Drets. 1982. Succinate dehydrogenase mutant of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **151**:1621-1623.
8. Halper, L. A., and P. A. Srere. 1977. Interaction between citrate synthase and mitochondrial malate dehydrogenase in the presence of polyethylene glycol. *Arch. Biochem. Biophys.* **184**:529-534.
9. Hamahan, D. 1993. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557.
10. Jin, S., and A. L. Sonenshein. 1994. Identification of two distinct *Bacillus subtilis* citrate synthase genes. *J. Bacteriol.* **176**:4669-4679.
11. Macdermott, T. R., and M. L. Kahn. 1992. Cloning and mutagenesis of the *Rhizobium meliloti* isocitrate dehydrogenase gene. *J. Bacteriol.* **174**:4790-4797.
12. Marle, C., M. A. Baruy, and J. A. Downie. 1992. *Rhizobium leguminosarum* has two glucosamine synthetases, GlnS and NodM, required for nodulation and development of nitrogen fixing nodules. *Mol. Microbiol.* **6**:843-851.
13. Martínez, E., M. A. Pardo, R. Palacios, and M. A. Cevallos. 1985. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *J. Gen. Microbiol.* **131**:1779-1786.
14. Martínez-Romero, E., and M. Rosenblueth. 1990. Increased bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodulation competitiveness of genetically modified *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:2384-2388.
15. Martínez-Romero, E., L. Segovia, F. M. Mercante, A. A. Franco, P. Graham, and M. A. Pardo. 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**:417-426.
16. Noel, K. D., A. Sanchez, L. Fernandez, J. Leemans, and M. A. Cevallos. 1984. *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. *J. Bacteriol.* **158**:148-155.
17. Noll, M., and F. Bastarrachea. Unpublished data.
18. Ohne, M. 1974. Regulation of aconitase synthesis in *Bacillus subtilis*: induction, feedback repression, and catabolite repression. *J. Bacteriol.* **117**:1295-1305.
19. Pardo, M. A., J. Lagunez, J. Miranda, and E. Martínez. 1994. Nodulating ability of *Rhizobium tropici* is conditioned by a plasmid-encoded citrate synthase. *Mol. Microbiol.* **11**:315-321.
20. Park, S.-J., J. McCabe, J. Turna, and R. P. Gunsalus. 1994. Regulation of the citrate synthase (*gluA*) gene of *Escherichia coli* in response to anaerobiosis and carbon supply: role of the *arcA* gene product. *J. Bacteriol.* **176**:5086-5092.
21. Patton, A. J., D. W. Hough, P. Towner, and M. J. Danson. 1993. Does *Escherichia coli* possess a second citrate synthase gene? *Eur. J. Biochem.* **214**:75-81.
22. Quinto, C., H. de la Vega, M. Flores, L. Fernández, T. Ballado, G. Soberón, and R. Palacios. 1982. Reiteration of nitrogen fixation gene sequence in *Rhizobium phaseoli*. *Nature (London)* **299**:724-726.
23. Reibach, P. H., P. L. Mask, and J. G. Streeter. 1981. A rapid one-step method for the isolation of bacteroids from root nodules of soybean plants, utilizing self-generation Percoll gradients. *Can. J. Microbiol.* **27**:491-495.
24. Renaller, M.-H., J. Batut, J. Ghai, B. Terzaghi, M. Gherardi, M. David, A.-M. Garnerone, J. Yusse, G. Truchet, T. Huguet, and P. Boistard. 1987. A new symbiotic cluster on the pSym megaplasmid of *Rhizobium meliloti* 2011 carries a functional *fix* gene repeat and a *nod* locus. *J. Bacteriol.* **169**:2231-2238.
25. Rigby, P. W. J., M. Dieckmann, C. Rhodes, and P. Berg. 1977. Labelling

- deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* **113**:237-251.
26. Romanov, V. I., I. Hernández-Lucas, and E. Martínez-Romero. 1994. Carbon metabolism enzymes of *Rhizobium tropici* cultures and bacteroids. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:2339-2342.
 27. Rosenkrantz, M., T. Alam, K.-S. Kim, B. J. Clark, P. A. Sreere, and L. P. Gnarente. 1986. Mitochondrial and nonmitochondrial citrate synthases in *Saccharomyces cerevisiae* are encoded by distinct homologous genes. *Mol. Cell. Biol.* **6**:4509-4515.
 28. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
 29. Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463-5467.
 30. Schwedock, J., and S. R. Long. 1990. ATP sulphurylase activity of the *nodP* and *nodQ* gene products of *Rhizobium meliloti*. *Nature (London)* **348**:644-647.
 31. Selbitschka, W., S. Niemann, and A. Pühler. 1993. Construction of gene replacement vectors for gram⁻ bacteria using a genetically modified *SacRB* gene as a positive selection marker. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**:615-618.
 32. Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**:503-517.
 33. Stanley, J., D. N. Dowling, M. Stucker, and W. J. Broughton. 1987. Screening cosmid libraries for chromosomal genes: an alternative interspecific hybridization method. *FEMS Microbiol. Lett.* **48**:25-30.
 34. Streeter, J. G. 1991. Transport and metabolism of carbon and nitrogen in legume nodules. *Adv. Bot. Res.* **18**:129-187.
 35. Weltzman, P. D. J., and M. J. Danson. 1976. Citrate synthase. *Curr. Top. Cell. Regul.* **10**:161-204.
 36. Wiegand, G., S. Remington, J. Deisenhofer, and R. Huber. 1984. Crystal structure analysis and molecular model of a complex of citrate synthase with oxaloacetate and S-acetyl-coenzyme A. *J. Mol. Biol.* **174**:205-219.

Resultados adicionales.

IS3 *R.tropici*

En la región 5' del gene de citrato sintasa del plásmido simbiótico identificamos una secuencia de inserción del tipo IS3 (Fig 1), 87 pb antes del posible inicio de traducción del *pcsA*. La IS tiene una alta identidad a nivel de DNA con IS de *A. tumefaciens* (81%) (93), *Pseudomonas aeruginosa* (66%) (94), *E. coli* (60%) (95), *Shigella* (61%) (96), y *M.tuberculosis* (58%) (97). Este elemento de inserción está organizado en tres posibles ORFS (Fig 2) similares a los de *A. tumefaciens*: ORF 1, hebra codificadora, 132 aminoácidos; ORF 2, hebra complementaria, 82 aminoácidos, hipotético represor *insA*. ORF3 hebra complementaria, 301 aminoácidos, posible transposasa. Estos ORFS poseen una similitud de 70, 80 y 91% a nivel de aminoácidos con los correspondientes ORFS de la secuencia de inserción de *A. tumefaciens*. En *Agrobacterium* la posible función del ORF1 se desconoce, el segundo ORF es similar a *insA* de *E.coli* (46%). La hipotética transposasa posee homología con transposasas de *Shigella sonnei* (76%) y *E.coli* (74%) y posee los dominios conservados para otras transposasas activas. La secuencia de inserción de *R. tropici* posee 26 bp que son invertidas repetidas como *A. tumefaciens* con sólo dos cambios de base. También localizamos directas repetidas de 3 bases bordeando las invertidas repetidas, características de otros eventos de transposición. En la figura 1 se muestra la organización de la IS3 de *R. tropici*. En la figura 2 se muestran los posibles ORFS y los aminoácidos conservados en diferentes transposasas (Cuadros en negro y estrellas).

La secuencia de inserción solamente se encuentra en una sola copia en *R. tropici* CFN299 y CIAT 899. No se localizaron secuencias homólogas por hibridización tipo Southern con *R. etli* o *Agrobacterium spp* KAg3 y ChAg 4 (fig 3). Las dos últimas son las bacterias más cercanas filogenéticamente a *R. tropici* (98) por secuencia total del 16s ribosomal. El contenido de GC de esta IS es de 58.3 %, similar al del gene aledaño, *pcsA* (57.4%) y a

otros ORFS cercanos a la IS (56.4%). Otros genes del pSym como *nodP* y *nodQ* (99) poseen contenidos similares de GC (57% y 56% respectivamente).

Es interesante que arriba de la secuencia del *pcsA* se ubique una secuencia de inserción, la cual tal vez pudo haberse obtenido por transferencia lateral. Estos elementos de inserción pueden transportar genes, inactivarlos o activarlos al crear promotores que promueven la transcripción. Una mutante independiente (aislada por M.A.Pardo) con una inserción de Tn5 en la IS (ORF2, fig 1) tiene un fenotipo simbiótico semejante al de la mutante CFNE 130 cuyo gene de citrato sintasa plasmídico esta interrumpido. Queda por demostrar si en esta mutante la actividad de citrato sintasa está afectada. Además se requieren experimentos tales como mapeo del inicio de transcripción de *pcsA* para determinar si realmente parte de esta IS está involucrada en la regulación del gene plasmídico. También se requieren fusiones con diferentes partes de la region upstream del *pcsA*. Estas regiones deberán abarcar parte de la IS

Posibles genes de la vía del glioxilato y alfa cetoglutarato - glutamato en el pSym de *R.tropici*.

Hacia arriba de la IS identifiqué otro posible ORF (1200pb) que es similar al gene isocitrato liasa (*aceA*) de *E. coli* (100), *Saccharomyces cerevisiae* (101), de *Emericella nidulans*, (102) de *Brassica napus* (103) y a otros 17 genes que codifican para la misma enzima. La similitud es de 40% si se compara con la enzima de *E.coli*. Esta similitud se conserva con otros genes que codifican para isocitrato liasa de diferentes organismos. Su parecido con tantos genes *aceA* nos hace proponer que podría tratarse de una isocitrato liasa. Me gustaría a corto plazo completar la secuencia de este gene junto con su zona regulatoria y evaluar si realmente se trata de una isocitrato liasa.

Los genes del ciclo del glioxilato, isocitrato liasa y malato sintasa, *aceA* y *aceB* respectivamente, se encuentran arreglados en operón en *E. coli* (104). Podría ser que en *Rhizobium tropici* se presentara el mismo arreglo. Datos preliminares de hibridaciones de DNA total de *R. tropici* con el posible gene *aceA* revelan 2 bandas de hibridación, una de las cuales se ubica en el pSym. Hibridaciones (condiciones de baja fuerza ionica) con *aceB* de *E. coli* revela una banda debil en el pSym de *R. tropici*.

Para complementar el enfoque de secuencia he analizado las actividades enzimáticas de los genes del ciclo del glioxilato de *R. tropici* tanto en simbiosis, como en vida libre, en diferentes fuentes de carbono, ya que los genes del ciclo del glioxilato en *E. coli* se regulan por la fuente de carbono. Las bacterias crecieron en medio mínimo con acetato o con succinato. Los resultados se muestran en la Tabla 1. La expresión de malato sintasa se observa en todas las fuentes de carbono probadas. Isocitrato liasa se expresa en MM acetato y no se observa actividad en MM succinato. De bacteroides aislados de nódulos formados por CFN299 se obtuvo actividad de malato sintasa pero no de isocitrato liasa. También encontramos actividad de estas enzimas en la cepa CFN 299-10 la cual tiene una deleción parcial del pSym y solo muestra hibridación con isocitrato liasa y no con malato sintasa. Posiblemente malato sintasa se encuentra duplicado pero los detectores utilizados no son lo suficientemente similares para revelar una banda de hibridación en la cepa CFN 299-10. En *E. coli* se tienen reportes de malato sintasa G y malato sintasa A. Ambas enzimas catalizan la condensación de glioxilato para producir malato, sin embargo la similitud entre ambas enzimas es de 30% a nivel de aa (105). Queda por esclarecer si existen dos copias de genes del ciclo del glioxilato en *R. tropici*.

En 312 pb secuenciados cercanos a la posible isocitrato liasa encontré homología con la succinato semialdehído deshidrogenasa de *E. coli* (106), y rata (107). En la fig 4 se muestra un alinamiento de aminoácidos de la succinato semialdehído deshidrogenasa de diferentes organismos. Supuestamente este gene se encontraría en el pSym, pero se necesita hacer una hibridación para corroborar lo anterior.

El gene de la succinato semialdehido deshidrogenasa actúa en el metabolismo de α ceto glutarato junto con el gene gaba glutamato transaminasa. En *B. japonicum* se postula que estos genes funcionan para producir succinato, el cual es importante en simbiosis. Estos genes en *E. coli* (108) se encuentran en un cluster y funcionan en la síntesis del ácido γ aminobutírico.

En la figura 5 se muestra la posible organización de los diferentes genes metabólicos en el pSym.

Discusión.

En el primer trabajo se muestran las rutas metabólicas que funcionan en *R. tropici* para la utilización de fuentes de carbono. En vida libre utiliza las vías de la Pentosa fosfato y Entner Doudoroff para el catabolismo de los azúcares. En medio mínimo con malato o glutamato se observa la expresión de varias enzimas gluconeogénicas como la fosfoenol piruvato carboxiquinasa, fructosa-6-fosfato-aldolasa y la fructosa bifosfatasa. También se observa la expresión de enzimas glicolíticas como la glucoquinasa, glucosa-6-fosfato-dehidrogenasa y fosfogluconato deshidrogenasas. Estas enzimas se expresan de manera similar en bacteroides. *R. tropici* posee actividad de invertasa en bacteroides, también posee dos sistemas de transporte de sacarosa, en vida libre (109). Estas evidencias posiblemente indicarían que esta bacteria está bien adaptada para la utilización de azúcares tanto en vida libre como en simbiosis. Si tomamos en cuenta que la sacarosa es el principal componente del floema de *Phaseolus vulgaris* (110), el cual proporciona esqueletos para las estructuras celulolíticas del hilo de infección y puede ser una de las principales fuentes de carbono para el crecimiento de la bacteria y para el bacteroide, podríamos estar hablando de una adaptación de *R. tropici* para la utilización eficiente de sacarosa en el proceso simbiótico. A partir de otros reportes se conoce que los azúcares pueden parcialmente mantener la fijación de nitrógeno y que las mutaciones que afectan a las

enzimas de la degradación de azúcares, (fosfoglucoasa isomerasa y fructoquinasa) así como la síntesis de estas son Fix^- (50). Todos estos datos indican que se debe de considerar a los azúcares como compuestos determinantes en la simbiosis. Los azúcares pueden estar jugando un papel en el proceso de infección y colonización del *Rhizobium* a la planta hospedera.

Seguramente los productos de degradación de azúcares son dirigidos hacia moléculas claves como el piruvato y posteriormente a la biosíntesis y generación de energía. Al bloquear la síntesis de moléculas importantes se pueden dar acumulaciones de sustratos y se puede reducir el contenido energético. Mutantes en enzimas de gluconeogénesis como enolasa, gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa y fosfoglicerato quinasa presentan gránulos de almidón en células infectadas, lo que demuestra que estos reservorios de energía no son bien utilizados. La utilización de los azúcares está condicionada por el hospedero, ya que el contenido de metabolitos secretados a la bacteria y al bacteroide, depende del tipo de planta. Por ejemplo, las mutantes en fosfoenolpiruvatocarboxiquinasa (*pckA*) en algunas plantas presentan fenotipo Fix^+ , mientras que en otras se observa decremento en la fijación de nitrógeno y en otra planta se da una simbiosis totalmente inefectiva (52). Se sabe que bacteroides de chícharo formados por mutantes en *pckA* de *R. leguminosarum* reciben intermediarios de azúcares por parte de la planta que proveen lo necesario para una simbiosis efectiva (51). En esta simbiosis la diferencia radica en la excreción por parte de la planta y el transporte óptimo de los azúcares que proveen lo necesario para fijar nitrógeno. Es claro que la bacteria tiene un metabolismo primario y múltiples rutas anapleróticas acopladas al hospedero u hospederos para realizar una simbiosis eficiente. Al parecer, tanto en *R. tropici* como en otras especies de *Rhizobium* los azúcares podrían ser importantes en simbiosis. Se intentó sin éxito (Comunicación personal de E. Martínez) obtener mutantes en las enzimas claves en la utilización de estos azúcares para probar su papel en simbiosis. Esto podría explicarse debido a que quizá existan rutas alternas para utilizar las azucares, también se conoce que mutaciones en

enzimas de la degradación de azúcares provocan acumulaciones de compuestos como dihidroxiacetona fosfato, el cual es tóxico.

Rhizobium tropici es una bacteria con un amplio rango de nodulación, capaz de nodular *Phaseolus vulgaris*, *Leucaena leucocephala*, *Albizia lebeck*, *Crotalaria spectabilis*, *Desmanthus illinoensis*, *Macroptilum atropurpureum* y *Vigna unguiculata*. No se conocen los genes que le confieren la capacidad de nodular todas estas diferentes plantas. Podemos suponer que el poseer múltiples copias de los genes regulatorios *nodD* (111) que se activan con diferentes flavonoides excretados por las diferentes plantas y la versatilidad en el tipo de factores de nodulación que produce tanto sulfatados como no sulfatados (112), aunado a una plasticidad metabólica para utilizar las distintas fuentes de carbono que proporcionan distintas plantas, son parte de los atributos necesarios para tener un amplio rango de nodulación.

En el artículo de citrato sintasa de *R. tropici* se muestra el papel en vida libre y en simbiosis de cada uno de los dos genes de citrato sintasa. Posiblemente el gene cromosomal se duplicó originando el gene plasmídico. Esto se ve apoyado por el alto grado de similitud entre ellos en la zona codificadora. En las zonas aledañas de ambos genes la similitud no es significativa. La diferencia principal entre los dos genes es la región regulatoria.

En la región regulatoria del gene cromosomal hemos encontrado sitios de unión a *crp*, (base 29, 46 *ccsA*) lo que indicaría represión catabólica, sin embargo por experimentos bioquímicos y de transporte, se conoce que *R. tropici* pierde represión catabólica por glucosa y es capaz de utilizar simultáneamente glucosa con glutamato. También utiliza sacarosa con malato. Queda por esclarecer si los sitios de unión a *crp* son funcionales y si tienen un papel en la represión catabólica por otras fuentes de carbono. La parte codificadora del *ccsA* muestra la mayor similitud a la citrato sintasa de *Bartonella*

henselae (85%) (113) y *Pseudomonas aeruginosa* (84%) (114). No encontramos similitudes significativas con otras enzimas metabólicas, sin embargo se conoce que citrato sintasa forma complejos metabólicos con diferentes enzimas como malato deshidrogenasa, aconitasa, fumarasa, y el complejo binario malato deshidrogenasa, piruvato deshidrogenasa. Estos complejos se han reportados en organismos eucariontes y se propone que funcionan para realizar más eficiente el trabajo metabólico, tomando en cuenta la formación de metabolones podría ser que en *R. tropici* también la citrato sintasa se encuentre constituyendo complejos enzimáticos. Se requieren experimentos de inmovilización de enzimas para determinar si el fenómeno de la formación de metabolones se da tanto en vida libre como en simbiosis. Se esperaría que los metabolones en simbiosis diferirían de los de vida libre.

Las mutaciones en ambos genes de citrato sintasa provocan que los nódulos formados por las cepas mutantes carezcan de la capacidad para fijar nitrógeno y que exista una disminución de 72% del número de nódulos. En los nódulos no se observan bacteroides. Las mutante sencilla en el *pcsA* (plasmídico) muestra una reducción de sólo 30% en el número de nódulos y estos son fijadores de nitrógeno, aunque la fijación de nitrógeno en esta mutante se ve algo afectada (20% de decremento). La mutante en el *ccsA* (cromosomal) forma un 38% del número de nódulos con disminución en la fijación de nitrógeno (medida como reducción de acetileno) de 68%.

Es claro que en ausencia de cualquiera de los dos genes, el fenotipo simbiótico se ve afectado. Esto indicaría que los productos de ambos genes son funcionalmente importantes en el proceso simbiótico.

El fenotipo Fix⁻ de la doble mutante puede deberse a que presenta una fase lag de 12 horas en medio rico. La tasa de crecimiento es determinante en el proceso simbiótico ya que la susceptibilidad de la planta por el *Rhizobium* es transitoria. Al no crecer la bacteria adecuadamente no puede invadir eficientemente a la planta, llevando esto sólo a la producción de nódulos vacíos.

En la mutante en el gene cromosomal de citrato sintasa, la copia del plásmido simbiótico suple la actividad de la citrato sintasa cromosomal en buena medida permitiendo la colonización de los meristemas por lo que se obtiene la diferenciación de bacteria a bacteroide.

Se puede suponer que la señal que activa la expresión del gene *pcsA* es simbiótica. Esta podría ser la causa de no encontrar actividad de este gene en vida libre o en una mutante de *E. coli*. Sin embargo, el *pcsA* no funciona tan eficientemente para promover una nodulación y una fijación de nitrógeno como la cepa silvestre. En conclusión, el gene cromosomal provee la mayor actividad de citrato sintasa no solo en vida libre sino también en el proceso simbiótico pero se requiere la actividad del *pcsA* para una proceso simbiótico eficiente. Existen otros ejemplos en *Rhizobium* de genes duplicados que comparten la misma función, tales como *glnS* y *nodM* (con actividad de glucosamino sintetasa ambos), que sintetizan los precursores para el esqueleto del factor de nodulación, donde *nodM* está dedicado a las funciones simbióticas. Mutantes en ambos genes son incapaces de nodular veza o chicharo (15).

Es bien conocido que en el citosol de la planta se detectan grandes cantidades de citrato (115) y que la planta provee succinato y malato al bacteroide ¿no podría ser que la planta supliera citrato o glutamato para complementar funcionalmente nuestras mutantes en los bacteroides y restablecer el ciclo de Krebs?. Se ha observado que los bacteroides de *R. leguminosarum* en el frijol, *Phaseolus vulgaris*, (variedad Contender), transportan eficientemente succinato y algunos azúcares, pero no transportan citrato, indicando la impermeabilidad de los bacteroides al citrato (116). Este hecho indica que nuestras mutantes dependen únicamente de las citrato sintasas propias para sintetizar citrato y mantener la continua operación del TCA. Siguiendo con esto, las mutantes en diferentes genes del TCA, tal como α ceto-glutarato dehidrogenasa en *R. meliloti*, son Fix⁻ (54).

Esto se podría explicar por el hecho de que la membrana peribacteroidal es impermeable a glutamato, que podría producir succinil CoA y posteriormente succinato por el ciclo del gaba restableciendo el ciclo de Krebs. El hecho es que componentes indispensables para el buen funcionamiento de la bacteria en simbiosis no son necesariamente provistos por la planta o transportados por el bacteroide y se requiere que éste los produzca. Mutaciones en succinato deshidrogenasa son Fix⁻ (55) ya que la planta provee succinato al bacteroide y esta mutante no puede utilizarlo por no tener la succinato dehidrogenasa funcional. La posible razón de un fenotipo Fix⁻ es que se requiere una gran cantidad de succinato para oxidarlo y proveer poder reductor, y para la producción de porfirinas para leghemoglobina. Mutantes en isocitrato deshidrogenasa también son Fix⁻(63).

Con mutantes en 4 enzimas del ciclo de Krebs y estudios de transporte en el bacteroide es posible decir que el TCA está acoplado en su totalidad al proceso simbiótico y que cada uno de los intermediarios determinan la eficiencia en la fijación de nitrógeno.

Cercano al gene plasmídico de citrato sintasa se encuentra una secuencia de inserción. Mutaciones en la base 52 del ORF2 de la IS presentan el mismo fenotipo simbiótico (M.A.Pardo comunicación personal) que una mutación en la parte codificadora del gene de citrato sintasa. Esta mutación es reestablecida con un fragmento de 6kb que incluye la IS y el *pcsA*. Posiblemente la IS, al insertarse, produjo un promotor nuevo para el *pcsA*. Se conocen otras IS, como la IS66, que al transponer generan promotores. Diferentes transposones como Tn5 al insertarse crean promotores constitutivos. En este caso parece que parte de la IS promueve la expresión del *pcsA* en simbiosis. Nosotros no hemos logrado detectar actividad de este gene en vida libre en limitación de hierro o de calcio ni tampoco pudimos complementar con el *pcsA* a una mutante *gltA* de *E.coli*. En *Azorhizobium caulinodans* (117) se encontró una secuencia similar a la IS de *R. tropici* arriba de un gene *nodD*. (Abajo de este gene se ubica una IS de otro tipo). La secuencia es 73% idéntica en 364pb a la IS de *R. tropici* (ORF 2) y posee una invertida repetida de

26 pares de bases de las cuales 20 son idénticas a la invertida repetida de *R. tropici*. En *Azorhizobium* se construyeron fusiones con 231pb de la IS con el gene *lacZ* y esta fusión provee un 72% de expresión del gene *nodA* (a través de *nodD*), suficiente para ser activo en simbiosis. La expresión al 100% se obtuvo construyendo otra fusión que abarca parte de la IS y 1.3KB correspondientes a otro ORF. En este caso, una IS similar a la encontrada en *R. tropici* parece participar en la expresión de un gene simbiótico. Mutantes en la región 5' de la IS de *Azorhizobium* no muestran defecto en nodulación. Dados estos resultados se podría esperar un efecto en nodulación, si se mutara esta IS en *A. caulinodans*, ya que, tal como se mencionó antes, promueve la expresión de *nodA* a través de *nodD*. Es interesante que las IS estén involucradas en la regulación de genes simbióticos. Se conocen otras IS como IS66 en la región *nodD* de *R. galegae* (118) y IS66 downstream de *nodPQ* en *R. meliloti* (119). Otro tipo de IS se ubica upstream de *nodK* en *A. caulinodans* (120). Si consideramos la naturaleza de las IS, es posible que estas secuencias fueran una vez móviles o continúen siéndolo y han servido tal vez en los rearrreglos genómicos, y en transferencia lateral de genes de nodulación, inclusive generando promotores involucrados en simbiosis.

La secuencia de inserción en *R. tropici* se encuentra en una sola copia en el plásmido simbiótico. Quizá esto se deba a una colonización reciente de la IS en el genoma de *R. tropici* o a posibles mutaciones puntuales que le impedirían transponer. Presenta dos bases diferentes en las invertidas repetidas al ser comparada con la de *A. tumefaciens* en donde sí existen múltiples copias de esta IS. Alternativamente, el represor pudiera expresarse constitutivamente. En el transposón Tn5, su represor inhibe el aumento en el número de copias en el genoma. Debemos de tomar en cuenta que nosotros obtuvimos sólo una copia en el genoma en un momento determinado por lo cual es posible que este elemento pueda transponer en tiempos evolutivos.

Posible papel de los genes del ciclo del glioxilato

El gene que codifica para la enzima malato sintasa se expresa en vida libre y en simbiosis. Esto puede deberse a que el intermediario que utiliza es ácido glioxílico el cual puede ser generado por glicina o por otras posibles rutas como la vía del ácido alantoico cuyo producto principal es glioxilato. Se tienen reportes de esta enzima en nódulos de soya, frijol, trébol y en *Rhizobium* crecidos en fuentes de carbono como succinato. También se conoce que la expresión de malato sintasa se ve incrementada en acetato.

El otro gene del ciclo del glioxilato, la isocitrato liasa, sólo se induce en presencia de acetato u oleato, pero se inhibe en succinato. No se tienen reportes de la actividad de esta enzima en simbiosis. El posible papel de estos genes en vida libre podría ser el de utilizar acetato como fuente de carbono en condiciones de stress de carbono en la rizósfera. Se conoce que el frijol, *Phaseolus vulgaris*, secreta acetato (121). Otras plantas como trigo excretan acetato en cantidades de 13mg por planta. En el suelo existen organismos que producen acetato. Se sabe que existe un alto recambio de este componente en el suelo. Sin embargo, *R. tropici* crece a una tasa muy lenta en acetato, 20% del crecimiento de la cepa crecida en succinato u otras azúcares que se sabe son abundantes en la rizósfera. El defecto en el crecimiento podría ser debido a que en este ciclo no se generan intermediarios como α -ceto-glutarato, el cual precede a aminoácidos y proteínas importantes en biosíntesis, y sólo se genera poder reductor de la reacción de la malato deshidrogenasa. En este sentido el ciclo puede operar sólo para la sobrevivencia de la bacteria. Pero, ¿cuál sería el posible papel de estos genes en simbiosis? Estos genes se expresan en plantas en el endospermo de la semilla degradando los carbohidratos para el mantenimiento del embrión, sustituyendo la maquinaria fotosintética que no está lista en estos momentos. También se expresan en la senescencia de organelos de la planta por lo tanto este ciclo puede permitir la gluconeogénesis a partir de lípidos derivados de la

degradación de diferentes componentes celulares como cloroplastos. Posiblemente este ciclo opere cuando las fuentes de carbono primordiales no son suministradas.

En plantas noduladas y expuestas a la obscuridad o en nódulos removidos y colocados en la obscuridad por tres días se observa un decremento en el contenido de PHB y a su vez se observa un importante incremento de la actividad de isocitrato liasa. Se ha propuesto que la degradación de PHB proporciona acetoacetato y posteriormente acetyl CoA que sería utilizado por los genes del ciclo del glioxilato para la sobrevivencia de la bacteria desprovista de carbono en la senescencia del nódulo.

R. tropici posee alta actividad de hidroxibutirato deshidrogenasa en bacteroides y casi no acumula PHB en vida libre (122). Esto pareciera estar indicando que en el bacteroide existe recambio de PHB que sería usado para producir acetato, el cual se utiliza para pared celular, membranas, ácidos nucleicos y proteínas, tal como se ha demostrado en experimentos con acetato radioactivo en bacteroides (123). El papel de estos genes podría ser el de utilizar el acetato proveyendo precursores para el mantenimiento estructural y metabólico de la bacteria.

Los resultados del análisis de la utilización de 98 fuentes de carbono por las cepas CFN 299 y CFN 29910 (una deleción parcial del pSym que no posee los genes metabólicos reportados en esta tesis), muestran que las dos cepas utilizan de manera diferente fuentes de carbono como tween, galactosa, lactosa, sorbitol, ácido hidroxibutírico, prolina, carnitina. Esto indicaría que existen en el plásmido simbiótico genes involucrados en el metabolismo bacteriano. Tal vez se pudieran encontrar nuevas rutas metabólicas codificadas en este plásmido.

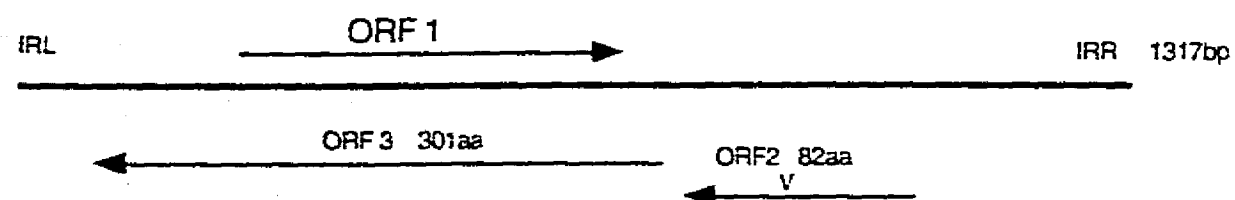
Conclusiones

El estudio genético y metabólico nos proporciona una visión más amplia acerca de las funciones vitales de los organismos. Consideramos que es importante realizar más estudios sobre como cambian las expresiones enzimáticas en los diferentes estadios de la simbiosis. Posiblemente, de acuerdo al estadio de la simbiosis y los requerimientos de la bacteria, se de la expresión transitoria de las diferentes vías metabólicas. Quizá en el inicio de la simbiosis, la glicolisis acoplada al ciclo de Krebs y cadena transportadora de electrones sean predominantes, mientras que en la fijación de nitrógeno funcione con un ciclo parcial del glioxilato acoplado con un TCA y otra cadena transportadora de electrones, adaptada a una concentración de oxígeno baja. En la senescencia del nódulo, el ciclo del glioxilato podría proveer esqueletos de carbono para la sobrevivencia de la bacteria. Se necesita ver el proceso simbiótico en los diferentes estadios para poderlo comparar con otras bacterias, ya que la simbiosis se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza. Por otra parte el haber explorado genes metabólicos nos provee de herramientas para abordar aspectos evolutivos y filogenéticos. En ese sentido en nuestro laboratorio hemos empezado a caracterizar citrato sintasa de otros *Rhizobium*. Decidimos usar como marcador el gene de citrato sintasa debido a que pertenece a un ciclo ampliamente distribuido en una gran cantidad de organismos tanto procariontes como eucariontes, Este gene tiene un amplio compromiso funcional tanto en funciones metabólicas así como parte de unión de otras enzimas en la formación de metabolones.

Considero que tambien es necesario relacionar nuestro modelo de estudio, *Rhizobium tropici* con patógenos como *Agrobacterium rhizogenes* y *Brucella abortus*, ya que filogenéticamente son muy cercanos por secuencia de 16SrRNA ribosomales. Sería interesante saber si comparten tambien las estrategias metabólicas descritas en *Rhizobium*.

Fig 1

IS RT



IS Rt

IS Rt

ORF 3

1 gaaaccgcccgggtttcccgaggcggttgggttaagttatgcccacatggctggctcgtccagcatggcataagtaacggttcttcggcttcggcaggc 100
acttggcgcggcccaaacggcctccgcaaaccaattcatacgcccgtaccgaccgagcaggtcgtaccgtaacattgcaagaagccgaagccgctccg

101 ggaaatgtttccatgggctccagaagacgcccgttgggtgaaccaatccaccattcgagtggtggcgaactccacggcttcgaaattgcccattggtcccc 200
ccttacaaggtatcccggaggtctctcggcccaacaacttgggttaggtgggtaagctcacaccgcttgagggtgccaagctttaacgcygtaccagggg

ORF 1

201 gcccatgatgaactcggccttgtagagggcgttgatcgttccggcagagcgttgctcgttaactgctcggcagccttccaacggaaggtcgtatgctctgc 300
cggctacctactggagccggaacatctccggcaactagcaaacgctctcgcacaacagcattgacagcggctgcaaggttgcccttcgagctacggacg

301 ctccggcagcgttcggaataacttaactgatacgtattgaacacccctgctggagtggtggatgagccaccgcatggactggccgcccgtcatggagt 400
gagggggtcggcaagccttatgaattagctatgcataacttggtgggacagcctcacaccctactcgggtggcgtacctgaccggcggccagctacctca

401 gectggtccagggcatcgaggacgaaaccgcatgagcgggtccggctcggccgacagcagatcgggggggcaacgctcgatcacgaaagcgacgt 500
cggaccaggtcccgtagctctctgctttggggcgtactcgcacaagccgagcggggcggctcggctgctacgcccgccttgcgcagctagtgtttcgtgca

501 aaacgaagccttgccaagtggctacatcgtgaaatcggaaagccacaacatgctcggcggggagcgcaactggcgggttcacgcccgtcgagcggaca 600
tttgcttcggaacgggttcaccgatgtatgcaacttagccttccggtgtgtacaagccgcgctcggctttagccgccaagtgcgccaagctcgcctgt

ORF 1

601 agcagcggccttgtagacacggctggtttgacgggctttccacggataatgccctgaagaccatcattctcataagccgagaaacagtgcatcgagct 700
atctcggcggaaacagctcgtgcccagcaaaactgcccgaaggtgctattacgggactctcgggtagtaagagatttcggctctttgtcacgtagctcga

701 atgtcgaagccttcccgtgcaactgcccactacttccgcacgcccgtagacttggaaattctcattgaacactcggcgtatctcgacctcatggccg 800
tacagcttcggaagggcgagcttgacggcggtatgaaagggcgtgcccactctgaaccttaagagtaacttgtagcgcagcatagagctggaagtaccggc

801 cgtcgcgacgagcggggccgacagggcgtccacgtccgctgcttggcgtatggcgtcatagtaagtggaacggggcaatcggcagcagcctgcagatcgg 900
gcagcgtgctcggcccggctgtccgcaaggtgacggcaacgcaaccgctaccgagatcattcacctgcccgttagccgtcgtcggacgtctagcc

ORF 3 ORF 2

901 ctcgaccccgaaacttgagcggcttctcgtgatgaggaaatcatcgttccagtgggcggctcgagctccgctgggcaaaaataagccgacgcttacgcaa 1000
gagctggggcttgaactcgcacaaagcagctacttcccttaatgcaagcaccggccagctcgaagcgaacccgtttattcggctcgggaaatgcgtt

1001 aatctcattggcctgtagaagctcgcgggtctcccgtcaagggccttcacttctcggcagacatcgttggaaagcctgctcgtttgcccgtgtcaaca 1100
ttagagtaaccgacagcttcgagcgcgaagggcgaggtcccccgaagtagaagagccgctgtagcgaaccttccggacgagcaaacggcgcagttgt

v

ORF 2

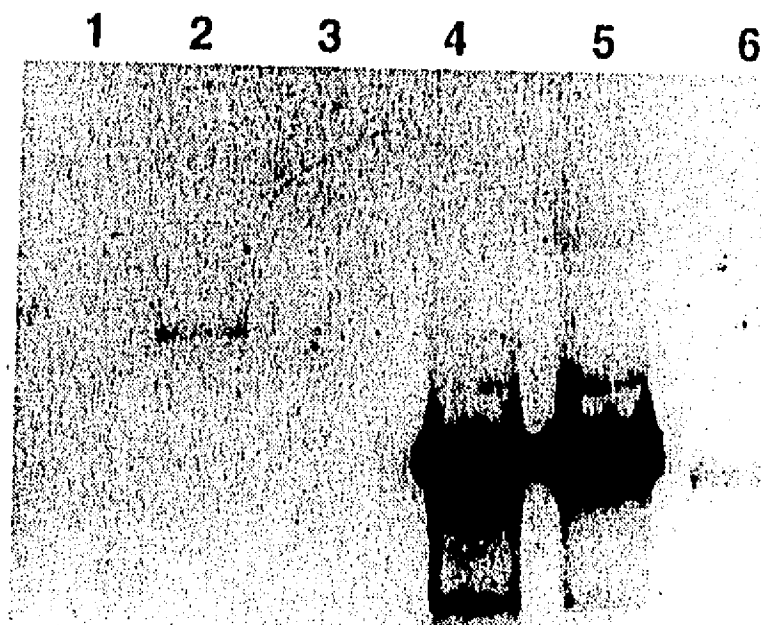
1101 tcggcttcttcacccactcatgcagcgtatgtgcccagcagcgaacttggcgtatggatgaaactgcccaccgagatggatgctcggcctcatgg 1200
agccgaaagaagtgggtgagtagcgtcgcatacacggctcgtcgggttagaacccgatacctaactttgacggcgggtggcctacctacgagccggagctacc

1201 tccaaaaccatgcccgtggctcggctcacgaacttcaggtgaaatttgggtgcttctgctcatatcggctccactttctcagagttggagcctccgcg 1300
aggttttggtagcctaccgagccagtgcttgaagtccaactttaaacaaccagcagaacgagtagcaggggtgaaagagtgctcaacctggagggcgc

1301 aaaccgcccggcttca 1317
cttggcccggccaagt 87 bp pcsA

Secuencia de inserción de R. tropici.
Organización 3 ORFs.
Invertidas repetidas, así como codones de inicio y terminación en cajas.
Mutación con Tn5 v

Fig. 3.



Autoradiografía de experimento tipo Southern con DNA total digerido con EcoR1, e hibridado con un fragmento interno de la IS3 (1225 pb) como detector

1, 2. *A. rhizogenes* (Kag3, CHag4)
3, 4, 5 *R. tropici* (299-10, 299, 899)
6 *R. etli* (CE3)

TABLA 1

Actividad específica en *R.tropici* CFN299 crecida en medio mínimo con diferentes fuentes de carbono (18 hrs) o aislada de nódulos.

	Malato sintasa	Isocitrato liasa
Fuente de carbono		
ACETATO	1.49	0.68
SUCCINATO	0.99	ND
BACTEROIDES	0.58	ND

Actividad específica en *R.tropici* CFN299 -10 (deletada del pSym) en medio mínimo con diferentes fuentes de carbono (18hrs).

	Malato sintasa	Isocitrato liasa.
Fuente de carbono		
ACETATO	1.2	0.83
SUCCINATO	0.98	ND

- a) Actividades nmol/min/mg/prot.
- b) Fuentes de carbono 10mM
- c) ND= No detectada

Fig 4.

Alineamiento de las succinato semialdehido deshidrogenasas de *E.coli*, rata y *R.tropici*.

```

ssdecolif  VIAQANDTEF  GLAAVEYARD  LSRVFRVVEA  LEYGVVGINF  GLISNEVAPF
ssdrf      AVAIAANAADV  GLAGYFYSD  PAQIWRVAED  LEVGMVGVNE  GLISSVECPF
ssdrtf     VVRYANDTIY  GLFAVYASN  LRRVWRVVEA  LEYGM..INF  GRMSSEAAPF

          51                                81
ssdecolif  GGIKASGLGR  EGSKYSDIEDY  LEIKYMCIGL  .
ssdrf      GGVKOSGLGR  EGSKYSDIEDY  LELKYVCYGG  L
ssdrtf     GGIKOSGL..  ...RHSLEDY  LEM.....  .
  
```

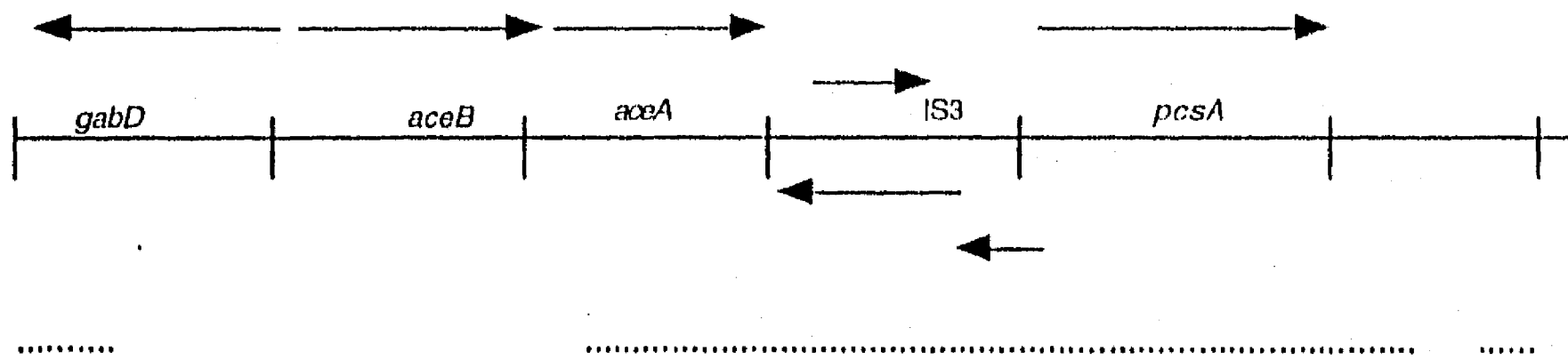
Matriz de similitud de succinato semialdehido deshidrogenasas de *E.coli*, rata, y *R.tropici*

	ssd <i>E.coli</i>	ssd rata	ssd <i>R.tropici</i> .
ssd <i>E.coli</i>		75%	83%
ssd rata			68%

Figura 5

Organización de posibles genes metabólicos plasmídicos de
R.tropici

pSym



Las flechas indican marcos de lectura abierta.

Los puntos indican la secuencia obtenida hasta el momento.

Apéndice 1

Phylogenetic Relationships and Host Range of *Rhizobium* spp. That Nodulate *Phaseolus vulgaris* L.†

I. HERNANDEZ-LUCAS,¹ L. SEGOVIA,¹ E. MARTINEZ-ROMERO,¹ AND STEVEN G. PUEPPKE^{2*}

Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrogeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México,¹ and Department of Plant Pathology, University of Missouri, Columbia, Missouri 65211²

Received 30 January 1995/Accepted 21 April 1995

We determined the nucleotide sequences of 16S rRNA gene segments from five *Rhizobium* strains that have been isolated from tropical legume species. All share the capacity to nodulate *Phaseolus vulgaris* L., the common bean. Phylogenetic analysis confirmed that these strains are of two different chromosomal lineages. We defined the host ranges of two strains of *Rhizobium etli* and three strains of *R. tropici*, comparing them with those of the two most divergently related new strains. Twenty-two of the 43 tested legume species were nodulated by three or more of these strains. All seven strains have broad host ranges that include woody species such as *Albizia lebeck*, *Gliricidia maculata*, and *Leucaena leucocephala*.

Members of the genus *Rhizobium* form nitrogen-fixing nodules on the roots of leguminous plants and thus are of great ecological and agronomic significance. These bacteria originally were assigned to species on the basis of their host specificity (8), a practice that has been seriously criticized (22, 41, 45). New approaches that consider genetic characteristics as well as symbiotic phenotypes now are available, and they have become useful in defining relationships among rhizobia (11). Analysis of rRNA genes is at present the most useful means to achieve this goal (42), and the phylogeny of the known members of the *Rhizobiaceae* is under revision on the basis of 16S rRNA gene sequences (6, 28, 40, 43, 44).

This approach has also been useful for defining new *Rhizobium* species, including two of particular interest to us: *Rhizobium etli* (29) and *R. tropici* (23). Both of these organisms establish effective symbioses with bean, *Phaseolus vulgaris* L. *R. etli*, which has multiple copies of *nif* genes (21, 26), most likely is the symbiotic species that coevolved with bean. *R. tropici*, which has single copies of *nif* genes, nodulates *Leucaena* spp. in addition to bean (20), and it is tolerant of stress conditions such as high temperature and acidity (10, 13).

R. leguminosarum bv. *phaseoli* and other *Rhizobium* spp. of uncertain taxonomic affinities also are capable of nodulating and fixing nitrogen in association with *P. vulgaris* (6, 21, 25). Nodulation of *P. vulgaris* by a wide range of strains from tropical legumes originally was reported some years ago (18, 41). More recently, bean-nodulating strains have been isolated from *Leucaena* spp., as well as from *Dalea leporina*, *Clitoria tematea*, and other tropical legumes (2, 12, 21, 33). Strains of *R. fredii* (13, 27) and *R. meliloti* (3) also share this capacity. Collectively, these observations are focusing attention on bean and the variety of different organisms that enter into symbiosis with it.

The purpose of the work described here was twofold. First, we wished to define the genetic relationships of a group of strains that are capable of nodulating bean but were originally isolated from other tropical legumes. Second, we wanted to

systematically investigate the host ranges of a diverse group of strains with the common capacity to nodulate bean. We selected two divergent strains: BR816 (38), originally from Brazil; and CFN234, originally from Mexico. These were compared with *R. tropici* CFN299 (type A), CIAT899 (type B, the type strain for the species), and UMR1173 and *R. etli* CFN42 (the type strain for the species) and F16.

Analysis of 16S rRNA sequences. The partial nucleotide sequences of the 16S rRNA genes from *Rhizobium* sp. strains BR816 and CFN234 (from *Leucaena leucocephala*), CFN244 (from *Macroptilium gibbosifolium*), CFN265 (from *L. escul-*

Strains:	1	50
BR816	AGCGGCAGAC GGGTGAGTAA CCGGTGGGAA TGTACCCITT TGTACGGGAT	
CFN244	...CAGAC GGGTGAGTAA CCGGTGGGAA CGTACCCITT ACTACGGGAT	
CFN234	...GGCAGAC GGGTGAGTAA CCGGTGGGAA CGTACCCITT ACTACGGGAT	
CFN265	AGCGGCAGAC GGGTGAGTAA CCGGTGGGAA CGTACCCITT ACTACGGGAT	
CI180	AGCGGCAGAC GGGTGAGTAA CCGGTGGGAA CGTACCCITT ACTACGGGAT	
Consensus	----CAGAC GGGTGAGTAA CCGGTGGGAA --TACCCITT -CTACGGGAT	
	51	100
BR816	AACGCAGGGA AACTTGTGCT AATACCGTAT GAGCCCTTCG GGGGAAAGAT	
CFN244	AACGCAGGGA AACTTGTGCT AATACCGTAT GTGCCCTTCG GGGGAAAGAT	
CFN234	AACGCATGGA AACTTGTGCT AATACCGTAT GTGCCCTTCG GGGGAAAGAT	
CFN265	AACGCAGGGA AACTTGTGCT AATACCGTAT GTGCCCTTCG GGGGAAAGAT	
CI180	AACGCATGGA AACTTGTGCT AATACCGTAT GTGCCCTTCG GGGGAAAGAT	
Consensus	AACGCA-GGA AAC-TGTGCT AATACCGTAT G-GCCCTT-G GGGGAAAGAT	
	101	150
BR816	TTATCGGAA AGGATCGCC CCGGTGGAT TAGCTAGTTG GTGGGGTAAA	
CFN244	TTATCGGTA AGGATCGCC CCGGTGGAT TAGCTAGTTG GTGGGGTAAA	
CFN234	TTATCGGTA AGGATCGCC CCGGTGGAT TAGCTAGTTG GTGGGGTAAA	
CFN265	TTATCGGTA AGGATCGCC CCGGTGGAT TAGCTAGTTG GTGGGGTAAA	
CI180	TTATCGGTA AGGATCGCC CCGGTGGAT TAGCTAGTTG GTGGGGTAAA	
Consensus	TTATCGG-AA -GG-T-GCC CCGGTGGAT TAGCTAGTTG GTGGGGTAAA	
	151	200
BR816	GGCCTACCAA GCGCAGGATC CATAGCTGGT CTGAGAGGAT GATCAGCCAC	
CFN244	GGCCTACCAA GCGCAGGATC CATAGCTGGT CTGAGAGGAT GATCAGCCAC	
CFN234	GGCCTACCAA GCGCAGGATC CATAGCTGGT CTGA.....	
CFN265	GGCCTACCAA GCGCAGGATC CATAGCTGGT CTGAGAGGAT GATCAGCCAC	
CI180	GGCCTACCAA GCGCAGGATC CATAGCTGGT CTGAGAGGAT GATCAGCCAC	
Consensus	GGCCTACCAA GCGCAGGATC C--AGCTGGT CTGA-----	
	201	219
BR816	ATPGGGACTG AGACAC...	
CFN244	ATPGGGACTG AGACAC...	
CFN234	
CFN265	ATP.....	
CI180	ATPGGGACTG AGACAC...	
Consensus	-----	

FIG. 1. Aligned sequences of portions of the rRNA genes of five *Rhizobium* strains capable of nodulating bean.

* Corresponding author. Mailing address: Department of Plant Pathology, University of Missouri, Columbia, MO 65211. Phone: (314) 882-2643. Fax: (314) 882-0588. Electronic mail address: plantsgp@mizzou1.missouri.edu.

† Journal Series 12,260 of the Missouri Agricultural Experiment Station.

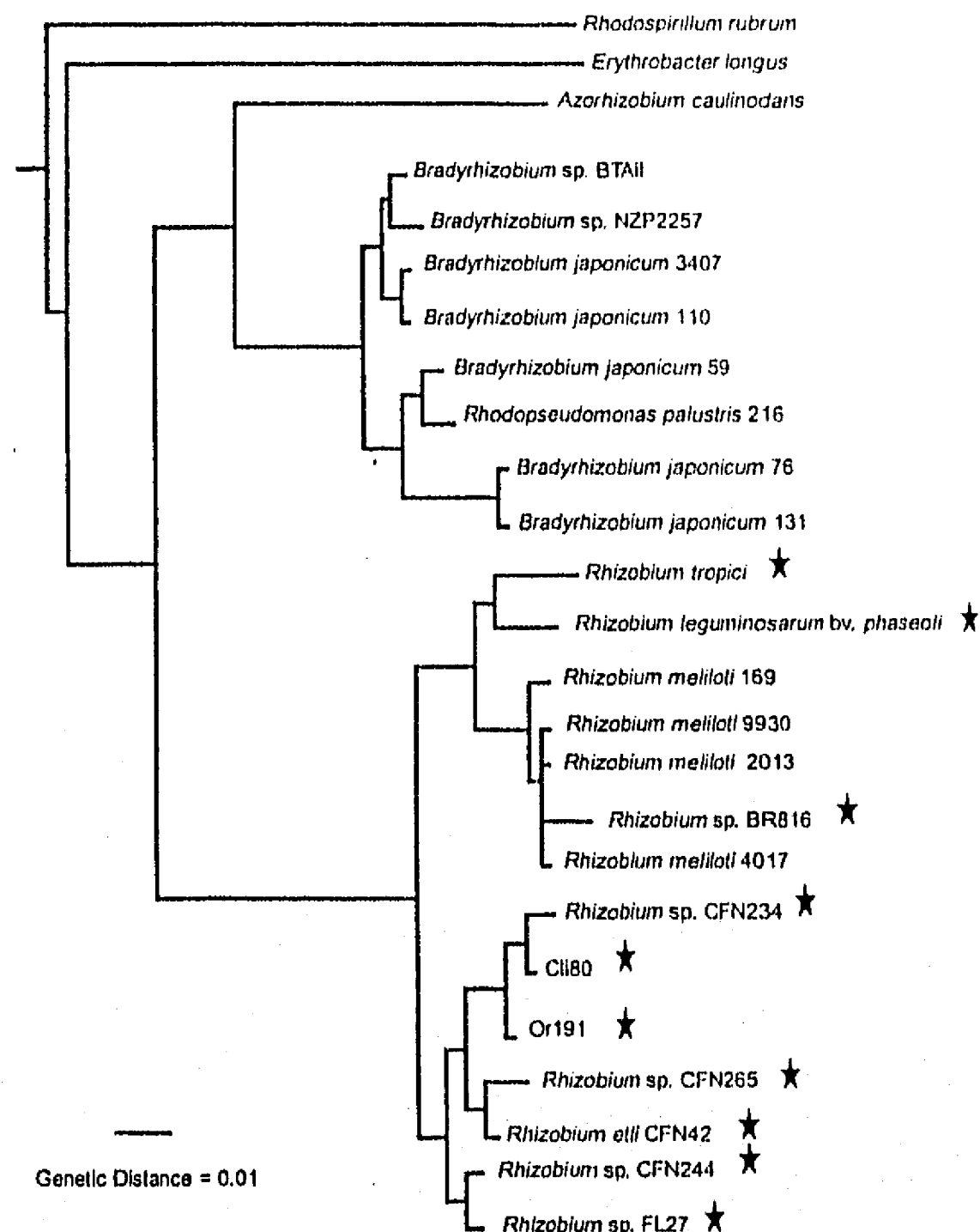


FIG. 2. Phylogenetic tree obtained by neighbor joining groups derived from a Jukes-Cantor distance matrix of the aligned sequences of 16S rRNA fragments from *Rhizobium* spp. and related bacteria. Strains capable of nodulating *P. vulgaris* are indicated by stars.

lenta), and Cll80 (from *C. ternatea*) were determined by directly sequencing PCR products. A DNA region corresponding to nucleotides 20 to 338 of the *Escherichia coli* 16S rRNA was amplified from each strain with primers Y1 (5'-TGGCTCAG AACGAACGCTGGCGGC-3') and Y2 (5'-CCCAGTCTG CCTCCCGTAGGAGT-3') as described previously (44). DNA sequencing was performed with a T7 DNA Sequencing Kit from Pharmacia LKB, and sequences have been placed in GenBank under accession numbers L20762 for CFN265, L20763 for CFN244, L20764 for Cll80, L20765 for BR816, and L20766 for CFN234 (Fig. 1). We created a multiple alignment with the PILEUP program of the University of Wisconsin Genetics Computer Group Package (5). The neighbor joining algorithm from the Neighbor Program of Felsenstein's Phylip 3.5 (15) was used to delineate the phylogenetic relationships (24). We rerooted the tree with the program RETREE (15) and included sequences from two other bean-nodulating strains, FL27 and OR191 (7).

The resulting phylogenetic tree (Fig. 2) shows that the five *Rhizobium* strains represent distinct chromosomal lineages that have evolved the capacity to form nitrogen-fixing nodules with bean. Four of the strains form a cluster with similar 16S rRNA gene sequences, and they all have a diagnostic pattern

of restriction sites that is characteristic of *R. etli* (6). All of these strains have affinity to *R. etli* FL27 and OR191 and to genomic species 1, which was isolated in France by Laguerre and associates (17). These bacteria also share a common isoelectric form of glutamine synthetase II (32), an enzyme proposed for use as a marker of species or groups of strains in the *Rhizobiaceae* (31); thus, they probably derive from a common ancestor. *Rhizobium* sp. strain BR816, which has a different geographical origin, is separated from this group and clustered with *R. meliloti* and allied rhizobia, including *R. fredii*, *Rhizobium* sp. strain NGR234, and the recently proposed *Sinorhizobium saheli* and *S. teranga* (4). The 16S rRNA sequence of BR816 contains four key restriction sites that are diagnostic for division A of *R. meliloti* and in fact identical to that of the *R. meliloti* type strain, ATCC 9930 (6).

Analysis of host range. Table 1 summarizes the results of nodulation experiments that were conducted in replicated tests under a controlled environment (16) and that to our knowledge represent the most extensive published database on the host range of bean symbionts. The host ranges of *Rhizobium* sp. strain CFN234, a member of the *R. etli* lineage, and BR816, an organism more closely related to *R. meliloti*, were selected for comparison with two strains of *R. etli* and three strains of *R.*

TABLE 1. Host range of rhizobia capable of nodulating bean^a

Legume	Characteristic(s) of nodules formed with:						
	<i>R. tropici</i>			<i>R. etli</i>		<i>Rhizobium</i> sp.	
	CIAT899	UMR1173	CFN299	F16	CFN42	CFN234	BR816
<i>Albizia lebbek</i> (L.) Benth.	N + F	N + F	N + F	F	N	N	F
<i>Cajanus cajan</i> (L.) Millsp.	N	N	N	N	N	N	N
<i>Canavalia ensiformis</i> (L.) DC	N	N	N	N	N	N	N
<i>Chianthus formosus</i> (G. Don) Ford & Vick.	F	N	F	F	F	F	F
<i>Crotalaria sericia</i> Retz.	N ^s + F	N ^s + F	N ^s + F	F	F	F	N
<i>Cyamopsis tetragonoloba</i> (L.) Taub.	0	0	0	F	N ^s	F	F
<i>Desmanthus illinoensis</i> (Michx.) MacM.	F	0	F	F	F	F	F
<i>Desmodium canadense</i> (L.) DC	F	0	F	N + F	N	N + F	N
<i>Flemingia congesta</i> Roxb.	0	0	0	N	N	N	N
<i>Gliricidia maculata</i> HBK	F	F	F	F	F	F	F
<i>Glycine max</i> (L.) Merr. 'Peking'	N	N	N	0	0	0	0
<i>Indigofera tinctoria</i> L.	N ^s	N ^s + F	N ^s + F	N	N	N	N
<i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) DeWit 'Cunningham'	F	F	F	F	N	F	F
<i>Louis corniculatus</i> L.	F	0	F	0	N	0	0
<i>Macroptilium atropurpureum</i> Urb.	N ^s + F	N ^s + F	N ^s + F	F	N ^s	N ^s + F	N ^s + F
<i>Phaseolus angularis</i> (Willd.) Wight	N ^s	N ^s	N ^s + F	F	N ^s + F	0	0
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	F	F	F	F	F	F	F
<i>Sesbania exaltata</i> (Raf.) Cory	F	0	F	F	F	F	F
<i>Tephrosia vogelii</i> Hook f.	N	N	N	N	N	N	N
<i>Vigna umbellata</i> (Thunb.) Ohwi & Ohashi	N ^s + F	N ^s + F	N ^s + F	F	F	N	N
<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.	N + F	N + F	N + F	N ^s + F	N ^s + F	F	F
<i>Vigna vexillata</i> (L.) A. Rich	N ^s + F	N ^s + F	F	F	N	F	F

^a F, nodules contained leghemoglobin; N, nodules lacked leghemoglobin; N^s, nodules lacked leghemoglobin and additionally contained visibly darkened and senescing cells; 0, no nodules. The following species did not form nodules with any of the strains: *Acarlia ataxacantha* DC, *Albizia sonan* (Jacq.) F. Muell., *Apis americana* Medik., *Arachis hypogaea* L., *Calopogonium caeruleum* Benth. (Hemsl.), *Desmodium uncinatum* (Jacq.) DC, *Erythrina crista-galli* L., *Galactia striata* (Jacq.) Urb., *Glycine soja* Sieb. & Zucc., *Kummerowia stipulacea* (Maxim.) Makino, *Lablab purpureus* (L.) Sweet 'Rongai', *Lotononis bainesii* Bak., *Lupinus albus* L., *Macrotyloma axillare* (E. Mey.) Verde., *Medicago sativa* L., *Mucuna pruriens* (L.) DC, *Pisum sativum* L., *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC, *Stylosanthes capitata* Vog., *Trifolium subterraneum* L., and *Vicia benghalensis* L.

tropici. All strains failed to nodulate 21 of the 43 diverse legume species used as test plants. Included in this group of legumes are *Medicago sativa*, *Trifolium subterraneum*, and *Pisum sativum*, hosts, respectively, of *R. meliloti*, *R. leguminosarum* bv. trifolii, and *R. leguminosarum* bv. viciae. This category also encompasses *Calopogonium caeruleum*, *Desmodium uncinatum*, *Lablab purpureus*, and *Psophocarpus tetragonolobus*, all of which are hosts of the well-known, broad-host-range strain *Rhizobium* sp. strain NGR234 (19, 34).

Only five legume species responded uniformly to all seven strains. *Canavalia ensiformis*, *Cajanus cajan*, and *Tephrosia vogelii* produced nodules that inevitably failed to fix nitrogen, and *P. vulgaris* and *Gliricidia maculata* always produced fully Fix⁺ nodules. The uniformly compatible response of *P. vulgaris* is in full agreement with previous observations (23, 29). *G. maculata* is a tropical American shrub and a member of the tribe Galegae (1). Although this species is not closely related to bean, rhizobia from *Gliricidia* spp. can fix nitrogen in association with *P. vulgaris* (13), and thus there appears to be a reciprocal sharing of nodule organisms between these two species.

The remaining 17 legumes responded differentially to the seven test strains. Interactions were often uniformly Fix⁻, as in combinations of *Sesbania exaltata* with *R. tropici* CIAT899 and *Vigna umbellata* with *Rhizobium* sp. strain F16 (Fig. 3A). Other responses were more complex. Individual plant responses sometimes were distinctly heterogeneous, consisting of large, deeply pigmented Fix⁻ nodules intermingled with smaller nodules that lacked leghemoglobin and often were visibly abnormal (Fig. 3B). Combinations yielding such aberrant nodules are designated Nod^s in Table 1. In one pairing, that of *Crotalaria sericia* and *R. tropici*, nodules possessed dark, spherical,

senescing interiors surrounded by a translucent cortical layer. Abnormal nodules in other combinations were characterized by rust-colored necrotic cells that appeared to ensheath the infection thread. Thus, although Fix⁺ nodules appeared in many combinations, the interactions were in fact incompatible to varying extents, as indicated in Table 1.

Our nodulation data allow a number of important general conclusions to be drawn. It is apparent, for example, that none of the strains is symbiotically restricted to the two legumes that have been examined in the past, *P. vulgaris* and *L. leucocephala*. Nodulating abilities, although sometimes strain specific, extend well beyond these two legumes to encompass a diversity of other species. Thus, *R. etli* is not a narrow-host-range symbiont, as has been assumed previously (23, 29), and the unclassified organisms, too, seem to be broadly adapted to symbiosis.

Our experiments with *R. tropici* greatly expand previous preliminary observations that species other than *P. vulgaris* and *L. leucocephala* are nodulated (23), and they indicate that this organism, too, has a broad host range. There is distinct strain heterogeneity: host reactions to CIAT899 and CFN299 are virtually identical and distinctly broader than that of the third strain, UMR1173, a unique strain that cannot be classified as either type A or type B (23). Four legume species formed Fix⁻ nodules with the first two strains but were unreactive with UMR1173. It is also evident that almost all of the aberrant Nod^s responses involved *R. tropici*.

The symbiotic phenotypes of the two *R. etli* strains and the two *Rhizobium* strains from *L. leucocephala* are not readily distinguishable from one another, and in fact, they are not greatly different from those of *R. tropici*. Although there are strain-specific differences on a number of hosts (Table 1), *P.*

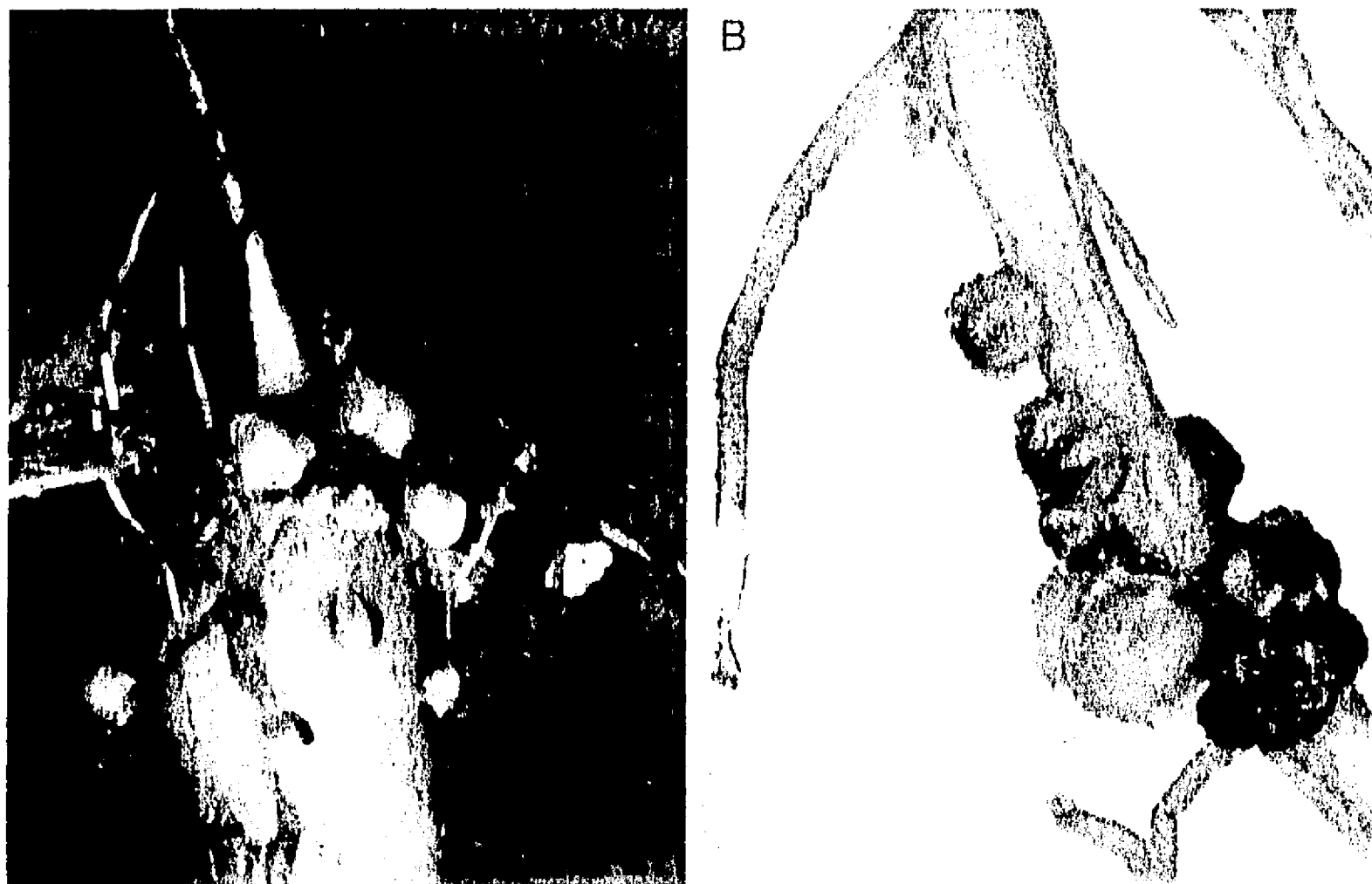


FIG. 3. Nitrogen-fixing nodules produced by (A) *Rhizobium* sp. strain F16 on the swollen tap root of *Vigna umbellata* and (B) *R. tropici* CIAT899 on the root crown of *Macroptilium atropurpureum*.

angularis is the only legume yielding a Fix⁺ response with *R. etli* versus no response to the leucaena strains. *V. umbellata* also can discriminate *R. etli* from the leucaena strains, but the distinction is that of Fix⁺ versus Nod⁺.

The response of *L. leucocephala* to the tested strains warrants special note in light of previous conclusions that strains of *R. tropici*, but not those of *R. etli*, can nodulate this species (9, 23, 29, 36, 39). Although we found that the type strain of *R. etli* forms only small nodules on *L. leucocephala*, strain F16 elicited a fully wild-type response that was not obviously different from that to *R. tropici* (Table 1). Thus, *R. etli* and *R. tropici* both should be viewed as symbionts of this legume tree, an observation that has significant implications for interpretation of data on responses of nodulation genes to signals from roots of *L. leucocephala* (36, 37, 39). As nodulators of *L. leucocephala*, these organisms also share a common host with rhizobia originally isolated from a diverse group of legumes: *Astragalus onobrychis*, *Calliandra* spp., *Coronilla varia*, *G. maculata*, *Lalaba purpureus*, *Lotus divaricatus*, *Onobrychis vicifolia*, and others (3, 14, 34, 35).

When viewed collectively, our results reinforce the utility of bean as a host to sort out the nodulation strategies of phylogenetically diverse rhizobia (29, 35–37). We have identified additional, readily available hosts that may be broadly useful for these experiments (*G. maculata*, *Macroptilium atropurpureum*, and three species of *Vigna*), and we have discovered aberrant nodule responses that may prove to be useful models for studying legume-*Rhizobium* incompatibility.

We are indebted to Peter Young for his valuable help. We thank Marco A. Rogel and Julio C. Martinez Romero for technical support and David Pinkerton for assistance with photography.

This work was financed partially by a VLIR/ABOS grant from Belgium and by the Food for the 21st Century Program, University of

Missouri. L.H.L. was awarded a fellowship from the British Council to stay for 2 months in P. Young's laboratory at the John Innes Institute.

REFERENCES

- Allen, O. N., and E. K. Allen. 1981. The Leguminosae. A source book of characteristics, uses, and nodulation. University of Wisconsin Press, Madison.
- Bal, A. K., S. Shanthuram, and P. P. Wong. 1982. Nodulation of pole bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Rhizobium* species of two cross-inoculation groups. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:965–971.
- Bromfield, E. S. P., and L. R. Barran. 1990. Promiscuous nodulation of *Phaseolus vulgaris*, *Macroptilium atropurpureum* and *Leucaena leucocephala* by indigenous *Rhizobium meliloti*. *Can. J. Microbiol.* 36:369–372.
- de Lajudie, P., A. Willems, B. Pot, D. Dewettinck, G. Maestrojuan, M. Neyra, M. D. Collins, B. Dreyfus, K. Kersters, and M. Gillis. 1994. Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* subsp. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:715–733.
- Devereux, J., P. Haeblerli, and O. Smilgies. 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* 12:387–395.
- Eardly, B. D., F.-S. Wang, T. S. Whitam, and R. K. Selander. 1995. Species limits in *Rhizobium* populations that nodulate the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Appl. Environ. Microbiol.* 61:507–512.
- Eardly, B. D., J. P. W. Young, and R. K. Selander. 1992. Phylogenetic position of *Rhizobium* sp. strain Or 191, a symbiont of both *Medicago sativa* and *Phaseolus vulgaris*, based on partial sequences of the 16S rRNA and *nifH* genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1809–1815.
- Fred, E. B., L. L. Baldwin, and E. McCoy. 1932. Root nodule bacteria and leguminous plants. University of Wisconsin, Madison.
- George, M. L. C., J. P. W. Young, and D. Borthakur. 1994. Genetic characterization of *Rhizobium* sp. strain FA1145 that nodulates tree legumes. *Can. J. Microbiol.* 40:208–215.
- Graham, P. H., K. J. Draeger, M. L. Ferrey, M. J. Conroy, B. E. Hammer, E. Martinez, S. R. Arrans, and C. Quinto. 1994. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UNR1899. *Can. J. Microbiol.* 40:198–207.
- Graham, P. H., M. J. Sadowsky, H. H. Keyser, Y. M. Barnet, R. S. Bradley, J. E. Cooper, D. J. de Ley, B. D. W. Jarvis, E. B. Roslycky, B. W. Strijdom, and J. P. W. Young. 1991. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root- and stem-nodulating bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41:582–587.
- Herrera, M. A., E. J. Bedmar, and J. Olivares. 1985. Host specificity of

- Rhizobium* strains isolated from nitrogen-fixing trees and nitrogenase activities of strain GR112 in symbiosis with *Prosopis chilensis*. *Plant Sci.* **42**:177-182.
13. Hungria, M., A. A. Franco, and J. I. Sprent. 1993. New sources of high-temperature tolerant rhizobia for *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Soil* **149**:103-109.
 14. Jarvis, B. D. W. 1983. Genetic diversity of *Rhizobium* strains which nodulate *Leucaena leucocephala*. *Curr. Microbiol.* **8**:153-158.
 15. Jukes, T. H., and C. R. Cantor. 1969. Evolution of protein molecules, p. 21-132. In H. N. Munro (ed.), *Mammalian protein metabolism*. Academic Press, New York.
 16. Krishnan, H. B., and S. G. Pieppke. 1991. Sequence and analysis of the *nodABC* region of *Rhizobium fredii* USDA257, a nitrogen-fixing symbiont of soybean and other legumes. *Mol. Plant Microbe Interact.* **4**:512-520.
 17. Laguerre, G., M. P. Fernandez, V. Edel, P. Normand, and N. Amarger. 1993. Genomic heterogeneity among French *Rhizobium* strains isolated from *Phaseolus vulgaris* L. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**:761-767.
 18. Lange, R. T. 1961. Nodule bacteria associated with the indigenous Leguminosae of south-western Australia. *J. Gen. Microbiol.* **26**:351-359.
 19. Lewin, A., C. Rosenberg, H. Meyer, C. H. Wong, L. Nelson, J.-F. Manen, J. Stanley, D. N. Dowling, J. Dénarié, and W. J. Broughton. 1987. Multiple host-specificity loci of the broad host-range *Rhizobium* sp. NGR234 selected using the widely compatible legume *Vigna unguiculata*. *Plant Mol. Biol.* **8**:447-459.
 20. Martínez, E., R. Palacios, and F. Sánchez. 1987. Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. *J. Bacteriol.* **169**:2828-2834.
 21. Martínez, E., M. A. Pardo, R. Palacios, and M. A. Cevallos. 1985. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *J. Gen. Microbiol.* **131**:1779-1786.
 22. Martínez, E., D. Romero, and R. Palacios. 1990. The *Rhizobium* genome. *Rev. Plant Sci.* **9**:59-93.
 23. Martínez-Romero, E., L. Segovia, F. M. Mercante, A. A. Franco, P. Graham, and M. A. Parto. 1991. *Rhizobium tropici*: a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**:417-426.
 24. Nei, M., J. C. Stephens, and N. Saitou. 1985. Methods for computing the standard errors of branching points in an evolutionary tree and their application to molecular data from humans and apes. *Mol. Biol. Evol.* **2**:66-85.
 25. Piñero, D., E. Martínez, and R. K. Selander. 1988. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2825-2832.
 26. Qubito, C., H. de la Vega, M. Flores, L. Fernández, T. Bullido, G. Soberón, and R. Palacios. 1982. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli*. *Nature (London)* **299**:724-726.
 27. Sadowsky, M. J., P. B. Cregan, and H. H. Keyser. 1988. Nodulation and nitrogen fixation efficacy of *Rhizobium fredii* with *Phaseolus vulgaris* genotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:1907-1910.
 28. Sawada, H., H. Lekl, H. Oyalzu, and S. Matsumoto. 1993. Proposal for rejection of *Agrobacterium tumefaciens* and revised descriptions for the genus *Agrobacterium* and for *Agrobacterium radiobacter* and *Agrobacterium rhizogenes*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**:694-702.
 29. Segovia, L., J. P. W. Young, and E. Martínez-Romero. 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium cili* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**:371-377.
 30. Sousa, C., L. J. Folch, P. Bolob, M. Megias, N. Naya, and C. Quinto. 1993. A *Rhizobium tropici* DNA region carrying the amino-terminal half of a *nodD* gene and a *nod*-box-like sequence confers host-range extension. *Mol. Microbiol.* **9**:1157-1168.
 31. Taboada, H., S. Encarnación, C. Vargas, N. Narváez, Y. Mora, E. Martínez, and J. Mora. 1993. Glutamine synthetase II as a biological marker of the Rhizobiaceae family, p. 657. In R. Palacios, J. Mora, and W. E. Newton (ed.), *New horizons in nitrogen fixation*. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
 32. Taboada, H., and J. Mora. Unpublished data.
 33. Thomas, P. M., K. E. Golly, J. W. Zyskind, and R. A. Virginia. 1991. Variation of clonal, mesquite-associated rhizobial and bradyrhizobial populations from surface and deep soils by symbiotic gene region restriction fragment length polymorphism and plasmid profile analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1146-1153.
 34. Trüick, M. J. 1980. Relationships amongst the fast-growing rhizobia of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* spp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other rhizobial groups. *J. Appl. Bacteriol.* **49**:39-53.
 35. Turk, D., and H. H. Keyser. 1992. Rhizobia that nodulate tree legumes: specificity of the host for nodulation and effectiveness. *Can. J. Microbiol.* **38**:451-460.
 36. van Rhijn, P., J. Desnir, K. Vlassak, and J. Vanderleyden. 1994. Functional analysis of *nodD* genes of *Rhizobium tropici* CIAT899. *Mol. Plant Microbe Interact.* **7**:666-677.
 37. van Rhijn, P., J. Desnir, K. Vlassak, and J. Vanderleyden. 1994. The *NodD* proteins of *Rhizobium* sp. strain BR816 differ in their interactions with coinducers and in their activities for nodulation of different host plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:3615-3623.
 38. van Rhijn, P., J. S., B. Feys, C. Verreth, and J. Vanderleyden. 1993. Multiple copies of *nodD* in *Rhizobium tropici* CIAT899 and BR816. *J. Bacteriol.* **175**:438-447.
 39. Waelkens, F., T. Voets, K. Vlassak, J. Vanderleyden, and P. van Rhijn. 1995. The *nodS* gene of *Rhizobium tropici* strain CIAT899 is necessary for nodulation on *Phaseolus vulgaris* and on *Leucaena leucocephala*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **8**:147-154.
 40. Willems, A., and M. D. Collins. 1993. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**:305-313.
 41. Wilson, J. K. 1939. Leguminous plants and their associated organisms. Cornell University Agricultural Experiment Station, Ithaca, N.Y.
 42. Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**:221-271.
 43. Yanagi, M., and K. Yamasato. 1993. Phylogenetic analysis of the family Rhizobiaceae and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. *FEBS Microbiol. Lett.* **107**:115-120.
 44. Young, J. P. W., H. L. Downer, and B. D. Eardly. 1991. Phylogeny of the phototropic *Rhizobium* strain BT411 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. *J. Bacteriol.* **173**:2271-2277.
 45. Young, J. P. W., and A. W. B. Johnston. 1989. The evolution of specificity in legume-*Rhizobium* symbiosis. *Trends Ecol. Evol.* **4**:341-349.

Discusión apéndice I.

En este trabajo se determinó el rango de nodulación de *Rhizobium tropici*, *Rhizobium etli* (124) y un grupo de *Rhizobium spp.* Todas las cepas evaluadas poseen un amplio rango de nodulación y nodulan tanto mimosoideas como papilonoideas. Esta característica es compartida con otras especies de bacterias no identificadas (125), que pueden nodular *Albizzia* y *Vigna* (como nuestra cepa F16). También se conoce que *R. meliloti* (126) puede nodular *Macroptilium* y *Phaseolus vulgaris* (como nuestra cepa BR816).

Nosotros también determinamos la posición filogenética de nuestros *Rhizobium spp.*, mediante la secuencia parcial del 16SrRNA.

Las cepas CFN234 CFN244, CFN265, y Cli80 pertenecen al linaje *etli* por : secuencia y patrón de restricción del 16SrRNA, por poseer un común punto isoeléctrico en glutamino sintetasa enzima propuesta como marcador de especie (127), y al menos una de nuestras cepas probadas (CFN234), posee un espectro de nodulación similar a la cepa tipo de *Rhizobium etli*. Sin embargo estas cepas presentan las siguientes características (plasmídicas) diferentes a *R. etli* como una copia de los genes de la nitrogenasa, no producen melanina, y sus factores de nodulación son diferentes a los de *R. etli*.

En este estudio también se analizó la cepa BR816 la cual originalmente había sido ubicada como *Rhizobium tropici* (111). Sin embargo por secuencia del 16SRNA este aislado es filogenéticamente cercano a *R. meliloti*. Esta cepa nodula *Macroptilium*, *Phaseolus vulgaris* y *Leucaena*, similar a *R. meliloti* (126). Otra característica compartida entre *R. meliloti* y BR816 es que poseen alta similitud en NodP (97.5% aa) y NodQ (92.7% aa).

El encontrar *Rhizobium spp* con amplio rango de nodulación nos hace cuestionar el grado de especificidad existente entre la bacteria y la planta. Se deben de explorar más las

capacidades simbióticas en bacterias reportadas como especies, para elucidar si existe especificidad o no. Por otra parte las leguminosas probadas forman nódulos con las cepas analizadas pero solo algunas muestran fijación efectiva. Sería interesante introducir diferentes genes involucrados en la fijación de nitrógeno para tratar de inducir una simbiosis efectiva.

Este trabajo también muestra que las relaciones filogenéticas constituyen un sólido marco de referencia para estudios posteriores.

Materiales y Métodos no descritos en el texto o en los artículos.

Secuenciación Automática. Alf Sequencer.

Se utilizaron los protocolos de Pharmacia y las modificaciones sugeridas por el técnico de la misma compañía, kits y primers son de Pharmacia.

- 1.- Purificación de plásmido por el método de miniscreening.
- 2.- 5- 10 µg de DNA, en 32 µl de agua destilada. Adicionar 8 µl de NaOH (2M).
- 3.- Vortexear centrifugar. Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.
- 4.- Adicionar 7 µl de acetato de sodio 3M pH8.
- 5.- Adicionar 4 µl de agua destilada.
- 6.- Adicionar 120 µl de etanol 100% y colocar a -80°C por 30 minutos.
- 7.- Centrifugar 5 minutos, remover el sobrenadante.
- 8.- Lavar con etanol 70% una sola vez.
- 9.- Centrifugar 10 minutos.
- 10.- Resuspender la pastilla en 10 µl de agua destilada.
- 11.- Colocar 2 µl de Primero fluorescente (4-6 mol)
- 12.- Colocar 2 µl de annelling Buffer
- 13.- Vortexear, centrifugar.
- 14.- Precalear la mezcla a 65°C por 5 minutos.
- 15.- Inmediatamente colocar a 37°C por 10 minutos.
- 16.- Colocar el tubo a temperatura ambiente 10 minutos.
- 17.- Adicionar 1µl de extension buffer
- 18.- Adicionar 3 µl de DMSO.
- 19.- Centrifugar. Adicionar 7 unidades de enzima T7 DNA Polimerasa.
- 20.- Adicionar 4.5 µl de esta solución a las mezclas G.A.T.C.

- 21.- Incubar 5 minutos a 37°C
22. Adicionar 5 ml de stop solution.
- 23.- Calentar las reacciones a 90°C por 3 minutos.
- 24.- Colocar 7 microlitos en el gel de secuencia.
- 25.- El gel de secuencia se prepara al 6%.
- 26.- Condiciones de corrida: Volts 1500. Corriente 38mA. Watts 34. Temperatura 40°C
Poder del laser 3mW. Tiempo 5 hrs.

Determinaciones enzimáticas

Malato sintasa.

- 1.- Tris-P04 100µl (1M)
 - 2.- Agua destilada 478 µl
 - 3.-MgCl₂, 12µl (250mM)
 - 4.- Acetil CoA 100 µl (4mM)
 - 5.- DTNB 200 µl (5mM)
 - 6.- 100 µl de extracto, bacterias (12 hrs) o bacteroides 25días
- Incubar 2 min a temperatura ambiente.
- 7.- Glioxilato 10 µl (100mM)
 - 8.- Monitorear en espectrofotómetro A412

Isocitrato liasa.

- 1.- Mops buffer 50 μ l (1M)
 - 2.- Agua destilada 478 μ l
 - 3.- MgCl₂ 12 μ l (250mM)
 - 4.- DTT 50 μ l (100mM)
 - 5.- EDTA 10 μ l (100mM)
 - 6.- NADH 10 μ l (20mM)
 - 7.- Lactato deshidrogenasa 5.25 μ l (stock comercial Sigma).
 - 8.- Bacterias (12hrs) o bacteroides de 25 dias. 100 μ l
 - 9.- Incubar 2 min a temperatura ambiente.
 - 10.-Ds Threo- isocitrato 100 μ l (5 mM)
- Monitorear en espectrofotómetro A340.

Los bacteroides y las bacterias se lisan en la siguiente solución

K Phosphate pH 7.2 . 20mM.

MgCl₂ 5mM

EDTA 1 mM

Glycerol 1 M

DTT 1 mM

Posteriormente se centrifugan 10 minutos y se toma el sobrenadante para medir las actividades enzimáticas.

Los protocolos de las actividades enzimáticas fueron provistos por Michael Dunn.

Bibliografía.

- 1.-Campbell. R. (1987). Ecología microbiana. Limusa. México
- 2.-Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. Microbiol. Rev. 51, 221-271.
- 3.- Crow, V. L., B. D. W. Jarvis, and R. M. Greenwood. (1981). Deoxyribonucleic acid homologies among acid producing strains of *Rhizobium*. Int. J. Syst. Bact. 31,152.
- 4.- Honeycutt, R. J., M. McClelland, and B.W. S. Sobral. (1993). Physical map of the genome of *Rhizobium meliloti* 1021. J. Bacteriol. 175, 6945-6952.
- 5.- Kundig. C., H. Hennecke, and M. Gottfert. (1993). Correlated physical and genetic map of the *Bradyrhizobium japonicum* 110 genome. J. Bacteriol. 175, 613-622.
- 6.-Martínez E., and J. Caballero. (1996). *Rhizobium* phylogenies and bacterial diversity. Crit. Rev. Plant Science. 15, 113-140.
- 7.-Géniaux E., M. Flores, R. Palacios, and E. Martínez. (1995). Presence of megapasmids in *Rhizobium tropici* and further evidence of differences between the two *R.tropici* subtypes. Int. J. Sist. Bacteriol. 45, 392- 394.
- 8.-Martínez E., D. Romero, and R. Palacios. (1990). The *Rhizobium* genome Crit. Rev. Plant Science. 9, 59-93.
- 9.- Moenne-Loccoz, Y., J. I. Baldani, and R. W. Weaver. (1995). Sequential heat curing of Tn5-Mob-sac labelled plasmids from *Rhizobium* to obtain derivatives with various combinations of plasmids and no plasmids. Letters Appl. Microbiol.20:175-179.
- 10.-García de los Santos A., S. Brom, and D. Romero. (1996). *Rhizobium* plasmids in bacteria-legume interactions. World. J. Microbiol . Biotechnol. 12, 119-125.
- 11.-Fisher R., and S. Long. (1992). *Rhizobium* plant signal exchange. Nature. 357, 655-659.

- 12.-Recourt, K., A. A. N. Van Brussel, A. J. M. Driessen, and B. J. J. Lugtenberg. (1989). Accumulation of a *nod* gene inducer, the flavonoid naringenin in the cytoplasmic membrane of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* is caused by the pH dependent hydrophobicity of naringenin. *J. Bacteriol.* 171, 4370-4377.
- 13.-Schlaman, H. R. M., R. J. H. Okker, and B. J. J. Lugtenberg. (1989). Subcellular localization of the *nodD* gene product in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.* 171, 4686- 4693.
- 14.-Denarié J., and J. Cullimore. (1993). Lipo-oligosaccharide nodulation factors: a minireview. New class of signal molecules mediating recognition and morphogenesis. *Cell.* 74, 951-954.
- 15.-Marie, C., M. A. Barny, and J. A. Downie.(1992). *Rhizobium leguminosarum* has two glucosamine synthases, *GlmS* and *NodM* required for nodulation and development of nitrogen fixing nodules. *Mol. Microbiol.* 6, 843- 851.
- 16.- Carlson, R.W., Price. N.P.J, and Stacey. G. (1994). The biosynthesis of rhizobial Lipo- oligosaccharide nodulation signal molecules. *Mol. Plant-Microbe Interac.*7: 684-695.
- 17.- Debellé. F., and Sharma.S.B. (1986). Nucleotide sequence of *Rhizobium meliloti* RCR2011 genes involved in host specificity of nodulation . *Nucleic Acids Res.* 14: 7453-7472.
- 18.- Schwedock. J., and Long. S.R. (1989). Nucleotide sequence and protein products of two new nodulation genes of *Rhizobium meliloti*, *nodP* and *nodQ*. *Mol. Plant-Microb Interac.* 2:181-194.
- 19.-Spaink, H.P., D. M. Sheeley, A. A. N. Van Brussel, J. Glushka, W. S. York, T. Tak, O. Geiger, E. P. Kennedy, V. N. Reinhold, and B. J J. Lugtenberg. (1991). A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature.* 354, 125-130.

- 20.-Truchet G., P. Roche, P. Lerouge, J. Vasse, S. Camut, F.de Billy, J. C. Promé, and J. Denarié. (1991). Sulphated lipo- oligosaccharide signal of *R.meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. *Nature*. 351, 670-673.
- 21.- Gloude-mans. T., Bhuvan-eswari. T.V, Moerman. M, Van Brussel. T, Van Kammen. A. (1989). Involvement of *Rhizobium leguminosarum* nodulation genes in gene expression in pea root hairs. *Plant Mol. Biol.* 12:157-167.
- 22.- Rohm. M., Werner. D, (1987). Isolation of root hairs for seedlings of *Pisum sativum*. Identification of root hairs specific proteins by in situ labelling . *Physiol. Plant.* 69: 129-136.
- 23.- Scheres.B., Van de Wiel. C, Zalenski. A, Horvath. B, Spaink. H. (1990). The ENOD12 product is involved in the infection process during the pea *Rhizobium* interactions. *Cell.* 60: 281-294.
- 24.- Appleby. C. A. (1984). Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35: 433-478.
- 25.-Bergmann, H., E. Preddie, and D. P. S. Verma. (1983). Nodulin-35 a subunit of nodule-specific uricase (uricase II) induced and localized in uninfected cells. *EMBO J.* 2, 2333-2339.
- 26.-Lara, M., J. Cullimore, P. J. Mifflin, B. J. Johnston, and C. Lamb. (1983). Appearance of a novel form of plant glutamine synthetase during the nodule development in *Phaseolus vulgaris*. *L. Planta.* 157, 254-258.
- 27.-Thummler, F. and D. P. S. Verma. (1987). Nodulin-100 of soybean is the subunit of sucrose synthetase regulated by the availability of free heme in nodules. *J. Biol. Chem.* 262, 14730-14736.
- 28.-Stowers, M. D. (1985). Carbon metabolism in *Rhizobium* species. *Annu. Rev. Microbiol.* 39, 89-108.
- 29.-Glenn, R. A. *Arch Microbiol.* (1981) 129, 233- 239.

- 30.- DeVries. G. E., Van Brussel.A.N, and Quispel.A. (1982). Mechanism and regulation of glucose transport in *Rhizobium leguminosarum*. J. Bact. 149: 872-879.
- 31.- Ronson. C. W., Primrose.S.B. (1979). J. Bact. 139: 1075-1078.
- 32.- Stowers. M.D., and G.H. Elkan. (1982). The transport and metabolism of glucose in cowpea *rhizobia*. Can. J. Microbiol. 29: 398- 406.
- 33.-Finan, T. M., J. M. Wood, and C. Jordan. (1983). Symbiotic properties of C4 dicarboxylic acid transport mutants of *Rhizobium leguminosarum*. J. Bacteriol. 154, 1403-1413
- 34.-Glenn, A. R., P. S. Poole, and J. F. Hudman. (1980). Succinate uptake by free-living and bacteroid forms of *Rhizobium leguminosarum*. J. Gen. Microbiol. 119, 267- 271.
- 35.- Batista, S., S. Castro, M. Ubalde, and G. Martínez-Drets. (1994). Effect of divalent cations on succinate transport in *Rhizobium tropici*, *R. leguminosarum bv.phaseoli* and *Rhizobium loti*. World. J. Microbiol.Biotechnol. 10. 249-255
- 36.- Baldani. I. J., R. W. Weaver, M. F. Hynes, and B.D. Eardly. (1992). Utilization of carbon sustrates, electrophoretic enzyme patterns and symbiotic performance of plasmid - cured clover *Rhizobia*. Appl. Environ. Microbiol. 58, 2308-2314.
- 37.- Parke. D., and N.Ornston. (1984). Nutritional diversity of *Rhizobiaceae* revealed by auxanography. J. Gen. Microbiol. 130: 1743- 1750.
- 38.-Stowers, M. D. Arch. Microbiol. (1984) 137, 3-9.
- 39.-Irigoyen J. J., M. Sanchez-Díaz and D. W. Emerich. (1990). Carbon metabolism enzymes of *Rhizobium meliloti* cultures and bacteroids and their distribution within alfalfa nodules. Appl. Environ. Microbiol. 56, 2587- 2589.
- 40.-Mulongoy, K., and G. H. Elkan. (1977). Glucose catabolism in two derivatives of a *Rhizobium japonicum* strain differing in nitrogen-fixing efficiency. J. Bacteriol. 131, 179-187.
- 41.-Siddiqui.I.A.K. Folia Microbiol. (1975) 20, 412- 417.

- 42.- Arias. A., and G. Martínez -Drets. (1976). Glycerol metabolism in *Rhizobium*. Can. J. Microbiol. 22: 150- 153.
- 43.- Preston.G.G., J. D. Wall, and D.W. Emerich. (1990). Purification and properties of acetyl CoA synthetase from *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. Biochem. J. 26:179-183.
- 44.-Saroso S., M. J. Dilworth, and A. R. Glenn. (1986). The use of carbon catabolic enzymes as a probe for the carbon nutrition of snakebean nodule bacteroids. J. Gen Microbiol. 132, 243-249.
- 45.-Hooymans, M. J. J. (1984) In Advances in Nitrogen Fixation Research ed. W. E. Newton .C. Veeger. pp261.
- 46.-Glenn A. R., I. A. McKay, R. Arwas, and M. J. Dilworth. (1984). Sugar metabolism and symbiotic properties of carbohydrate mutants of *Rhizobium leguminosarum*. J. Gen Microbiol. 130, 239-245
- 47.-Trinchant. J. C., A .M. Birot, and J. Rigaud. (1981). Oxygen supply and energy-yielding substrates for nitrogen fixation (acetylene reduction) by bacteroids. J. Gen Microbiol. 125, 159-165.
- 48.-Duncan, M. J. (1981). Properties of Tn5-induced carbohydrate mutants in *Rhizobium meliloti*. J. Gen. Microbiol. 122, 61- 67.
- 49.- Arias. A., C. Cerveñansky, A. Gardiol, and G. Martínez Drets. (1979). Phosphoglucose isomerase mutant of *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 137. 409-414.
- 50.- Finan. T.M., E. McWhinnie, B. Driscoll, and R. J. Watson. (1991) Complex symbiotic phenotypes result from gluconeogenic mutations in *Rhizobium meliloti*. Mol. Plant- Microbe Interac. 4: 386-392.
- 51.- Mckay. I. A., A. R. Glenn, and M. J. Dilworth. (1985). Gluconeogenesis in *Rhizobium leguminosarum* MNF 3841. J. Gen. Microbiol. 131:2067- 2073.
- 52.- Osteras. M., T. M. Finan, and J. Stanley. (1991) Site- directed mutagenesis and DNA sequence of *pckA* of *Rhizobium* NGR234, encoding phosphoenolpiruvate

carboxykynase: gluconeogenesis and host- dependent symbiotic phenotype. Mol. Gen. Genet. 230: 257- 269.

53.- Clive, W. R., P. Lyttleton, and J. G. Roberts. (1981). C₄- dicarboxylate transport mutants of *Rhizobium trifoli* form ineffective nodules on *Trifolium repens*. Proc. Natl. Acad. Sci. 78, 484-4288.

54.-Duncan M. J., and G. Frankel. (1979). Alfa ketoglutarate dehydrogenase mutant of *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 137, 415-419.

55.-Gardiol. A., A. Arias, C. Cerveñansky, and G. Martínez-Drets. (1982). Succinate dehydrogenase mutant of *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 151, 1621-1623.

56.- Nimmo, H.G. (1987). In *Escherichia coli* and *Salmonella thyphymurium*. (ed). Neidhard. F. C. et al. Washington, D.C. American Society for Microbiol. Vol 1 pp156-169.

57.-Jin, S., and A L. Sonei. (1995). Identification of two distinct *Bacillus subtilis* citrate synthase genes. J. Bacteriol. 176, 4669- 4679.

58.- Poole. P., and D. Walshaw. (1996). Regulation of the TCA cycle in *Rhizobium* by overflow metabolism. Proceedings of 2nd European Nitrogen Fixation Conference. NATO Advanced Research Workshop. Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture. Sep 8-13. Poznań, Poland. pp 211.

59.-Weitzman, J. D.P., and J. Danson. (1976). Citrate synthase. Curr. Top. Cell. Reg. 10, 161- 204.

60.-Mckay I. A., M. J. Dilworth, and A. R. Glenn. (1989). Carbon catabolism in continuous cultures and bacteroids of *Rhizobium leguminosarum* MNF 3841. Arch. Microbiol. 152, 606-610.

61.-Martínez-Drets, G., and A. Arias. (1972) Enzymatic basis for differentiation of *Rhizobium* into fast- and slow growing groups. J. Bacteriol. 109, 467- 470.

62.-Kurtz, W. G. W., and T. A. Larue. (1977). Citric acid enzymes and nitrogenase in nodules of *Pisum sativum*. Can. J. Microbiol. 23,1197-1200.

- 63.-McDermott T. R., and M. Kahn. (1992). Cloning and mutagenesis of the *Rhizobium meliloti* isocitrate dehydrogenase gene. *J. Bacteriol.* 174, 4790- 4797.
- 64.-Rastogi. V. K., and R. J. Watson. (1991). Aspartate aminotransferase activity is required for aspartate catabolism and symbiotic nitrogen fixation in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 173, 2879-2887.
- 65.-De Bruijn, F.J., S. Rossbach, M. Schneider, P. Ratet, S. Messmer, W. W. Szeto, F. M. Ausubel, and J. Schell. (1989). *Rhizobium meliloti* 1021 has three different regulated loci involved in glutamine biosynthesis, none of which is essential for symbiotic nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* 171, 1673- 1682.
- 66.-Somerville J. E., R. G. Shatters, and M. L. Kahn. (1989). Isolation and characterization and complementation of *Rhizobium meliloti* 104A14 mutants that lack glutamine synthase II activity. *J. Bacteriol.* 171, 5079, 5086.
- 67.-Lewis. T. A., R. Gonzalez, and J. L. Botsford. (1990). *Rhizobium meliloti* glutamate synthase : cloning and initial characterization of the *glt* locus. *J. Bacteriol.* 172, 2413-2420
- 68.-Ousbourne, M. S., and E. R. Signer. (1980). Ammonium assimilation in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 143, 1234- 1240.
- 69.-Stam, H., W. Devries, A. H. Stouthamer, and H. W. Vanverseveld. (1986). Utilization of poly-B-hydroxybutyrate in free-living cultures of *Rhizobium* ORS571. *FEMS Microbiol. Letts.* 35, 215-220.
- 70.-Goodchild, D. J. (1977). The ultrastructure of root nodule in relation to nitrogen fixation . *Int. Rev.Cytol.* Academ Press New York. pp 235-288
- 71.-Karr. D. B., J. K. Waters, F. Suzuki, and D. W. Emerich. (1984). Enzymes of the poly-B-hydroxybutyrate and citric acid cycles of *Rhizobium japonicum* bacteroids. *Plant Physiol.* 75, 1158-1162.
- 72.-Ndoye, I., S. F. Debilly, J. Vasse, B. Dreyfus, and G. Truchet. (1994). Root nodulation of *Sesbania rostrata*. *J. Bacteriol.* 176, 1060- 1068.

- 73.-Cevallos. M. A., S. Encarnación, A. Leija, Y. Mora, and J. Mora. (1996). Genetic and physiological characterization of a *Rhizobium etli* mutant strain uncoupled in poly- β hydroxybutyrate synthesis. *J. Bacteriol.* 178,1646-1654.
- 74.-Bergensen, F. J., M. B. Peoples, and G. L. Turner. (1991). A role for poly-B-hydroxybutyrate in bacteroids of soybean root nodules. *Proc. R. Soc. London B.* 245, 59-64.
- 75.-Kouchi, H. In *Nitrogen Fixation : Hundred years after* Eds. H. Bothe, F. J. de Bruijn, and W. E. Newton. p558, Gustav Fisher, Stuttgart. New York.(1988)
- 76.-McDermott T. R., S. M. Griffith, C. P. Vance, and P. H. Graham. (1989). Carbon metabolism in *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. *FEMS Microbiol Rev.* 63, 327-340.
- 77.- Johnson. G. V., H. J. Evans, and T. Ching. (1966). Enzymes of the glyoxylate cycle in *Rhizobia* and nodules of legumes. *Plant Physiol.* 41, 1330- 1336.
- 78.-Wong. P. P., and H. J. Evans. (1971). Poly- β -hydroxybutyrate utilization by soybean (*Glycine max* Merr.) nodules and assessment of its role in maintenance of nitrogenase activity. *Plant Physiology.* 47, 750-755
- 79.- Mandal. N.C., and P. K. Chakrabarty. (1992). Regulation of enzymes of glyoxylate pathway in root-nodule bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 38, 417-427.
- 80.-Driscoll. B. T., and T. M. Finan. (1993). NAD⁺-dependent malic enzyme of *Rhizobium meliloti* is required for symbiotic nitrogen fixation. *Molec. Microbiol.* 7, 865-873.
- 81.- Driscoll. B. T., and T. M. Finan. (1996). NADP dependent malic enzyme of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 178, 2224- 2231
- 82.- Srivastava. D. K., and S. A. Bernhard. (1986). Metabolite transfer via enzyme-enzyme complexes. *Science.* 234, 1081- 1086.

- 83.- Beeckmans.S., E. Van Driessche, and L. Kanarek. (1993). Immobilized enzymes as tools for the demonstration of metabolon formation. A short overview. *J. Mol. Recog.* 6, 195-204.
- 84.- Fahein. L. A., and E. Kmiotek. (1983). Complexes between mitochondrial enzymes and either citrate synthase or glutamate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys.* 220, 386-397.
- 85.-Sumegi, B. and I.Alkonyi. (1983). A study on the physical interaction between the pyruvate dehydrogenase complex and citrate synthase. *Biochim. Biophys. Acta.* 749, 163-171.
- 86.-Persson, L., and P. A. Srere. (1992). Purification of the mitochondrial citrate transporter in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 183, 70- 76.
- 87.-Beeckman S., A. S. Khan, E. V. Driessche, and L. Kanarek. (1994). A specific association between the glioxilic-acid-cycle enzymes isocitrate liase and malate synthase. *Eur. J. Biochem.* 224, 197-201.
- 88.- Robinson. J. B., and P. A. Srere. (1985). Organization of Krebs tricarboxylic acid cycle enzymes in mitochondria. *J. Biol. Chem.* 260, 10800- 10805.
- 89.- Srere. P. A., and J. Ovadi. (1990). Enzyme- enzyme interactions and their metabolic role. *Febs. Lett.* 268, 360-364.
- 90.-Martínez Romero, E., L. Segovia, F. Martins Mercante, A. Franco, P. Graham, and M. A. Pardo. (1991). *Rhizobium tropici* a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena leucocephala*. *Int. J. Syst Bacteriol.* 41, 417-426.
- 91.- Martínez Romero E., R. Palacios, and F. Sanchez. (1987). Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. *J. Bacteriol.* 169, 2828-2834.
- 92.-Pardo. M. A., J. Lagunez, J. Miranda, and E. Martínez. (1994). Nodulating ability of *Rhizobium tropici* is conditioned by a plasmid-encode citrate synthase. *Mol. Microbiol.* 11,315-321.

- 93.- Paulus. F., J. Canaday, and L. Otten. (1991). Limited host range Ti plasmids: recent origin from wide host range Ti plasmids and involvement of a novel IS element IS 868. *Molec. Plant. Microb. Interac.* 4, 190- 197.
- 94.-Yamada T., P.D. Lee, and T. Kosuge.(1986). Insertion sequence elements of *Pseudomonas savastanoi*: nucleotide sequence and homology with *Agrobacterium tumefaciens* transfer DNA. *Proc. Natl. Sci. U.S.A.* 83, 8263- 8267.
- 95.-Naota I., and G. Sato. (1988). Nucleotide sequence of insertion sequence IS3411, which flanks the citrate utilization determinant of transposon Tn3411. *J. Bacteriol.* 170, 1902- 1906.
- 96.- Matsutani. S., and E. Ohtsubo. (1990) Complete sequence os IS629. *Nucl. Acid. Res.* 18, 1899.
- 97.-McAdam. R. A., P. W. M. Hermans, D. Van. Soolingen, Z. F. Zainuddin, D. Catty, J. D. A. van Embden, and J. W. Dale. (1990). Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence belonging to the IS3 family. *Mol. Microbiol.* 4, 1607- 1613.
- 98.- Sawada. H., H. Ieki, H. Oyaizu, and S. Matsumoto. (1993). Proposal for rejection af *Agrobacterium tumefaciens* and revised descriptions for the genus *Agrobacterium* and for *Agrobacterium radiobacter* and *Agrobacterium rhizogenes*. *Int. J. Syst. Bac.* 43, 694-702.
- 99.- Laeremans, T., I. Caluwaerts, C. Verret, M. A. Rogel, J. Vanderleyden, and E. Martinez. (1996). Isolation and characterization of the *Rhizobium tropici* Nod factor sulfation genes. *Mol. Plant Microb Interac.* 9. 492-500.
- 100.-Rieul, C., F. Bleicher, B. Duclos, J. C. Cortay, A. J. Cozzono. (1988). Nucleotide sequence of the *aceA* gene coding for isocitrate lyase in *Escherichia coli*. *Nucl Acids Res.* 16, 5689- 5689.
- 101.-Fernandez, E., F. Moreno, and R. Rodicio. (1992). The ICL1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 204, 983- 990.

- 102.-Gainey, L. D. S., I. F. Connerton, E. H. Lewis, G. Turner, and D. J. Ballance. (1992). Characterization of the glyoxysomal isocitrate lyase genes of a *Aspergillus nidulans* (*Acud*) and *Neurospora crassa* (*acu3*) *Curr. Genet.* 21, 43- 47.
- 103.-Zhang, Z. J., M. Gomez Pedroso, C. S. Baden, and J. J. Harada. (1993). Two classes of isocitrate lyase, genes are expressed during late embryogeny and postgermination in *Brassica napus* L. *Mol. Gen. Genet.* 238, 177- 184.
- 104.- Maloy. S. R., and W. D. Nunn.(1982). Genetic regulation of the glyoxylate shunt in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 149, 173-180.
- 105.- Molina. B., M.T. Pellicer, J. Baldia, J. Aguilar, and L. Baldoma. (1994). Molecular characterization of *Escherichia coli* malate synthase G Differentiation with the malate synthase A isoenzyme. *Eur. J. Bioch.* 224, 541-548.
- 106.-Bartsh K., A. von John- Marteville, and A. Schultz. (1990). Molecular analysis of two genes of the *Escherichia coli* *gab* cluster: nucleotide sequence of the glutamate: succinic semialdehyde transaminase gene (*gabI*) and characterization of the succinic semialdehyde dehydrogenase gene (*gabD*). *J. Bacteriol.* 172, 7035- 7042.
- 107.-Ken L. D., C. Deborah, L. Caudle, D. D. Hinson, C. R. Moomav, C. A. Slaughters, C. Jakobs and K. M. Gibson. (1995). Molecular cloning of the mature NAD⁺- dependent succinic semialdehyde dehydrogenase from rat and human. *J. Biol. Chem.* 270, 461-467.
- 108.- Shabtay. D., Y. S. Halpern. (1974). Genetic analysis of the γ aminobutirate utilization pathway in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 117, 494-501
- 109.-Romanov V. I., and E. Martínez. (1994). Sucrose transport and hydrolysis in *Rhizobium tropici*. *Plant Soil* . 161, 91-96.
- 110.-Fisher, B. D. (1978). The estimation of sugar concentration in individual sieve-tube elements by negative staining. *Planta.* 139, 19-24.
- 111.-Van Rhijn, P. J. S., B. Feys, C. Verret, and J. Vanderleyden. (1993). Multiple copies of *nodD* in *Rhizobium tropici* CIAT 899 and BR816. *J. Bacteriol.* 175, 438- 447.

- 112.-Poupot R., E. Martínez Romero, F. Maillet, J. C. Promé. (1995). *Rhizobium tropici* nodulation factor sulfation is limited by the quantity of activated form of sulfate. FEBS Lett. 368, 536-540.
- 113.- Norman, A. F., R. Regnery, P. Jameson, C. Greene, and D. C. Krause. (1995). Differentiation of *Bartonella* - like isolates at the species level by PCR - restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. J. Clin. Microbiol. 33, 1797-1803.
- 114.- Donald, L. J., G. F. Molgat, and H.W. Duckworth. (1989). Cloning sequencing and expression of the gene for NADH sensitive citrate synthase of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 171, 5542- 5550.
- 115.- John G. Streeter. (1987). Carbohydrate, organic acid and amino acid composition of bacteroids and cytosol from soybean nodules. Plant Physiol. 85, 768-773.
- 116.-Herrada. G., A. Puppo and J. Rigaud. (1989). Uptake of metabolites by bacteroid-containing vesicles and by free bacteroids from french bean nodules. J. Gen. Microbiol. 135, 3165-3171.
- 117.- Geelen, D., K Goethals, M. V. Montagu, and M. Holsters. (1995). The *nodD* locus from *Azorhizobium caulinodans* is flanked by two repetitive elements. Gene. 164, 107-111.
- 118.- Lindstrom, K., S. Kaijalainen, G. Nick, G. Radeva, L. A. Rasanen, A. Saano, L. Suominen, and E. Tas. (1994). *Rhizobium galegae*, molecular biology, phylogeny and ecology. International symposium on diversity and taxonomy of *Rhizobium*. Hubei, China. pp21.
- 119.- Schwedock, J., and S. R. Long. (1994). An open reading frame downstream of *Rhizobium meliloti nodQ1* shows nucleotide sequence similarity to an *Agrobacterium tumefaciens* insertion sequence. Mol. Plant Microb Interac. 7, 151- 153.

- 120.- Goethals, K., M. P. Gao, M. Gelen, M. V. Montagu, and M. Holsters. (1992). Identification of a new inducible nodulation gene in *Azorhizobium caulinodans*. *Molec. Plant. Microb. Interac.* 5, 405-411.
- 121.-Curl, E. A., B. Truelove.(1986). The rhizosphere. Spring Verlag . Berlin Heidelberg New York Tokyo. pp 71- 74.
- 122.-Encarnación, S., M. Dunn, K. Willms, and J. Mora. (1996). Fermentative and aerobic metabolism in *Rhizobium etli*. *J. Bacteriol.* 177, 3058- 3066.
- 123.-Stovall I., and M. Cole. (1978). Organic acid metabolism by isolated *Rhizobium japonicum* bacteroids. *Plant Physiol.* 61, 787-790.
- 124.- Segovia. L., J. P. W. Young, and E. Martínez. (1993). Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar Phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp.nov. *Int. J. Syst Bacteriol.*43: 374-377
- 125.- Lange. R.T. (1961). Nodule bacteria associated with the indigenous Leguminosae of south- western Australia. *J. Gen. Microbiol.* 61, 351-359.
- 126.- Bromfield. E. S. P., and L. R. Barran. (1990). Promiscuous nodulation of *Phaseolus vulgaris*, *Macroptilium atropurpureum* and *Leucaena leucocephala* by indigenous *Rhizobium meliloti*. *Can. J. Microbiol.* 36, 369-372.
- 127.- Taboada. H., S. Encarnación, M.C. Vargas, Y. Mora, E. Martínez, and J. Mora. (1996). Gltamine synthetase II constitutes a novel taxonomic marker in *Rhizobium etli* and other species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 62, 485-491.