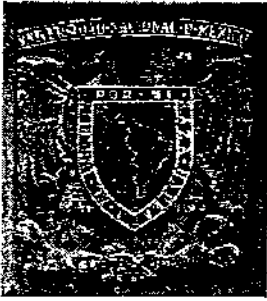


VILLALOBOS LOPEZ, MIGUEL ANGEL. 1998.

03072

13
29.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

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

El papel simbiótico del gen *nodS* de *Rhizobium tropici* y *Rhizobium etli* en la interacción *Rhizobium*-Leguminosa

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA

BIOL. MIGUEL ANGEL VILLALOBOS LOPEZ



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA UNAM

Cuernavaca, Mor., 1998



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE GENERAL

I RESUMEN	1
II INTRODUCCION	2
II.1 LA SIMBIOSIS RHIZOBIACEAE-LEGUMINOSA	3
II.2 LOS GENES <i>nod</i> Y LA SINTESIS DE LIPO-OLIGOSACARIDOS	12
II.3 LA FUNCION DE LOS GENES DE NODULACION	19
II.3.1 EL GEN <i>nodD</i> Y LA REGULACION DE LOS GENES <i>nod</i>	19
II.3.2 LOS GENES <i>nod</i> COMUNES Y SU FUNCION BIOQUIMICA	25
II.3.3 FUNCION BIOQUIMICA DE LOS GENES <i>nod</i> ESPECIFICOS (<i>hsn</i>)	26
III ANTECEDENTES	
III.1 CLASIFICACION FILOGENETICA DE <i>Rhizobium etli</i> y de <i>R. tropici</i>	32
III.2 LOCALIZACION Y REGULACION DE <i>nodS</i>	32
III.3 FENOTIPO DE MUTANTES <i>nodS</i> ⁻	34
III.4 INTENTOS POR COMPLEMENTAR MUTANTES <i>nodS</i> ⁻	35
III.5 FUNCION BIOQUIMICA DE <i>NodS</i>	35
III.6 PLANTEAMIENTO DEL PROYECTO DE TESIS	35
IV OBJETIVOS	37
V MATERIAL Y METODOS	
V.1 BACTERIAS Y PLASMIDOS	39
V.2 MINIPREPARACIONES DE DNA PLASMIDICO	40
V.3 AISLAMIENTO DE DNA PLASMIDICO AGRAN ESCALA POR GRADIENTE DE Cs-EtBr	41
V.4 EXTRACCION DE DNA TOTAL DE <i>Rhizobium</i>	43
V.5 TECNICAS DE TRANSFERENCIA DE DNA	44
V.6 REEMPLAZAMIENTO GENICO EN <i>Rhizobium</i>	47
V.7 RECUPERACION DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA	48
V.8 ANALISIS DE DNA GENOMICO POR HIBRIDACION TIPO "SOUTHERN"	48
V.9 SECUENCIACION NUCLEOTIDICA	50
V.10 DETECCION DE METABOLITOS <i>Nod</i> USANDO TLC	52
V.11 EXPERIMENTOS DE NODULACION	53
V.12 INCLUSION EN PARAFINA DE NODULOS DE <i>Leucaena</i>	55
VI RESULTADOS	
VI.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION FISICA DEL GEN <i>nodS</i> DE <i>R. tropici</i> CIAT899	57
VI.2 LOCALIZACION FISICA DEL GEN <i>nodU</i> DE <i>R. tropici</i> CIAT899	63
VI.3 SECUENCIACION NUCLEOTIDICA DEL GEN <i>nodS</i> DE <i>R. tropici</i> CIAT899	63
VI.4 MUTAGENESIS DEL GEN <i>nodS</i> DE <i>R. tropici</i> CIAT899	70
VI.5 ANALISIS EN TLC DE LOS FACTORES <i>Nod</i> PRODUCIDOS POR CEPAS MUTANTES EN <i>nodS</i>	76
VI.6 ANALISIS DE LOS FACTORES <i>Nod</i> PRODUCIDOS POR LA CEPA MUTANTE <i>nodS::Kam1-20</i> COMPLEMENTADA CON LOS GENES <i>nodS</i> DE <i>R. tropici</i> Y DE <i>R. loti</i>	78
VI.7 ANALISIS EN TLC DE LOS FACTORES PRODUCIDOS POR UNA MUTANTE EN <i>nodS</i> DE <i>R. etli</i> (pRP17.1)	82
VI.8 CINETICA DE NODULACION DE LA MUTANTE <i>nodS::Kam1-20</i> EN RAICES DE <i>Leucaena</i>	85
VI.9 FIJACION DE NITROGENO EN LOS NODULOS INDUCIDOS POR <i>nodS::Kam1-20</i> EN RAICES DE <i>Leucaena</i>	89

VI.10 ESTUDIOS HISTOLOGICOS DE LOS NODULOS PRODUCIDOS POR <i>nodS</i> :: <i>kam1-20</i> EN RAICES DE <i>Leucaena</i>	91
VI.11 FENOTIPO DE NODULACION DE LA CEPA MUTANTE <i>nodS</i> :: <i>kam1-20</i> SOBRE RAICES DE <i>Phaseolus vulgaris</i> VAR. NEGRO JAMAPA	94
VII DISCUSION	96
VII.1 LOCALIZACION FISICA DEL GEN <i>nodS</i> DE <i>R. tropici</i> CIAT899	96
VII.2 SECUENCIA NUCLEOTIDICA DEL GEN <i>nodS</i> DE <i>R. tropici</i> CIAT89998	
VII.3 LA CEPA MUTANTE <i>nodS</i> DE <i>R. tropici</i> PRODUCE FACTORES Nod NO METILADOS, ASI COMO UNA ALTERACION GENERAL EN LA PRODUCCION DE ESTOS	99
VII.4 UNA CEPA MUTANTE <i>nodS</i> DE <i>R. etli</i> (pRP17.1) PRODUCE FACTORES Nod NO METILADOS, ADEMAS DE PROVOCAR UN EFECTO POLAR SOBRE LOS GENES <i>nodU</i>	104
VII.5 A PESAR DE SER DISPENSABLE PARA LA NODULACION DE <i>Leucaena</i> Y <i>Phaseolus</i> , LA EXPRESION DE <i>nodS</i> ES REQUERIDA PARA UN ADECUADO DESARROLLO DEL NODULO SIMBIOTICO	106
VIII CONCLUSIONES	112
IX BIBLIOGRAFIA	113

I. RESUMEN

La simbiosis existente entre las bacterias de la familia Rhizobiaceae y plantas leguminosas es altamente específica. Para el adecuado reconocimiento de ambos simbioses, se requiere de un intercambio de señales moleculares: en respuesta a flavonoides exudados por la raíz, la bacteria responde con la síntesis y exportación de lipooligosacáridos (factores Nod) que son reconocidos por la planta, provocando en ella una serie de respuestas que culminan en la formación de nódulos radiculares capaces de llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno.

Para la síntesis de los factores Nod se requiere de la expresión de toda una batería de genes bacterianos, llamados genes *nod*. Existen genes *nod* comunes y genes *nod* determinantes de la especificidad de hospedero (*hsn*). Los genes *nod* comunes sintetizan el esqueleto del factor Nod, constituido por oligómeros de quitina de diferentes longitudes, los cuales llevan un grupo acilo sobre su extremo no reductor. Por otro lado, los genes *hsn* proveen una serie de "decoraciones" para el esqueleto del factor Nod, al incorporarle grupos sulfato, metilo, azúcares, etc. Estas modificaciones al factor Nod son importantes determinantes de la especificidad de hospedero.

En este trabajo se presentan datos experimentales que indican que el gen *nodS* de *Rhizobium tropici* CIAT899 (gen tipo *hsn*) participa en la metilación de los factores de nodulación producidos por esta especie. Usando técnicas de reemplazamiento génico, se obtuvieron cepas mutantes *nodS*⁻ que tienen este gen interrumpido con un interposón de resistencia a kanamicina. Los factores Nod producidos por estas mutantes se analizaron usando cromatografía en capa fina, y los datos obtenidos indican que NodS resulta indispensable para la metilación de los factores Nod que produce *R. tropici*. Así mismo, los resultados obtenidos en experimentos de nodulación indican que *nodS* es importante para lograr una adecuada simbiosis, ya que cepas mutantes en éste gen, provocan una disminución en el número y tamaño de los nódulos en plantas de frijol y *Leucaena*. Estudios de microscopía y cromatográficos, muestran que en *Leucaena* los nódulos inducidos por la mutante presentan alteraciones en su desarrollo y no fijan nitrógeno.

II. INTRODUCCIÓN

La fijación biológica del nitrógeno es un proceso natural exclusivo de microorganismos procariotes, que consiste en la reducción del nitrógeno molecular (N_2) a amonio (NH_3), el cual es aprovechado por otros microorganismos así como también por plantas superiores. Existen muchos géneros bacterianos que son capaces de llevar a cabo este proceso, el cual aporta una gran cantidad de nitrógeno orgánico a la biósfera. La disponibilidad de nitrógeno orgánico en el suelo es un factor limitante que influye en la producción agrícola, a pesar de que cuatro quintas partes de la atmósfera está constituida por nitrógeno molecular. El uso de fertilizantes nitrogenados por la agricultura moderna presenta varios problemas, uno de ellos es el elevado costo de producción de estos compuestos, ya que su síntesis requiere de una gran cantidad de energía que es suministrada principalmente por derivados del petróleo. Por otro lado, los fertilizantes nitrogenados son solubles en agua, por lo que se lavan fácilmente del suelo y es necesario aplicarlos periódicamente a lo largo de la cosecha, con el consiguiente encarecimiento de la producción. Esta misma característica de solubilidad hace que estos compuestos contaminen el manto freático que posteriormente desemboca en ríos, mares y lagunas, favoreciendo de esta manera la sobrepoblación de microorganismos que desbalancean el equilibrio ecológico en estos ecosistemas, además de contaminar el agua para el consumo humano (Delwiche C.C., 1970; Delwiche C.C., 1981).

Una alternativa al uso de fertilizantes químicos consiste en aplicar organismos fijadores de nitrógeno al suelo, reduciendo así, o inclusive evitando, el uso de fertilizantes nitrogenados. El problema estriba en que el rendimiento de la cosecha suele ser mayor cuando se aplican fertilizantes químicos. Además, las cepas de microorganismos seleccionadas en laboratorio por su gran eficiencia de fijación de nitrógeno, suelen ser desplazadas por poblaciones autóctonas que están mejor adaptadas a las condiciones del suelo. La familia bacteriana Rhizobiaceae desarrolla

simbiosis con leguminosas, resultando en fijación biológica de nitrógeno. Actualmente, el modelo de simbiosis leguminosa-*Rhizobium* se estudia intensamente con el objetivo de entender y controlar adecuadamente en un futuro la fijación biológica de nitrógeno.

II. 1 La Simbiosis Rhizobiaceae-Leguminosa

Dentro de la gran variedad de microorganismos fijadores de nitrógeno, algunos miembros de la familia bacteriana Rhizobiaceae son de especial interés, ya que forman asociaciones simbióticas con plantas leguminosas, muchas de las cuales son de gran importancia económica. El amonio producido durante el proceso de fijación de nitrógeno es asimilado por la planta, mientras que la bacteria recibe fuentes de carbono producto de la fotosíntesis vegetal. Se ha calculado que la cantidad de N₂ incorporado al material orgánico que resulta de la simbiosis Rhizobiaceae-leguminosas, se aproxima a un tercio del total de nitrógeno requerido por la agricultura mundial, y es proporcional a la producción de fertilizantes nitrogenados producidos en un año (Economou y Downie, 1992).

Dentro de la familia Rhizobiaceae, existen cuatro géneros que desarrollan simbiosis con plantas leguminosas (*Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* y *Rhizobium*). Otros miembros, tales como *Agrobacterium*, son patógenos de una gran variedad de especies y su espectro de acción no se limita a las leguminosas (Young & Johnstone, 1989). Una singular simbiosis es la que ocurre entre la leguminosa acuática *Neptunia natans* y la bacteria arbitrariamente conocida como *Rhizobium sp. (Neptunia)*, debido a que fue aislada de nódulos de esta planta (Subba-Rao *et al.*, 1995). Hasta la fecha sólo se conoce una especie de planta no leguminosa (*Parasponia*) que es capaz de ser nodulada por *Rhizobium* (Dénarie *et al.*, 1992). El género *Rhizobium* incluye especies de crecimiento rápido y con espectros de nodulación que varían de limitados a moderadamente amplios. Los miembros del género *Azorhizobium* han sido menos estudiados, de crecimiento lento, con un espectro de nodulación limitado y son capaces de

formar nódulos no solo en las raíces de la planta sino también en los tallos (Elkan, 1984; Martínez *et al.*, 1990).

Una de las características más importantes de estas asociaciones simbióticas, es que son muy específicas, es decir, cada especie bacteriana es capaz de nodular a determinadas especies de plantas (Tabla 1). Así, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* es una bacteria capaz de establecer simbiosis con ciertas plantas del género *Trifolium*, pero es incapaz de nodular a otras leguminosas como *Phaseolus* o *Medicago*. Asimismo, *R. meliloti* nodula eficientemente a plantas de los géneros *Melilotus*, *Medicago* y *Trigonella*, pero no establece asociaciones compatibles con otros géneros de leguminosas.

La mayoría de las especies del género *Rhizobium* han sido clasificadas como bacterias noduladoras de espectro limitado. En contraste, las especies del género *Bradyrhizobium* suelen ser capaces de nodular a un mayor número de leguminosas, y se les ha clasificado como especies de amplio espectro de nodulación. Sin embargo, dentro del género *Rhizobium* también se encuentran especies con un amplio espectro de nodulación, como lo son: *R. tropici* o *Rhizobium* sp. NGR234. Esta última cepa es capaz de nodular a más de 70 especies distintas de leguminosas (Dénarié *et al.*, 1992).

El desarrollo de la simbiosis leguminosa-*Rhizobium* requiere de una interacción precisa entre el hospedero y el microbio. Un control recíproco por parte de los dos simbiotes permite que ocurra el proceso simbiótico de una manera regulada, resultando en un beneficio mutuo de la asociación. Al menos dos pasos de señalamiento molecular parecen estar implicados en la

Especies bacterianas	Plantas hospedadoras
<i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar <i>viciae</i>	<i>Vicia</i> (arveja), (guisante)*, <i>Lathyrus</i> , <i>Lens</i> (lenteja)
biovar <i>trifolii</i>	<i>Trifolium</i> (trébol)
biovar <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i> (frijol, judía)
<i>Rhizobium meliloti</i>	<i>Melilotus</i> , <i>Medicago</i> (alfalfa), <i>trigonella</i> *
<i>Rhizobium tropici</i>	<i>Phaseolus</i> (frijol), <i>Leucaena</i> (leucena), <i>Macroptilium</i> (siratro)
<i>Rhizobium etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> (frijol).
<i>Rhizobium loti</i>	<i>Lotus</i> , <i>Anthyllis</i>
<i>Rhizobium fredii</i>	<i>Glycine max</i> (soya), <i>Vigna</i> (cowpea)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Glycine</i> (soya), <i>Vigna</i> (cowpea)
<i>Bradyrhizobium sp.</i>	<i>Lupinus</i> (lupino), <i>Ornithopus</i>
<i>Rhizobium sp.</i> NGR234, MPIK1030	Plantas tropicales y no leguminosas como la ulmácea <i>Parasponia andersonii</i>
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>

* Las cepas de las mismas especies pueden nodular uno o varios de los hospedadores descritos.

Tabla 1. Relación de especies que comprenden los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*, así como los grupos de inoculación cruzada que presenta cada uno.

determinación de la nodulación específica del hospedero. En el primer paso, flavonoides producidos por la planta inducen la transcripción de una batería de genes bacterianos denominados genes *nod*, cuyos productos proteícos resultan de suma importancia para el inicio del desarrollo de la simbiosis (Carlson *et al.*, 1995).

La especificidad apropiada del hospedero también involucra a la proteína bacteriana NodD, que presumiblemente interactúa con los flavonoides. En el segundo paso, y como resultado de la expresión de los genes *nod*, la bacteria produce el llamado factor de nodulación (factor Nod), que es un morfógeno que activa distintos genes en la planta y además, provoca la deformación de los pelos radiculares, así como la inducción meristemática del nódulo (Kondorosi, 1989; Long, 1989), (Fig. 1).

Actualmente se conoce la naturaleza de distintos eventos involucrados en la fase inicial del proceso simbiótico. La bacteria presenta quimiotaxis hacia muchas sustancias exudadas por la raíz de la planta, incluyendo aminoácidos y carbohidratos, así como flavonoides (Peters & Verma, 1990; Hungria *et al.*, 1991; León-Barrios *et al.*, 1993). A pesar de que la quimiotaxis contribuye a la competitividad del rhizobia, este evento no es esencial para la nodulación, como tampoco es un factor que influye en la determinación de la especificidad del hospedero (Greck *et al.*, 1995; Dharmatilake & Bauer, 1992).

El proceso de adhesión de las células bacterianas ocurre en dos fases; inicialmente se unen débilmente a la raíz, y posteriormente, se genera una adhesión firme y se lleva a cabo la acumulación de bacterias en la punta del pelo radical. La primera fase del proceso de adhesión está mediada por una proteína de superficie bacteriana que une calcio, llamada ricadhesina. En la segunda fase de adhesión, intervienen fibrillas de celulosa sintetizadas por la bacteria. En la planta, se ha sugerido que intervienen lectinas específicas, las cuales son polipéptidos capaces de unir polisacáridos extracelulares de *Rhizobium* (VandenBosch *et al.*, 1994), aunque también se han reportado lectinas de *Rhizobium* que tienen cierta especificidad a

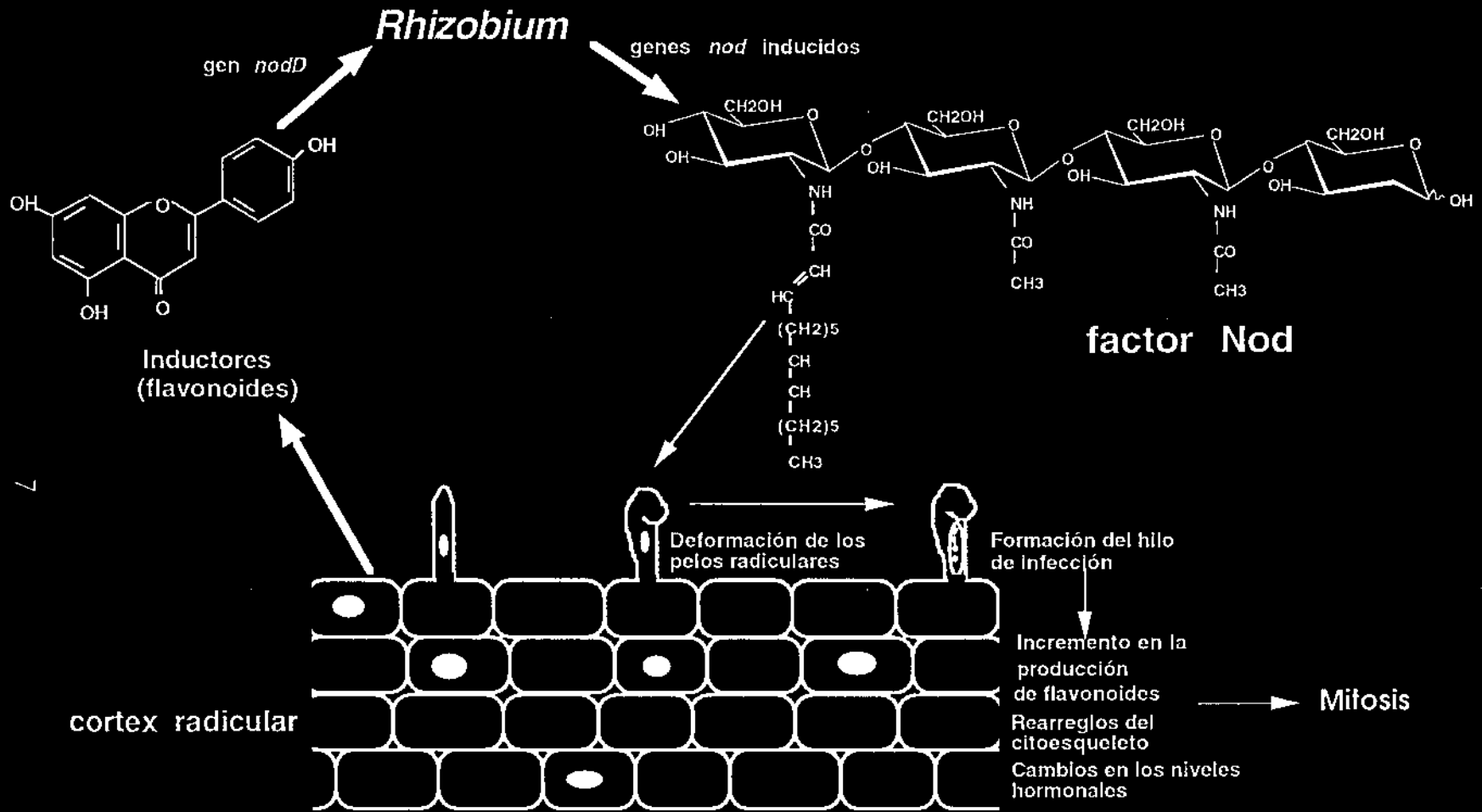


Figura 1. La raíz de la leguminosa secreta flavonoides que inducen la expresión de los genes *nod*. Los Rhizobium producen los factores Nod y estos elicitán la deformación de los pelos radiculares. Se incrementa el tipo y nivel de flavonoides en las células de la raíz, ocasionando cambios en la concentración de hormonas, Ca²⁺, rearrreglos en el citoesqueleto y expresión de genes involucrados en la división mitótica.

galactosa y a otros carbohidratos que se acumulan en la zona infectiva (Ho *et al.*, 1994; Wisniewski *et al.*, 1996). Se ha sugerido que las lectinas juegan un papel importante en la especificidad de la interacción, ya que cuando se ha introducido por transformación a células de trébol el gene que codifica para una lectina de guisante, estas raíces adquieren la capacidad de ser noduladas por *R. leguminosarum* bv. *viciae*, un huésped no usual en esta planta (Kijne, 1991).

La zona de pelos radiculares emergentes (indiferenciados), denominada zona infectiva, es la región donde preferencialmente se acumulan los factores Nod, y donde se concentran la mayoría de los efectos de los factores de nodulación (Heidstra *et al.*, 1994). Estos inducen una serie de cambios morfológicos, dirigidos probablemente por el citoesqueleto de la célula vegetal, que incluyen curvatura, deformación y ramificación de los pelos radiculares. Dichos cambios parecen ser un prerrequisito para que se produzca el posterior secuestro de la bacteria (Smit, *et al.*, 1987; Mylona *et al.*, 1995). Los pelos radiculares maduros (diferenciados) también responden a *Rhizobium* con una gran variedad de deformaciones, tales como englobamiento, alargamiento, bifurcaciones y enroscamiento, aunque normalmente no pueden ser infectados. Todas estas respuestas a *Rhizobium* son inducidas rápidamente, en un lapso entre 12 a 24 hrs, aunque existen experimentos en los que usando factores Nod purificados, se logran respuestas en las primeras horas de incubación (Heidstra *et al.*, 1994). En la actualidad, es bien conocido que esta serie de respuestas dependen de la participación de los genes *nod* bacterianos, los cuales son responsables de la síntesis del factor Nod.

Tras el enroscamiento del pelo radicular, se inicia propiamente el proceso de infección por la bacteria. La membrana vegetal sufre de una invaginación que da inicio a una estructura llamada hilo de infección. Por medio de éste, las células bacterianas penetran hasta el cortex vegetal, donde son liberadas al interior del citoplasma de algunas células corticales, además de ser cubiertas con una membrana de origen vegetal conocida

como membrana peribacteroidal (Economou & Downie, 1992). A lo largo de la formación del hilo de infección y en la liberación de las células bacterianas dentro de las células del cortex, los exopolisacáridos de *Rhizobium* juegan un papel fundamental (Leigh & Walker, 1994), ya que mutantes *exo*⁻ de distintas especies de *Rhizobium*, son incapaces de formar nódulos efectivos (Milner *et al.*, 1992). Probablemente, los exopolisacáridos extracelulares de la bacteria enmascaran a *Rhizobium*, lo que les permitiría escapar al sistema de defensa de la planta. Sin embargo, la infección exitosa es un evento poco frecuente, sólo una pequeña cantidad de pelos radiculares llegan a ser infectados. No todas las infecciones culminan con la formación de nódulos (Dart, 1977), muchos hilos de infección son abortados cerca de la base del pelo radicular, mientras que otros cesan en la base del pelo, o inclusive en el córtex. Tanto la infección como las abortaciones van acompañadas de una reacción hipersensible que podría estar formando parte del mecanismo por medio del cual la planta controla las infecciones y regula la nodulación (McKhann & Hirsch., 1994).

Simultáneamente a la formación del hilo de infección, las células del cortex se dividen y forman un primordio del nódulo, que más adelante dará lugar al nódulo maduro. El nódulo es un órgano nuevo de la planta que tiene una estructura perfectamente definida (Vasse *et al.*, 1990; Hirsch *et al.*, 1992). Durante la diferenciación del nódulo se activan un grupo de genes específicos tanto en el meristemo del nódulo como en la corteza que lo rodea, a los cuales se les ha dado el nombre de nodulinas (Legocki & Verma, 1980). La expresión de algunas nodulinas no sólo se restringe a la diferenciación del nódulo, ya que también se han detectado en otros órganos en donde se encuentran participando en papeles similares a los llevados a cabo en el órgano simbiótico.

Tomando en cuenta los patrones de expresión y la función que ejercen, las nodulinas se han dividido en dos tipos: nodulinas tempranas y nodulinas tardías (Verma *et al.*, 1992; Sánchez *et al.*, 1991; Nap & Bisseling, 1990).

Los nodulinas que se expresan antes del inicio de la fijación de nitrógeno

se conocen como nodulinas tempranas (*Enod*). Se cree que las nodulinas tempranas participan en las etapas iniciales de la interacción entre la bacteria y la planta (deformación de pelos radiculares, formación de hilos de infección), así como en la morfogénesis del nódulo (división de las células corticales, formación del primordio y el establecimiento del meristemo). Ejemplos de nodulinas tempranas son: *MsENOD12* de *M. sativa* (la cual no es indispensable para la formación del nódulo) (Csanádi *et al.*, 1994). *ENOD12*, también se detectó en *V. sativa*, así como también *VsENOD5* y *VsENOD40* (Vijn *et al.*, 1995), las cuales son activas en los primordios nodulares inducidos por *Rhizobium*.

Los genes de la planta que se expresan justo antes y/o durante la fijación de nitrógeno son llamados nodulinas tardías. Estos genes se encuentran implicados principalmente en las diferentes actividades metabólicas necesarias para el funcionamiento del nódulo. Varios ejemplos de nodulinas tardías se encuentran en *Phaseolus vulgaris*, donde se ha detectado la existencia de una glutamino sintetasa nódulo específica, la cual juega un papel crucial en la asimilación de amonio en los nódulos (Sánchez *et al.* 1987). Otra es la nodulina Npv30, cuyo nivel de transcripción es muy abundante, aunque al parecer la vida media de la proteína que codifica es muy corta, ya que fué inmunolocalizada en el citoplasma de células infectas con una señal muy débil; la función exacta de la Npv30 se desconoce hasta el momento (Carsolio *et al.*, 1994; Campos *et al.*, 1995). La nodulina tardía conocida como uricasa II también se ha estudiado en frijol. La uricasa II participa en el metabolismo nitrogenado de la planta, particularmente en la síntesis de ureidos a partir de ácido úrico. Se localiza preferentemente en los peroxisomas de células no infectadas del nódulo (Nguyen *et al.*, 1985), y constituye aproximadamente el 2% de la proteína total soluble del nódulo (Sánchez *et al.*, 1987). Durante la simbiosis se produce un aumento de unas 100-130 veces en los niveles de ARNm, proteína y actividad uricasa, aunque se ha visto que esta proteína también participa durante el desarrollo de la plántula. Estos son sólo unos cuantos ejemplos de los muchos reportes donde

caracterizan nuevas nodulinas tardías. Sin embargo, la función exacta de la mayoría de ellas se desconoce hasta el momento.

Una vez dentro de la membrana peribacteroidal, las bacterias se diferencian a bacteroides y se dá paso a la fijación del nitrógeno. El nódulo maduro contienen haces vasculares y dos tipos de células: infectadas (aquellas que contienen a los bacteroides), y no infectadas, cuyo papel consiste en metabolizar el amonio que se produce en la fijación del nitrógeno, además de aportar fuentes de carbono a los bacteroides. El amonio producido por los bacteroides es exportado a las células no infectadas donde se convierte en glutamina, que a su vez es utilizada para la síntesis de ureídos o amidas. Finalmente, estos compuestos son transportados hacia el resto de los tejidos vegetales.

Por otro lado, la planta determina el tipo de nódulos que formará, así como también la forma y el tamaño de los mismos. Basándose en la presencia o ausencia de un meristemo permanente, los nódulos se clasifican en dos tipos: indeterminados y determinados, respectivamente.

Los nódulos indeterminados se forman en leguminosas de zonas templadas, como es el caso de chícharo, alfalfa y arveja, las cuales presentan meristemas permanentes de nódulo. El meristemo de este tipo de nódulos consta de un grupo de células en división en el extremo distal del mismo, y las células derivadas pueden diferenciarse en otros tipos celulares o bien permanecer como parte del meristemo. La continua producción de células en el extremo distal provoca la formación de nódulos alargados y en forma de garrote. Los nódulos contienen diferentes zonas que representan los estados del desarrollo del nódulo, a saber: (1) el meristemo, (2) la zona de invasión, que consiste de numerosos hilos de infección y de células recientemente infectadas, (3) la zona simbiótica temprana, donde las células infectadas están empaquetadas apretadamente con bacteroides que son la forma de *Rhizobium* fijadora de nitrógeno, (4) La zona simbiótica tardía, que tiene un nivel decreciente en la actividad de fijación de nitrógeno, y (5) la zona de senescencia. Recientemente se ha añadido a la descripción

anterior una nueva zona, la interzona II-III, que se localiza entre las zonas simbióticas de invasión y la temprana, lugar donde se lleva a cabo la diferenciación de los bacteroides (Vasse *et al.*, 1990).

En los nódulos determinados, la actividad mitótica se detiene durante el desarrollo del nódulo. El incremento en el tamaño del nódulo se debe, principalmente, al agrandamiento celular, lo que resulta en un nódulo con forma esférica. El tejido central consiste en la zona fijadora de nitrógeno. Los nódulos determinados se presentan generalmente en leguminosas tropicales, por ejemplo, en soya (*Glycine max*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), o en *Lotus*. En *Sesbania rostrata*, una peculiar leguminosa tropical, los nódulos se localizan tanto en raíz como en el tallo. Los nódulos radiculares parecen intermedios entre los tipos determinados e indeterminados, ya que los nódulos fijadores de nitrógeno mantienen la actividad meristemática durante un corto tiempo (Ndoye *et al.*, 1994).

II.2 LOS GENES *nod* Y LA SÍNTESIS DE LIPO-OLIGOSACÁRIDOS

Los llamados genes de nodulación (genes *nod* y *nol*) son genes bacterianos involucrados en los eventos tempranos del proceso de infección y de nodulación. Estos genes están regulados por compuestos derivados de la planta a través de la proteína NodD (Rossen *et al.*, 1985; Djordjevic *et al.*, 1987; Horvath *et al.*, 1987).

En el género *Rhizobium* la mayoría de los genes de nodulación, fijación de nitrógeno y otras funciones simbióticas, se encuentran localizados en un megaplásmido denominado plásmido simbiótico (pSym), aunque también existen otros *loci* simbióticos en el cromosoma o en otros plásmidos (Johnston *et al.*, 1978; Nuti *et al.*, 1979; Toro & Olivares, 1986). En contraste, en los géneros *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* los genes simbióticos están ubicados en el cromosoma (Van Den Eede *et al.*, 1987).

En la figura 2 se muestra la organización genética de muchos de los genes de nodulación descritos hasta ahora para varias especies de rizobios. Estos genes están organizados en distintas unidades

transcripcionales que comparten una secuencia consenso, corriente arriba, que se conoce como caja de nodulación (*nod box*), a través de la cual se lleva a cabo su regulación.

Los genes de nodulación están involucrados en la síntesis y en el transporte de lipo-oligosacáridos (factores Nod), que son moléculas reconocidas por la planta y que disparan la organogénesis del nódulo. En algunos casos, en plantas estériles de alfalfa, se ha podido inducir la formación de un nódulo completo con sólo añadir estos compuestos a muy bajas concentraciones (Lerouge *et al.*, 1990). La estructura básica de estos compuestos consta de varias unidades de N-acetil-glucosamina (de 3 a 5) unidas por enlaces β -1-4 y N-aciladas en el extremo no reductor del azúcar (Figura 3 y Tabla 2). Ya que la producción de estos compuestos es *nodABC*-dependiente y dado que este grupo de genes ha sido identificado en todos los rizobios estudiados, se sugiere que el mecanismo que induce la formación del nódulo es similar en todas las especies, y que se media a través de compuestos que pertenecen a la misma familia química, es decir, a los lipo-oligosacáridos.

Estudios en varias especies distintas y poco relacionadas genéticamente como *Rhizobium sp.* NGR234, *R. tropici*, *B. japonicum*, *Rhizobium loti*, *Rhizobium etli*, y *A. caulinodans*, han demostrado que todas estas especies producen lipo-oligosacáridos con la estructura básica antes mencionada (Fig. 3 y tabla 2) (Price *et al.*, 1992; San Juan *et al.*, 1992; Mergaet *et al.*, 1993; Poupot *et al.*, 1993, Cárdenas *et al.*, 1995; Folch-Mallol *et al.*, 1996, López-Lara *et al.*, 1995). Sin embargo, existen algunas diferencias químicas entre estos compuestos dependiendo de la especie de la cual provengan, lo que apunta a un segundo mecanismo para la especificidad de la simbiosis. Así, los factores de nodulación de *R. meliloti* y *R. tropici* están O-sulfatados, mientras que los de *R. leguminosarum* no lo están. Por otro lado, los lipo-oligosacáridos de esta última especie presentan un lípido altamente insaturado que no se ha encontrado en otras especies. De esta manera, la metilación en el extremo no reductor de los factores de nodulación de *R. etli*,

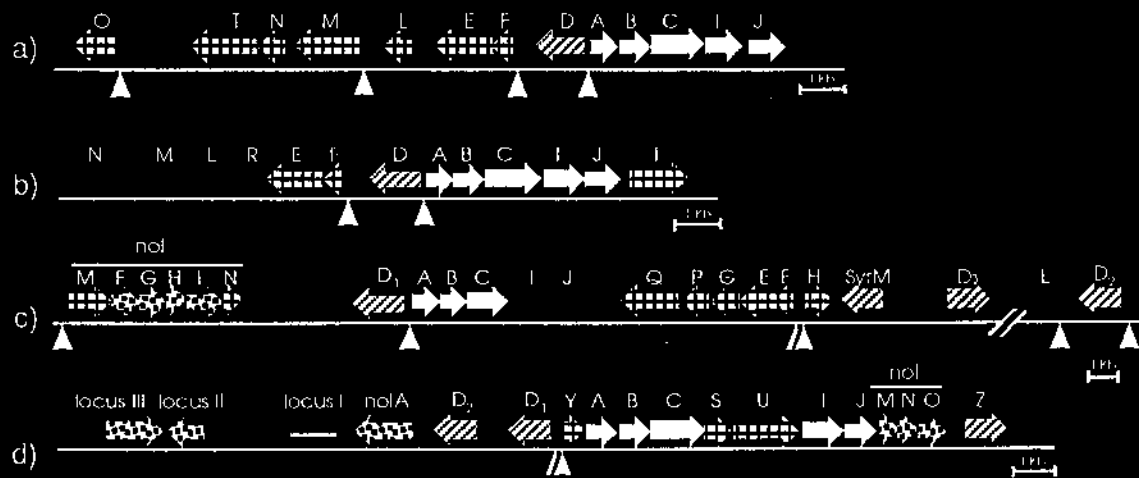
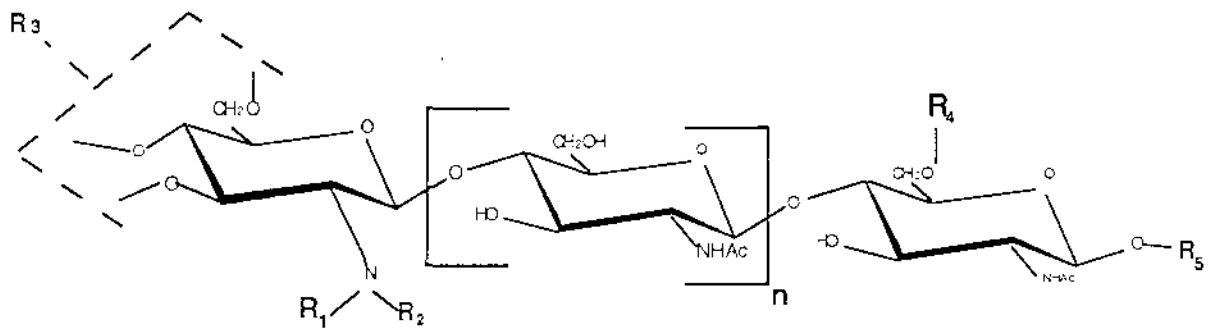


Fig. 2. Organización genética de los genes *nod* en *R. leguminosarum* bv. *viciae* (a), *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (b), *R. meliloti* (c), y *B. japonicum* (d). Los genes se presentan como flechas que apuntan hacia la dirección de su transcripción.



R. sp. NGR234, *R. tropici*, *A. caulinodans* y en algunas cepas de *B. japonicum*, se encuentra ausente en los factores Nod producidos por *R. meliloti*, *R. fredii*, y en todas las biovariedades de *R. leguminosarum*. En la tabla 2 se muestran las diferentes substituciones que presentan varios lipo-oligosáridos provenientes de distintas especies de rhizobios.

La actividad biológica de estas moléculas ha sido estudiada con cierto detalle en algunas especies de *Rhizobium*, especialmente en *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *R. etli*, *R. sp. NGR234* y en *R. meliloti*. La adición de factores de nodulación purificados a raíces de leguminosas provoca una serie de respuestas ontogénicas en distintos grupos de células de raíz. A concentraciones pico o nanomolares, estos compuestos inducen deformación, ramificación y curvatura de los pelos radiculares (Lerouge *et al.*, 1990; Roche *et al.*, 1991; Spink *et al.*, 1991, Relic *et al.*, 1993). Cuando se añaden factores de *R. leguminosarum* bv. *viciae* a raíces de *Vicia sativa*, en las células del cortex externo y medio se observa la formación de unas estructuras citoplásmicas alineadas radialmente que se han propuesto como precursores de los hilos de infección (van Brussel *et al.*, 1992). Mientras que, en el cortex interno, estos factores disparan la mitosis a tal grado que comienza a notarse un abultamiento en la raíz (Truchet *et al.*, 1991; van Brussel *et al.*, 1992). Cuando los factores de *R. meliloti* se añaden a raíces de alfalfa, se ha observado la formación de meristemas que dan lugar a nódulos con idéntica anatomía y ontogenia que aquellos inducidos por la bacteria. Estos nódulos están vacíos y por lo tanto no fijan nitrógeno (Truchet *et al.*, 1991). En otros sistemas como *Sesbania* o *Phaseolus* se han podido observar estructuras muy similares a verdaderos nódulos cuando se añaden los factores producidos por especies compatibles (Mergaert *et al.*, 1993, Cárdenas *et al.*, 1995). En los casos antes mencionados, los datos indican que la simple adición de estos compuestos induce parte de los cambios provocados durante el desarrollo de la relación simbiótica, y asimismo, sugieren que las plantas contienen la información genética necesaria para el desarrollo del nódulo.



Especies	R1	R2	R3	R4	R5	n	Ref
<i>R. meliloti</i>	H	C16:2	Ac(O-6) H	Sulfato	H	1,2,3	Lerouge <i>et al.</i> 1990 Roche <i>et al.</i> 1991 Schultze <i>et al.</i> 1992
<i>R. leg. bv. viciae</i>	H	C16:3 C18:4 C18:1	Ac(O-6)	H Ac(O-6)	H	2,3	Spaink <i>et al.</i> 1991
<i>B. japonicum</i>	H	C18:1 C16:0 C16:1	Ac(O-6) H	MeFuc	H	3	Carlson <i>et al.</i> 1993 Sanjuan <i>et al.</i> 1992
<i>B. elkanii</i>	H Me	C18:1	Ac(O-6) H Cb	MeFuc Fuc	H Gro	2,3	Carlson <i>et al.</i> 1993
NGR 234	Me	C18:1 C16:0	Ac(O-6) H Cb (1,2)	MeFuc AcMeFuc MeFucS	H	3	Price <i>et al.</i> 1992
<i>A. caulinodans</i>	Me	C18:1 C18:0	Ac(O-6) Cb	D-Ara H	H	2,3	Mergaert <i>et al.</i> 1993
<i>R. tropici</i>	Me	C18:1	H	Sulfato	H	3	Poupot <i>et al.</i> 1993
<i>R. fredii</i>	H	C18:1	H	MeFuc Fuc	H	1,2,3	Bec-Ferte <i>et al.</i> 1994

FIGURA 3 y Tabla 2. Los tipos de grupos sustituyentes han sido reportados en varios Factores Nod, en diferentes especies. Me= metil, C16:0 = ácido palmítico, C18:1 = ácido vaccénico, etc.; Ac = acetil; Fuc = fucosa; MeFu = 2-O-metilfucosa; Ara = Arabinosa; Gro = glicerol; Cb = carbamil; S = sulfato.

Haciendo uso de factores de nodulación modificados químicamente o por técnicas de ingeniería genética, se han montado ensayos para relacionar la estructura química de estos compuestos con su actividad biológica. Spaink y colaboradores (1991) han demostrado que ningún oligómero de quitina es activo biológicamente, señalando así que la presencia del lípido en los factores de nodulación es indispensable para su actividad biológica. También se ha indicado que la estructura del lípido juega un papel importante, ya que si existe alguna modificación en la hidrogenación del ácido graso, la actividad biológica de los factores Nod de *R. meliloti* disminuye considerablemente (Truchet *et al.*, 1991; Bloemberg *et al.*, 1995).

Por otro lado, las O-substituciones en el lipo-oligosacárido juegan también un papel determinante en la actividad biológica. En *R. meliloti* el grupo sulfato es esencial para la actividad del factor; por otro lado, si está ausente el grupo O-acetilo en los factores de *R. meliloti* y de *R. leguminosarum* bv. *viciae* estos muestran una actividad muy reducida (Spaink *et al.*, 1991; Truchet *et al.*, 1991).

Otro factor importante en la actividad biológica de estos compuestos es la longitud del esqueleto de quitina, ya que se ha observado que dentro de los factores producidos por *R. meliloti*, el tetrámero es más activo que los trímeros o los pentámeros (Shultze *et al.*, 1992).

Actualmente se están llevando a cabo estudios para determinar el mecanismo biológico por medio del cual estos factores ejercen su actividad en la planta. Dado que la concentración a la cual actúan los lipo-oligosacáridos es extremadamente baja, se postula la existencia de receptores de alta afinidad en la planta. La evidencia de que existen distintos requerimientos estructurales del factor para distintas respuestas en la planta, también hace pensar en que existan varios tipos de receptores con diferentes afinidades para distintas partes del lipo-oligosacáridos y/o distinta localización celular. Sin embargo, fué reportada la caracterización de un sitio de unión para el factor de nodulación mayoritario que produce *R. meliloti*:

NodRm-IV(Ac, S, C16:12). Dicho factor, además de ser biológicamente activo, se une de manera saturable y reversible a una fracción de raíces de *M. truncatula*, presentando una afinidad (K_d) de 86nM. Las características de este sitio de unión, son consistentes con un sitio de unión de clase individual. La ausencia de los grupos sulfato y acetilo reducen la afinidad por este sitio de unión, sin embargo, cuando sólo uno de estos substituyentes está ausente, la afinidad no se modifica de manera importante (Bono *et al.*, 1995). En raíces de tomate también se encontró un sitio de unión con características semejantes (Baureithel *et al.*, 1994). Por lo anterior, estos sitios de unión a los factores de nodulación (llamados NFBS1), presentes en leguminosas y otras plantas, podrían tener un papel más general, y no únicamente restringidos a participar en la simbiosis. No se ha determinado si estos receptores están localizados en la membrana plasmática o en algún otro compartimento celular. Recientemente, se ha obtenido la síntesis química completa del factor mayoritario de *R. meliloti* (Nicolau *et al.*, 1992), lo cual ofrece la posibilidad de la síntesis de factores radioactivos o fotoactivos que permitan su seguimiento dentro de la raíz para lograr la identificación de receptores y sus genes.

La vía de transducción de la señal provocada por los factores de nodulación también se encuentra bajo estudio. Ehrhardt y colaboradores (1992), han encontrado un sistema de ensayo mediante el cual se puede detectar una depolarización del potencial de membrana en los pelos radiculares de alfalfa cuando se añaden factores puros de *R. meliloti*. Esto permitirá el uso de metodologías electrofisiológicas en el estudio de la transducción de la señal provocada por los factores de nodulación.

Por último, se está explorando la posibilidad de que los lipo-oligosacáridos producidos por *Rhizobium* sean en realidad una mímica de las señales endógenas de la planta. Existen varias evidencias para considerar esta posibilidad, en primer lugar, pese a que los géneros *Rhizobium*, *Azorhizobium* y *Bradyrhizobium* son genéticamente lejanos, todas las especies analizadas producen factores de nodulación similares; en segundo

lugar, el hecho de que los genes *nodABC* sean requeridos para nodular a la planta ulmácea *Parasponia*, indica que los lipo-oligosacáridos son capaces de inducir respuestas en plantas no leguminosas, lo que sugiere un mecanismo más general en el desarrollo ontogénico; y por último, recientemente se ha podido complementar una mutación que afecta el desarrollo ontogénico de una línea celular de zanahoria (que tampoco es leguminosa), mediante la adición de factores de nodulación puros (deJong *et al.*, 1993).

II.3 LA FUNCIÓN DE LOS GENES DE NODULACIÓN

Los genes de nodulación han sido clasificados en tres grupos. El primer grupo se compone por la familia de genes regulatorios *nodD*, de los cuales existen varios alelos y algunas cepas tienen múltiples copias de ellos. El segundo grupo se encuentra constituido por la familia de genes *nod* comunes, que se han denominado así porque son funcionalmente intercambiables entre distintas especies de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*. Aunque como se verá más adelante, reportes recientes sugieren la necesidad de reconsiderar ésta nomenclatura de “*nod* comunes” para los genes *nodA* y *nodC*, ya que no necesariamente tienen la misma especificidad cuando reemplazan al mismo gen de otra especie de *Rhizobium* (Ritsema *et al.*, 1996; Debelle *et al.*, 1996). Finalmente, en el tercer grupo encontramos a los genes *nod* específicos (o genes *hsn*), cuya función determina la especificidad de la simbiosis al nivel de la producción de factores Nod (Kondorosi *et al.*, 1984).

II.3.1 EL GEN *nodD* Y LA REGULACIÓN DE LOS GENES *nod*

La inducción de los genes de nodulación requiere de (1) flavonoides excretados por la planta hospedera, (2) las proteínas NodD (activadoras transcripcionales), y (3) la caja *nod* (elemento regulatorio al que se une NodD en *cis*).

El gen *nodD* se ha encontrado en todos los rizobios (*Rhizobium*,

Sinorhizobium, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*) estudiados hasta la fecha. En algunas cepas de *Rhizobium* el gen *nodD* se encuentra en una sola copia, mientras que en otras se han encontrado hasta cuatro copias (Rodríguez Quiñones *et al.*, 1987; Sousa., 1993). Por otro lado, en *R. meliloti* existe una proteína conocida como SyrM, que muestra homología con el producto del gen *nodD* y está involucrada en la regulación de su transcripción. (Long *et al.*, 1989). La proteína NodD es el activador transcripcional de los genes *nod* y *nol*, y muestra diferentes afinidades por flavonoides, dependiendo de la especie de la cual provenga (Rossen *et al.*, 1985; Spaink *et al.*, 1987; van Rhijn *et al.*, 1993; van Rhijn *et al.*, 1994; Sousa *et al.*, 1993). Por lo general, los inductores de *Rhizobium* son flavonas y flavanonas, mientras que para *Bradyrhizobium* son isoflavonas. Para cada especie o biovariedad de rhizobio existe un grupo de flavonoides que determinan una tasa óptima de activación transcripcional. Al parecer esta especificidad depende únicamente del tipo o tipos de proteína NodD presente en la bacteria. Sólo cuando la proteína NodD interactúa con flavonoides cumple su función como activador transcripcional. Esta característica de NodD hace que juegue un papel determinante en la especificidad de la simbiosis, ya que diferentes plantas excretan distintas combinaciones de flavonoides, y sólo aquella proteína NodD que reconozca a estas moléculas podrá activar la transcripción de los genes de nodulación y, de esta manera, capacitar a la bacteria para la nodulación del hospedero (Gyögyfal *et al.*, 1988; Spaink *et al.*, 1989). Por otro lado, también se ha demostrado que algunos flavonoides pueden actuar como inhibidores de la función de NodD. Esta primera barrera de especificidad se ha demostrado al introducir distintos genes *nodD* a cepas heterólogas de modo que su espectro de nodulación se ve alterado. Por ejemplo, si el gen *nodD* de *R. tropici* es introducido a *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, este adquiere la capacidad de nodular plantas de *Phaseolus* (Sousa *et al.*, 1993). Sin embargo, existen experimentos similares en donde no se ha logrado extender el espectro de nodulación de la cepa receptora, indicando así que el reconocimiento a flavonoides por NodD no es la única

barrera en la especificidad. Una explicación para este fenómeno es que la planta no sea capaz de reconocer a los factores de nodulación de la cepa en cuestión, aunque esta los produzca bajo la inducción de la proteína NodD heteróloga.

La proteína NodD presenta homología con miembros de la familia de reguladores bacterianos LysR. En su región amino terminal se encuentra un dominio de unión a DNA y una secuencia llamada módulo receptor que se ha propuesto como un dominio de interacción proteína-proteína. El extremo carboxilo terminal no está tan conservado entre las diferentes especies de *Rhizobium*, por lo que se ha postulado que esta región de la proteína es la encargada de reconocer a los flavonoides. Sin embargo, existen evidencias de que NodD no actúa como dos dominios separados, sino que es la estructura terciaria global de la cual depende su actividad (Spaink *et al.*, 1989; Sousa *et al.*, 1993). Lo anterior se refuerza con los datos obtenidos a partir de mutantes de *nodD* (mutantes *nodD* FITA, por Flavonoid Independent Transcription Activation) que han perdido la regulación por flavonoides y activan constitutivamente la transcripción de los genes *nod* y *nol*. Algunas de estas mutaciones se encuentran en el extremo carboxilo terminal, favoreciendo la hipótesis de que es en este dominio donde interactúa con el flavonoide.

La transcripción de *nodD* generalmente es constitutiva, aunque existen diferentes factores que intervienen en su regulación. Dentro de estos factores se encuentran: (1) los niveles de nitrógeno combinado, ya que en algunos promotores de *nodD* existen secuencias que son reconocidas por NtrC (proteína reguladora de la expresión de los genes de asimilación de nitrógeno), (2) algunos compuestos exudados por la planta e inclusive (3) algunas proteínas regulatorias del sistema como es el caso de NodR (una proteína represora de genes *nod* encontrada en *R. meliloti*), SyrM y la proteína NodD, que en algunos sistemas es una proteína autoregulatoria (Cren *et al.*, 1995; Rossen *et al.*, 1985; Horvath *et al.*, 1987; Banfalvi *et al.*, 1988; Dusha *et al.*, 1989; Kondorosi *et al.*, 1989; Davis & Johnston, 1990; Maillet *et al.*,

1990). La regulación de *nodD* no está totalmente esclarecida, aunque se sabe que se lleva a cabo por un sistema complejo. Por ejemplo, en mutantes en *groEL* (una "chaperona" molecular) de *R. meliloti*, la expresión de *nodD3* se reprime, mientras que la de *nodD1* y *nodD2* disminuye. Por otro lado, también existe regulación cruzada entre diferentes alelos de *nodD*. En *R. meliloti*, *nodD3* se induce por *SyrM* y, simultáneamente, la proteína NodD3 induce la transcripción de *syrM* en un circuito de auto-alimentación positiva. Tanto *nodD3* como *syrM* se autoregulan positivamente y NodD1 regula positivamente a *nodD3* en presencia de flavonoides que lo activen (Maillet *et al.*, 1990; Kondorosi *et al.*, 1991). NodD de *R. leguminosarum* bv. *viciae* y NodD2 de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* reprimen su propia transcripción (Davis y Johnston, 1990). Hasta el momento, el gen *syrM* sólo ha sido identificado en *R. meliloti* (Kondorosi *et al.*, 1991; Barnett *et al.*, 1990) y más recientemente en *R. l.* bv. *phaseoli* (Michiels *et al.*, 1993). Este conjunto de datos indica que probablemente varias proteínas participen en el proceso de activación de los genes *nod*.

La gran mayoría de los operones *nod* tienen una secuencia conservada de aproximadamente cincuenta pares de bases llamada caja de nodulación que se sitúa corriente arriba del inicio de la transcripción de varios genes *nod* (Figuras 2 y 4). Es en esta secuencia donde se une la proteína NodD para activar la transcripción. Estudios recientes (Long *et al.*, 1993), han demostrado que la proteína NodD se une sólo a un lado de la doble hélice de DNA y provoca que ésta se doble sobre sí misma, de manera similar a la acción de la proteína reguladora bacteriana llamada IHF (Integration Host Factor), que está involucrada en la regulación de operones *nif* (Kustu *et al.*, 1992). Aún no está claro si la proteína NodD actúa como monómero o como multímero para activar la transcripción, pero la presencia del módulo receptor en su estructura hace pensar que interacciona con otras proteínas o con otras moléculas de NodD para ejercer su función. A este respecto, se ha encontrado en todas las cajas de nodulación estudiadas una estructura que favorece la hipótesis de que NodD se une a ella. Estudios de

deleción en las cajas de nodulación también favorecen este modelo (Long *et al.*, 1993). Al parecer existen dos pares de tripletes importantes para la unión de NodD en la caja de nodulación. Estos tripletes muestran una simetría en cuanto que son tres pares de bases complementarias invertidas, lo que explicaría como la proteína NodD dobla al DNA al unirse a ellas. Se ha mencionado anteriormente que sólo cuando NodD interacciona con flavonoides es capaz de activar la transcripción de los operones *nod* y *nodI*, aunque no se ha demostrado una interacción directa entre NodD y los flavonoides. Por otro lado, algunos estudios han demostrado que NodD es capaz de unirse a las cajas de nodulación aún en ausencia de flavonoides, aunque la afinidad de esta unión es mucho mayor en presencia de estos compuestos (Schlaman *et al.*, 1992). Como la proteína NodD se ha localizado en la membrana plasmática de la bacteria, se postula que su interacción con flavonoides debe ocurrir en el espacio periplásmico. Estudios de transporte y acumulación del flavonoide naringenina en células de *R. leguminosarum* bv. *viciae* apoyan este modelo (Recourt, 1992; Schlaman *et al.*, 1992).

Los genes *nodVW* de *B. japonicum* son necesarios para la nodulación de "mung bean", "cowpea" y siratro (Göttfert *et al.*, 1990a). Tomando en cuenta los análisis de secuencia, probablemente NodV sea un sensor quinasa que responda a estímulos externos aún no identificados, mientras que NodW pudiera ser un regulador de respuesta. Se ha propuesto que ambos participan en la activación de la expresión de genes de especificidad aún desconocidos y que son requeridos para la nodulación de las plantas hospederas. Un candidato a ser regulado por NodVW es el gen *nodZ*, que se regula de manera independiente a NodD y además, es necesario para la eficiente nodulación de siratro (Stacey *et al.*, 1994). Estudios recientes indican que *nodW* es esencial para la inducción mediada por isoflavonas de los operones *nodYABC* y *nodD1* (San Juan *et al.*, 1994). Los datos de este trabajo sugieren un efecto sinérgico de NodD1 y NodW en la activación de los genes *nod*. Aún no está claro como interacciona NodW con el promotor *nod* y como participa en la regulación transcripcional mediada por NodD.

II.3.2 LOS GENES *NOD* COMUNES Y SU FUNCIÓN BIOQUÍMICA

Los genes *nodABCDEFGHIJ* se han denominado genes *nod* comunes y se han encontrado en todos los rhizobios estudiados a la fecha. Estos genes son funcionalmente intercambiables entre diversas especies de rhizobios y de ahí que se les haya denominado "comunes". Los genes *nodABC* son esenciales para el proceso de nodulación, ya que una mutación en cualquiera de ellos bloquea por completo este proceso. Por otro lado, mutaciones en los genes *nodIJ* sólo provocan un fenotipo de retraso en la nodulación. Este par de genes muestran homología con algunas proteínas bacterianas involucradas en el transporte transmembranal (Evans & Downie, 1986), por lo que se ha postulado que su papel es el de transportar los lipo-oligosacáridos fuera de la célula (Vázquez *et al.*, 1993). Sin embargo, es claro que debe existir otro sistema alternativo para el transporte de estos compuestos ya que las mutaciones en estos genes no bloquean la nodulación, además, se ha observado la presencia de lipo-oligosacáridos en sobrenadantes de células mutantes en *nodI* y *nodJ* de *R. etli* y *R. l. bv. viciae* (Cárdenas *et al.*, 1996; Spaink *et al.*, 1995).

Recientemente se ha esclarecido la función bioquímica de los productos de los genes *nodABC*. La proteína NodC muestra homología con quitina-sintasas (Fisher & Long, 1992), y se ha comprobado que su función es sintetizar al esqueleto de *N*-acetilglucosamina. La proteína producto del gen *nodB* está involucrada en desacetilar la molécula de *N*-acetilglucosamina en el extremo no reductor del esqueleto de quitina, de modo que en ésta posición pueda entrar después la molécula lipídica del factor de nodulación. La unión del grupo acilo al extremo no reductor del oligosacárido es llevada a cabo por la proteína NodA (Tabla 3). Recientemente, Ritsema y colaboradores (1996) propusieron que había que reanalizar el título de "común", al menos para *nodA*. Dicha propuesta se basa en el hecho de que en *R. l. bv. viciae*, la proteína NodA determina el tipo de ácido graso que va a unir al esqueleto del factor Nod, teniendo cierta especificidad por lípidos altamente insaturados. La importancia de este reporte estriba en que por

primera vez se demuestra que al menos *NodA* no es completamente común en todos los casos. Cuando intentan complementar una mutante en este gen, con un *nodA* heterólogo de *Bradyrhizobium sp.*, este gen complementa a la perfección para la función de *NodA*, es decir, la cepa mutante ahora es capaz de producir factores *Nod*, con la única diferencia de que la preferencia por la incorporación de lípidos poli-insaturados desaparece. (Ritsema *et al.*, 1996).

II.3.3 FUNCIÓN BIOQUÍMICA DE LOS GENES *nod* ESPECÍFICOS (*hsn*)

Los genes *nod* específicos (también llamados genes *hsn*) no se encuentran presentes en todas las especies de rizobios, en contraste con los genes *nod* comunes o el gen *nodD*. Mutaciones en estos genes o su introducción en especies heterólogas provocan un cambio en la especificidad del hospedador. Hasta la fecha, se han descrito un gran número de genes *nod* específicos pero se desconoce la función de muchos de ellos. Lo anterior se debe a que las mutantes obtenidas en estos genes presentan fenotipos poco claros; por ejemplo, existen muchas mutaciones distintas que sólo provocan retraso en la nodulación o bajo número de nódulos pero no bloquean por completo el proceso, sin embargo, en algunos casos se ha esclarecido perfectamente la función bioquímica de ciertos genes *nod* específicos.

En *R. meliloti* los determinantes de especificidad del hospedador más importantes son los genes *nodPQ* y *nodH*. Mutantes de *R. meliloti* en el gen *nodH* pierden la capacidad de nodular a su hospedador habitual, la alfalfa, pero adquieren la capacidad de nodular veza. Al analizar los lipo-oligosacáridos producidos por mutantes *nodH*⁻ se ha descubierto que estas cepas producen factores carentes del grupo sulfato. Estos factores no tienen actividad biológica en raíces de alfalfa pero sí en raíces de veza, de acuerdo al fenotipo observado (Roche *et al.*, 1991). Por otro lado, mutantes en los genes *nodPQ* producen una mezcla de lipo-oligosacáridos sulfatados

CONSTITUYENTE	PROTEINA Nod	PRODUCTO GENETICO	EVIDENCIA	FUNCION	REFERENCIA PARA LA FUNCION DE LA PROTEINA
N-Acetilglucosamina	NodM	Glucosamina Sintasa	Similitud en secuencia	Síntesis de glucosaminas	Baev et al. 1991
?	NodN	?	?	?	
N-Acetilglucosamina	NodO	UDP-Acetilglucosaminosil Transferasa	Similitud en secuencia a Citina Sintasa y Actividad Enzimática	Requerido para la nodulación	Atkinson et al. 1992 Debelie et al. 1992 Gerema et al. 1994
Acidos grasos (R1)	NodA	N-Ac transferasa	Actividad Enzimática	Requerido para la nodulación	Robig et al. 1994
Glucosamina terminal	NodB	N-Acetilasa	Actividad Enzimática	Requerido para la nodulación	Verh et al. 1993
Acidos grasos con insaturaciones múltiples (R1)	NodE	Enzima Conesante	Similitud en secuencia	Determinante de especificidad del huésped	Geiger et al. 1991
Acidos grasos con insaturaciones múltiples (R1)	NodF	Proteína Acarreadora de Grupos Acilo	Similitud en secuencia	Determinante de especificidad del huésped	Geiger et al. 1991
N-Metilglucosamina (R2)	NodS	S-Adenosil metionina metil Transferasa	Similitud en secuencia	Posible determinante del rango del huésped	Mergaert et al. 1993
O-Acetilglucosamina (R3)	NodL	O-Acetil transferasa	Actividad Enzimática	Determinante de especificidad del huésped, únicamente para <i>R. Leguminosarum</i>	Baev et al. 1992 Bosberg et al. 1994
O-Carbamilglucosamina (R3)	?	?	?	Posible determinante del rango del huésped	
Sulfato (R4)	NodP, NodQ	ATP Sulfatasa, APS Krasa	Similitud en secuencia y Actividad Enzimática	Determinante de especificidad del huésped	Schwedock et al. 1994
Sulfato (R4)	NodH	Sulfotransferasa	Similitud en secuencia	Determinante de especificidad del huésped	Roche et al. 1991
N-Acetilglucosamina O-6 acetil (R4)	NodX	Acetil Transferasa	Similitud en secuencia, su transferencia resulta en Factor con grupo acetilo	Determinante de especificidad del huésped	Finn et al. 1993
Metilucosa, Fucosa (R4)	NodZ	Fucosil Transferasa (?)	Factor Mutante carente del residuo fucosil	Determinante de especificidad del huésped	Stacey et al. 1994
O-Carbomil (R4)	NodJ	Carbomil transferasa	Factor Mutante carente del residuo carbomil	Posible determinante del rango del huésped	Jacobsen et al. 1995
Grupo metil sobre un residuo fucosil	?	?	?	?	
O-acetil sobre un residuo metilfucosil	?	?	?	?	
Sulfato sobre metilfucosil	?	?	?	Posible determinante del rango del huésped	
Gliceril (R5)	?	?	?	?	
.....	NodI, NodJ	Proteínas Transportadoras	Similitud en secuencia	Transporte del factor Nod a través de la membrana celular	Vázquez et al. 1993
.....	NodT	Proteínas Transportadoras	Similitud en secuencia	Transporte del factor Nod a través de la membrana celular	Fruta et al. 1995
.....	NodO	Hemolisina proteína de unión a Ca ²⁺	Similitud en secuencia	Proteína formadora de poros	Sutton et al. 1994

Tabla 3. Genes *nod* requeridos para la síntesis y el transporte del factor Nod.

y no sulfatados, y son capaces de nodular tanto a su h esped habitual como al hospedador heterólogo veza. Cabe hacer notar que en *R. meliloti* se han detectado homólogos cromosomales de los genes *nodPQ*, pero estudios con dobles mutantes han demostrado que las copias cromosomales son incapaces de complementar totalmente mutaciones en los genes del plásmido simbiótico. Estudios de secuencia indican que los genes *nodPQ* tienen homología con enzimas que sintetizan intermediarios activados de grupos sulfato, mientras que *nodH* presenta homología con sulfotransferasas bacterianas. Así, los productos de estos tres genes han sido propuestos como responsables de la sulfatación del factor de nodulación en *R. meliloti* (Roche *et al.*, 1991). De hecho, existe un reporte en la literatura donde se habla ya de la función bioquímica de los productos de los genes *nodP* y *nodQ*, demostrando que estas proteínas forman en conjunto un "complejo de activación de sulfatos", donde ambos, NodP y NodQ, tienen actividades de ATP sulforilasa y APS kinasa y se encuentran formando un complejo proteíco multifuncional que lleva a la síntesis de PAPS (donde PAPS es 3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato, un probable donador del grupo sulfato para el factor Nod)(Schwedock *et al.*, 1994). Por otro lado, la función bioquímica de NodH también ya fué esclarecida: NodH es una sulfotransferasa que cataliza la transferencia del grupo sulfato desde PAPS hasta la posición 6-O terminal de los factores Nod de *R. meliloti* (Schultze *et al.*, 1995; Ehrhardt *et al.*, 1995). Ambos reportes coinciden en que primero se debe llevar a cabo la síntesis del esqueleto del factor para que después se efectúe la sulfatación, aunque la previa acilación del factor no es un estricto requerimiento para la sulfatación. La presencia de los genes *nodH* y *nodPQ* también ha sido reportada para las cepas CIAT899 y CFN299 de *R. tropici* (Folch-Mallol *et al.*, 1996; Poupot *et al.*, 1995). Los resultados presentados por Folch-Mallol y colaboradores, demuestran que el grupo sulfato presente en los factores de nodulación silvestres de *R. tropici* CIAT899, juega un papel importante en la nodulación de plantas de *Leucaena*.

En *R. leguminosarum* bv. *viciae* los genes más importantes para la

especificidad de huesped son los genes *nodF* y *nodE*. Estos genes están localizados en un operón y son homólogos a una proteína transportadora de grupos acilo y a una cetoacil sintasa, respectivamente (Shearman *et al.*, 1986; Spaink *et al.*, 1989). Se ha demostrado que estas proteínas están involucradas en la síntesis del ácido graso poli-insaturado C18:4, presente en los factores Nod de *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Spaink *et al.*, 1995). Estos genes, en *R. meliloti*, sintetizan un ácido graso de 16 carbonos con 2 ó 3 insaturaciones, indicando así que diferentes alelos de *nodFE* pueden sintetizar distintos ácidos grasos dependiendo de la especie a la que pertenezcan (Shultze *et al.*, 1992; Demont *et al.*, 1993). Algunos estudios sugieren que estos ácidos grasos son sintetizados por la ruta de los fosfolípidos, puesto que se han identificado a algunos de ellos con las mismas insaturaciones que las presentes en los factores de nodulación (Geiger *et al.*, 1994). Sin embargo, los datos obtenidos por Philip-Hollingsworth en *R. l. bv. trifolii*, muestran que en esta especie no se presentan alteraciones en el espectro total de lipo-oligosacaridos producidos por mutantes en *nodE*, ni aún cuando sea incrementado el número de copias de este gen (Philip-Hollingsworth *et al.*, 1995). En *R. meliloti* se ha descrito otro gen involucrado en la síntesis del ácido graso: *nodG*. Este gen presenta homología con una alcoholdehidrogenasa y con una 3-oxoacil (proteína translocadora de acilos) reductasa (Fisher *et al.*, 1987; Sheldon *et al.*, 1990).

nodM es un gen específico que se ha encontrado en *R. meliloti*, en *R. leguminosarum* bv. *viciae* y en *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Presenta homología con la N-acetilglucosamina sintasa de *E. coli*, por lo que se ha propuesto la misma función en *Rhizobium*, esto es, el aportar una mayor cantidad de este precursor para la síntesis de los lipo-oligosacaridos, ya que está regulado por NodD. Mutaciones en este gen no alteran el fenotipo de nodulación ya que puede ser substituído por un homólogo cromosomal (Baev *et al.*, 1991; Baev *et al.*, 1992).

En los lipo-oligosacaridos producidos por *R. meliloti*, *R. leguminosarum* bv. *viciae* y *R. leguminosarum* bv. *trifolii* se ha encontrado la presencia de un

grupo O-acetilo en el extremo no reductor de la molécula (figura 3). Bloemberg *et al* (1992), mediante ensayos de actividad enzimática, demostraron que el producto del gen *nodL* es el responsable de la O-acetilación del oligómero de quitina. Aparentemente, el lípido presente en el factor de nodulación no es reconocido por esta enzima, ya que un factor de nodulación obtenido a partir de mutantes *nodL*⁻ de *R. meliloti* (y que por lo tanto no están O-acetilados pero contienen el ácido graso de 16 carbonos) es capaz de ser acetilado por NodL de *R. leguminosarum* bv. *viciae*.

Existe un gen específico en *R. leguminosarum* bv. *viciae* que no está presente en todas las cepas de esta especie y que aparentemente no interviene en la modificación directa del factor de nodulación. Este es el gen *nodO*, el cual presenta homología con una hemolisina de *E. coli* (Downie *et al.*, 1992), y es capaz de complementar la incapacidad de nodular veza de cepas mutantes de *nodFE* de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, aunque no está claro el por qué lo hace. Se ha demostrado que la proteína NodO purificada es capaz de formar canales transmembranales selectivos a cationes, los cuales son muy semejantes a los poros producidos por la hemolisina. Estos experimentos fueron llevados a cabo en un sistema de bicapas lipídicas que emula a la membrana plasmática vegetal. Por ello, a esta proteína se le ha adjudicado la función de permear el factor de nodulación a través de la membrana plasmática vegetal (Sutton *et al.*, 1994).

El gen *noIR*, descrito en *R. meliloti*, forma parte de la compleja maquinaria de regulación de los genes *nod* y *noI*. Se ha demostrado que el producto de este gen se une a la caja de nodulación actuando como represor de la transcripción de *nodD* (Schalaman, 1992).

En *Azorhizobium caulinodans*, se ha propuesto que la N-metilación de los factores Nod que produce esta especie se debe a la actividad del producto del gen *nodS* (Geelen *et al.*, 1993). *nodS* también está presente en *Rhizobium* sp. NGR234 (Lewin *et al.*, 1990), *B. japonicum* (Göttfert *et al.*, 1990 (b)) y en *R. fredii* (Krishnan *et al.*, 1992). Hemos reportado la secuencia completa del gen *nodS* identificada en *R. etli*, así como también un análisis filogenético de

todas las secuencias reportadas para *nodS* en las especies de *Rhizobium* antes mencionadas (Villalobos *et al.*, 1994). En la mayoría de las especies donde éste gen ha sido identificado, *nodS* se encuentra localizado dentro de un gran operón siempre inmediatamente corriente abajo de *nodC*. Sólo en *R. sp* NGR234 y en *R. fredii* *nodS* posee su propia caja de nodulación, aunque en el caso de *R. fredii* se sabe que su región promotora presenta una delección que le impide tener una adecuada transcripción.

Otros genes *nod* específicos no han sido profundamente estudiados y actualmente se desconoce su papel o se sabe muy poco acerca de él. Por ejemplo, el gen *nodX* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* está involucrado en la nodulación de un cultivar de chícharos (*Afganistan peas*) y presenta homología con el gen *exoZ*, involucrado en la síntesis de exopolisácaridos. De forma similar, el gen *noIA* de *B. japonicum* permite a las especies portadoras nodular ciertos cultivares de soya (Sadowsky *et al.*, 1991).

III ANTECEDENTES

III.1 CLASIFICACIÓN FILOGÉNICA DE *Rhizobium etli* Y DE *Rhizobium tropici*.

Rhizobium leguminosarum bv. *phaseoli* inicialmente había sido clasificado en dos tipos. Las cepas de tipo I fueron definidas tanto por la reiteración de los genes estructurales de la nitrogenasa como por presentar un espectro restringido de hospederos. En contraste, las cepas del tipo II se caracterizaron en base a la presencia de una sola copia de estos genes estructurales, además de contar con un amplio espectro de hospederos (Brom *et al.*, 1988). Posteriormente, se reclasificó a las cepas de tipo I como *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, y a las cepas de tipo II en *Rhizobium tropici*. A diferencia de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *R. tropici* tolera altas temperaturas y elevados niveles de acidez en los cultivos (Martínez-Romero *et al.*, 1991). En la actualidad, *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* esta reclasificada como *Rhizobium etli*, en base a un análisis de secuencia de sus RNA's ribosomales (Segovia *et al.*, 1993).

III.2 LOCALIZACIÓN Y REGULACIÓN DE *nodS*.

En nuestro grupo de trabajo estamos interesados en la relaciones simbióticas llevadas a cabo entre *Phaseolus vulgaris* y *Rhizobium etli* cepa CE3, y *R. tropici* CIAT899 y *P. vulgaris*. La organización estructural de los genes *nod* comunes en *R. etli* presenta la singularidad de que el gen *nodA* se encuentra separado, al menos, por 20kb de los genes *nodBC*. Cada una de estas unidades transcripcionales tienen su propia región promotora con su respectiva caja de nodulación (Vázquez *et al.*, 1991). Además, regulados por la misma región promotora de los genes *nodBC*, se localizaron los genes *nodIJ*, aproximadamente a 2Kb del final de *nodC*, lo que indica que se trata de un operón considerablemente grande (Vázquez *et al.*, 1993).

Recientemente se identificó un marco abierto de lectura inmediatamente hacia abajo del gen *nodC*, el cual presenta homología con el gen *nodS* de *Rhizobium* sp. NGR234 (Lewin *et al.*, 1990), *Bradyrhizobium*

japonicum (Göttfert et al., 1990), *Rhizobium fredii* (Krishnan et al., 1992) y *Azorhizobium caulinodans* (Geelen et al., 1993). Asimismo, se ha reportado la secuencia completa de *nodS* en *R. etli*, y hacia abajo de este la secuencia parcial de un marco abierto de lectura con homología a *nodU* de *R. sp.* NGR234 (Villalobos et al., 1994).

En *B. japonicum*, los genes *nodC* y *nodS* se encuentran sobrelapados por 71pb. Se han analizado de los extremos C-terminal de los productos de *nodC* en *B. japonicum*, *R. meliloti* (Török et al., 1984) y en *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Rossen et al., 1984). Estas proteínas están altamente conservadas hacia arriba del residuo de arginina codificada por los nucleótidos 45-47. Sin embargo, las proteínas codificadas por *nodC* en *R. meliloti* y de *R. leguminosarum* bv. *viciae* son más cortas que la proteína NodC de *B. japonicum*, ya que esta se extiende por otros 90 aminoácidos. La hipótesis que sugiere que el gen *nodS* inicia su traducción antes de la terminación del gen *nodC*, se apoya además por el hecho de que los primeros 24 aminoácidos de *nodS* codificados dentro de la región de sobrelape son similares en un 63% con respecto a la región N-terminal de la proteína NodS de *Rhizobium* sp. NGR234 (Göttfert et al., 1990).

Otra característica de *B. japonicum* es su composición y organización de los genes *nod* comunes, la cual es muy diferente a la reportada en otros sistemas. En *R. leguminosarum* bv. *viciae* y *trifolii*, así como en *R. meliloti*, los genes *nodABC* están seguidos directamente por los genes *nodIJ* (Long, 1989). En *B. japonicum*, los genes *nodABC* se encuentran precedidos por *nodY* (Banfalvi et al., 1988) y seguidos por *nodSUIJnoIMNO* (Göttfert et al., 1990). Por el contrario, tanto en *R. sp.* NGR234 como en *R. fredii*, los genes *nodSU* se encuentran alejados de los genes *nod* comunes y son regulados bajo su propio promotor. Los niveles de expresión de *nodSU* en *R. sp.* NGR234 son altos si se les compara con *R. etli*, *B. japonicum* o *A. caulinodans*. Curiosamente, éste no es el caso para el *nodS* de *R. fredii*, debido a que su región promotora presenta una deleción que le impide ser inducida por flavonoides (Krishnan et al., 1992).

III.3 FENOTIPO DE MUTANTES *nodS*⁻

Resulta interesante que cepas mutantes en *nodS* y *nodU* en *B. japonicum* no muestren alteraciones en su capacidad de nodular soja u otras plantas hospederas. Se ha sugerido que los genes *nodSU* en cepas silvestres de esta especie pudieran ser importantes para la nodulación de otras plantas hospederas desconocidas hasta ahora, o bien, estos pudieran participar en alguna función que sea necesaria sólo bajo ciertas condiciones naturales (Lewin *et al.*, 1990).

La cepa ORS571 de *A. caulinodans* nodula a la leguminosa tropical *S. rostrata*. El gene *Nod1* de la cepa ORS571 forma parte del operón conformado por los genes *nodABCSTUIJ*, que están organizados de manera similar a los genes *nod* en *B. japonicum* (Geelen *et al.*, 1993). En *A. caulinodans* ORS571, el fenotipo mostrado por mutantes *nodS*⁻ y *nodU*⁻ es una disminución en su capacidad de nodulación, evidenciada por la formación de un reducido número de nódulos sobre la raíz y tallo de *S. rostrata*, su huésped nativo.

Similarmente, la inoculación de una cepa *nodS*⁻ de *R. etli* sobre raíces de *P. vulgaris*, muestra un retraso en la aparición de nódulos, y una reducción en su número y tamaño (Villalobos, 1993). Aunque como se verá mas adelante, este fenotipo pudiera ser el resultado de un efecto polar sobre los genes *nodI* y *nodJ*, o bien un efecto sinérgico.

Pareciera ser que en los casos antes mencionados, *nodS* no tiene un papel importante en la determinación de la especificidad de hospederos, pero si participa de alguna manera en el control de la eficiencia de la nodulación.

Un caso especial es el del fenotipo mostrado por una cepa mutada en el gen *nodS* de *R. sp.* NGR234, donde es claro que la mutante deja de inducir nódulos en *Leucaena leucocephala*, una de sus más de 70 leguminosas hospederas. Además, el fenotipo observado por una cepa mutante *nodSU*⁻ sugiere que, en conjunto, ambos genes regulan la nodulación de *Desmodium intortum* y *Vigna unguiculata* (Lewin *et al.*, 1990).

III.4 INTENTOS POR COMPLEMENTAR MUTANTES *nodS*⁻

Experimentos de complementación de una cepa *nodS*⁻ de *R. sp.* NGR234 con el gen *nodS* silvestre de *B. japonicum* fracasaron, al igual que los intentos realizados por complementar una cepa mutante en *nodS* de *B. japonicum* con el gen *nodS* silvestre de *R. sp.* NGR234 (Lewin *et al.*, 1990; Göttfert *et al.*, 1990). En contraste, experimentos de complementación llevados a cabo en *R. fredii* cepa USDA257, demuestran que los genes *nodS* de *R. sp.* NGR234 son capaces de extender el espectro de huéspedes de *R. fredii*, permitiéndole nodular a las leguminosas tropicales *L. leucocephala* y *L. diversifolia*. En esta especie, el gen *nodS*, precedido por su caja *nod*, fué capaz de incluir a *L. leucocephala* dentro del rango de hospederos de *R. fredii* (Krishnan *et al.*, 1992).

III.5 FUNCIÓN BIOQUÍMICA DE NodS

En *A. caulinodans*, Geelen y colaboradores (1993) encontraron homología en NodS con secuencias consenso reportadas para proteínas con actividad de metiltransferasas. Usando cromatografía en capa fina y L-(metil-³H)metionina en ensayos *in vivo*, observaron que los lipooligosacáridos producidos por la cepa silvestre incorporaban la marca radioactiva, mientras que una cepa *nodS*⁻ dejaba de hacerlo. Estos datos sugieren que NodS pudiera ser una metiltransferasa que incorpora grupos metilo al factor de nodulación en esta especie.

III.6 PLANTEAMIENTO DEL PROYECTO DE TESIS

Resulta por demás interesante la participación de *nodS* de *R. sp.* NGR234 en la nodulación específica de *L. leucocephala*, aunado al hecho de que la introducción de este gen a *R. fredii* le provoca una alteración del espectro de hospederos, permitiéndole nodular eficientemente a *L. leucocephala* y *L. diversifolia*. Dentro de las especies de *Rhizobium* en donde un gen *nodS* ha sido descrito, sólo *R. sp.* NGR234 y *R. tropici* CIAT899 nodulan de manera natural a *Leucaena*.

Rhizobium tropici es una especie de amplio espectro de huéspedes, capaz de nodular a un gran número de leguminosas no relacionadas genéticamente entre sí. Entre los hospederos naturales más importantes de esta especie se cuentan plantas de importancia económica como son aquellas pertenecientes a los géneros *Phaseolus*, *Medicago*, *Leucaena* y *Macroptilium*. Actualmente, *R. tropici* se utiliza, en combinación con bacterias del género *Azospirillum* como inóculo para raíces de árboles de *Leucaena* como parte de un programa de reforestación de la selva baja caducifolia del estado de Morelos, México (J. Caballero, comunicación personal).

Las interrogantes planteadas son: ¿*R. tropici* tiene *nodS*? ¿La presencia de *nodS* en *R. tropici* CIAT899 influye en la determinación de espectro de hospederos de esta especie?, ¿La participación de *nodS* en *R. tropici* esta directamente relacionada con la capacidad de esta especie para nodular *Leucaena*?, ¿Cuál es el papel de *nodS* en la síntesis de los factores Nod producidos por *R. tropici*?, ¿Puede nodular *Leucaena* una mutante *nodS*⁻ de *R. etli* complementada con el gen *nodS* de *R. tropici*?

Para responder a estas interrogantes, se planteó cubrir los objetivos que se señalan a continuación,

IV OBJETIVOS

GENERAL:

1) ANALISIS DE LA PARTICIPACIÓN DE *nodS* EN LA DETERMINACIÓN ESPECIFICA DE ESPECTRO DE HOSPEDEROS EN *Rhizobium tropici* CIAT899. La estrategia que se propone para lograr dicho propósito consiste en el aislamiento del gen y su caracterización a través de la obtención de una mutante en el gen *nodS*, así como la purificación y análisis de los lipo-oligosacáridos producidos por ésta. Ensayos de nodulación de esta mutante en *Leucaena* y frijol, permitirán entender el papel que juega *nodS* en la nodulación de estas leguminosas.

ESPECIFICOS:

1) CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN *nodS* DE *Rhizobium tropici* CEPA CIAT899. Además de asegurarnos de la presencia de un marco abierto de lectura homólogo a *nodS*, la clonación y secuenciación de este gen nos permitirá situar la localización exacta del mismo y, adicionalmente, mostrarnos los sitios adecuados para generar una mutante.

2) MAPEAR FISICAMENTE EL GEN *nodS* DE *R. tropici* CIAT8999.

3) OBTENER UNA MUTANTE NO POLAR *nodS*- DOBLE RECOMBINANTE, USANDO MUTAGÉNESIS SITIO DIRIGIDA. El gen *nodS* clonado se mutagenizará *in vitro*, interrumpiendolo con un interposón que confiera resistencia a algún antibiótico. Bacterias que contengan el gen mutado, se obtendrán seleccionando dobles recombinantes, producto de conjugación entre la cepa silvestre y las bacterias que contengan el plásmido con *nodS* mutado. Para seleccionar las dobles recombinantes, se usara *sac^R* y el antibiótico elegido. El interposón seleccionado no deberá presentar terminadores de la

transcripción, con el fin de evitar que los genes que se encuentren hacia abajo de este tentativo operón se vean afectados. Las mutantes obtenidas, deberán analizarse por "Southern", lo que permitirá comprobar el reemplazamiento de la región deseada.

4) ANALISIS DE LOS FACTORES NOD PRODUCIDOS POR LA MUTANTE *nodS*⁻ USANDO CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA. Incubando *in vivo* a la mutante con L-(metil-³H)metionina como precursor de grupos metilo, y analizando los lipooligosácaridos producidos por las cepas mutante y silvestre, estudiaremos el papel de *nodS* en la metilación de los factores Nod de *R. tropici*, usando cromatografía en capa fina para la visualización de los lipo-oligosacaridos. Para comprobar la producción de factores Nod por parte de la mutante, se realizarán los mismos experimentos usando glucosamina¹⁴C como precursor de los lipo-oligosacaridos. Paralelamente, se analizarán los factores Nod producidos por una mutante *nodS*⁻ en *R. etli* que fué obtenida previamente, con el fin de determinar su función.

5) DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO DE NODULACIÓN DE LA MUTANTE OBTENIDA EN RAÍCES DE *Leucaena* Y *P. vulgaris*. Mediante experimentos de nodulación en maceta, se intentará probar la hipótesis de que *nodS* de *R. tropici* es importante para la nodulación efectiva de *Leucaena*.

6) ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN DE LA MUTANTE *nodS*⁻. Para confirmar la participación de NodS en los fenotipos observados, dentro del fondo genético de la mutante y con el gen *nodS* silvestre clonado en un plásmido adecuado, se llevará a cabo la complementación de la cepa mutada. Se analizaran fenotipos de nodulación en la planta, así como la producción de factores Nod. De igual forma, se complementará a la mutante *nodS*⁻ de *R. etli* con el gen *nodS* silvestre obtenido a partir de *R. tropici*.

V MATERIAL Y MÉTODOS

V.1 BACTERIAS Y PLÁSMIDOS

En la tabla 3 se muestran las cepas bacterianas y los plásmidos (o cósmidos) que se han utilizado en el presente estudio.

Tabla 4. Bacterias y plásmidos utilizados en este estudio.

Cepa bacteriana o plásmido	Características relevantes	Fuente o referencia
I.- <u>Cepas bacterianas</u>		
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT899	Silvestre, Nod ⁺ Fix ⁺ en frijol y <i>Leucaena</i> Rif ^R Nal ^R Cm ^R	Martínez-Romero <i>et al.</i> (1991)
RSP900	Rif ^R , derivada de CIAT899 curada del plásmido simbiótico	Vargas <i>et al.</i> (1990)
nodS::kam1-20	Rif ^R Nal ^R Km ^R , derivada de CIAT899, nodS ⁻	Este trabajo
<i>Rhizobium etli</i> CE3	Silvestre, Str ^R Nal ^R , Nod ⁺ Fix ⁺ en frijol, derivada de CFN42	Noel <i>et al.</i> (1984)
CFN2001	Rif ^R , derivada de CFN42 curada de los plásmidos p42a y p42d	Palacios <i>et al.</i> (1983)
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue ³	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, (F' proAB, lacZ ΔM15, Tn 10 (tet^R))</i>	Bullock <i>et al.</i> (1987)
DH5α	F ⁻ , ø80d, <i>lacZ ΔM15, recA1, endA1, hsdR17 (r_s⁻, m_s⁺), supE44, thi-1, d⁻, gyrA96, Δ (lacZYA-argF), U169</i>	Hanahan, D. (1983)
II.- <u>Plásmidos y cósmidos</u>		
pUC19	Plásmido vector, replicón ColE1; Lac ⁻ , Amp ^R	Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)
pSK ⁺	f1 ⁺ , ColE1, LacZ, Amp ^R	Stratagene
pVK102	Cósmido derivado de pRK290, Km ^R , Tc ^R	Knauf y Nester (1982)
pRK404	Plásmido derivado de pRK290, Lac, Tc ^R	Ditta <i>et al.</i> (1985)
pJQ200SK	Vehículo suicida, <i>sacB, Lac⁺, Gm^R</i>	Quandt y Hynes (1993)
pUC4K	Derivado de pUC4, Amp ^R , Km ^R , LacZ	Farmacia
pSL301	Derivado de pUC, Amp ^R , SL2, LacZ	Invitogen
pCAT19	Derivado de pUC19, Amp ^R , Cm ^R , LacZ	Claiborne W. (1991)
pRK2013	NmR, plásmido ayudador para transferencia	Figurski y Helinski (1979)
pCV38	Inserto de 28.8 kb del pSym de CIAT899 clonado en el sitio <i>HindIII</i> de pVK102	Vargas <i>et al.</i> (1990)
pCV3804	Fragmento <i>HindIII</i> de 6.4 kb (digestión parcial) de pCV38 subclonado en pRK404	Vargas <i>et al.</i> (1990)

Tabla 4. (continuación)

Cepa bacteriana o plásmido	Características relevantes	Fuente o referencia
pSM991.25	18.5 kb del p42d de <i>R. etli</i> clonado en el sitio EcoRI de pSUP205, Tc ^R , Km ^R	Cevallos <i>et al.</i> (1989)
pRP17.1	pSM991.25 con <i>nodS::MudII</i> PR13 Tc ^R Cm ^R Km ^R	Cevallos <i>et al.</i> (1989)
pBH3	Fragmento <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III de 2.5 kb proveniente del pCV3804, ligado en pUC19	Este trabajo
pSH24	Fragmento <i>Sal</i> I- <i>Hind</i> III de 2.2 kb proveniente del pBH3, y ligado en pSK ⁺	Este trabajo
pCC59	Inserto <i>Cla</i> I- <i>Cla</i> I de 0.6 kb, aislado de pBH3 y ligado en pSK ⁺	Este trabajo
pPH11	Inserto <i>Pst</i> I- <i>Hind</i> III de 1.1 kb, liberado de pBH3 y ligado en pSK ⁺	Este trabajo
pMA2-5	Fragmento <i>Bam</i> HI- <i>Bam</i> HI de 0.7 kb aislado del pSM991.25 (<i>nodS</i>), ligado en pUC19	Villalobos MA (tesis de Licenciatura, 1993)
pBE41	Inserto <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RV de 0.4 kb aislado del 991.25 y ligado en pUC19 (sonda <i>nodU</i>)	Este trabajo
pSLEX6	Fragmento <i>Eco</i> RI- <i>Xho</i> I de 2.2 kb liberado del pSH24 y ligado en pSL301	Este trabajo
pKam19	Cassette de Kanamicina del pUC4K aislado con <i>Pst</i> I y ligado en pCAT19 (sin el cassette de Cm)	Este trabajo
pSHKam3	Derivado del pSH24, con el cassette de kanamicina dentro del sitio único <i>Sph</i> I.	Este trabajo
pJQnodS::Kam3	Inserto <i>Sal</i> I- <i>Eco</i> RV del pSHKam3 ligado en los sitios <i>Sal</i> I- <i>Sma</i> I de pJQ200SK	Este trabajo
pMP3510	IncP, vector de expresión con el promotor de <i>nodA</i> (pA) de <i>R. l. bv. viciae</i> , Tc ^R	Spaink <i>et al.</i> (1995)
pMP2421	IncW, contiene los genes <i>nodU</i> de <i>R. l. bv. viciae</i> bajo pA, Sm ^R	H. Spaink
pMPRL3510	Fragmento <i>Xba</i> I- <i>Cla</i> I (<i>nodS</i>) de <i>R. loti</i> clonado en pMP3510	H. Spaink
pMPAnods	Inserto <i>Kpn</i> I- <i>Bam</i> HI (<i>nodS</i>) del pSH24 y clonado en el pMP3510	Este trabajo

V.2 MINIPREPARACIONES DE DNA PLASMIDICO

Se inocularon 5mL de medio Luria conteniendo el antibiótico adecuado con una colonia bacteriana aislada y se incubaron a 37°C toda una noche con agitación vigorosa. 1.5mL del cultivo se pasó a un tubo eppendorf y se centrifugó por 1 minuto. El resto del cultivo se guardó a 4°C. Se removió el medio por aspiración, dejando la pastilla bacteriana tan seca como fué

posible. Se resuspendió la pastilla en 100µL de una solución fría de 50mM glucosa/10mM EDTA/25mM Tris-HCl (pH 8.0) Se dejó el tubo 5 minutos a temperatura ambiente (es necesario que la tapa del tubo permanezca abierta durante este período). Se adicionaron 200µL de una solución recién preparada de 0.2 N NaOH/1 % SDS y se dejó en hielo por 5 minutos. Transcurrido el tiempo, se adicionaron 150µL de una solución fría de acetato de potasio (pH 4.8) preparada de la siguiente manera: a 60mL de acetato de potasio se le adicionaron 11.5mL de ácido acético glacial y 28.5mL de H₂O. La solución resultante es 3M con respecto al potasio y 5M con respecto al acetato. Se mezcló suavemente en vortex el contenido en posición invertida durante 10 segundos, y el tubo se colocó en hielo durante 5 minutos. Una vez que el tiempo transcurrió, los tubos se centrifugaron 15 minutos a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se adicionó un volumen igual de fenol-cloroformo, y los tubos se mezclaron con la ayuda de un vortex. Se centrifugaron dos minutos a 10,000 rpm y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Fueron adicionados dos volúmenes de etanol a temperatura ambiente, se mezcló con un vortex, y se dejaron los eppendorf a temperatura ambiente durante dos minutos. Transcurrido el tiempo se centrifugaron 15 minutos a 10,000 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante fué removido y los tubos se colocaron en posición invertida sobre un papel absorbente para drenar todo el líquido. Una vez escurridos, se adicionó 1mL de etanol al 70% a cada tubo para quitar el exceso de sales y se volvió a centrifugar. Se removieron los sobrenadantes y las pastillas se secaron al vacío.

Las pastillas se resuspendieron en 50µL de T.E. (10:1) conteniendo RNasa pancreática libre de DNasa (20 mg/ml).

V.3 AISLAMIENTO DE DNA PLASMÍDICO A GRAN ESCALA POR GRADIENTE DE CsCl₂-BROMURO DE ETIDIO

Los resultados que éste método presenta son de gran utilidad en varias de las técnicas que requieren de DNA extremadamente limpio, tales como

subclonaciones, secuenciación, transformación, etc.

Se comenzó con un cultivo nocturno fresco en medio Luria bajo presión selectiva. Se inoculó medio Luria con una dilución 1:100 del cultivo crecido anteriormente y se creció otra vez con selección. Fueron usados 250mL de medio en un matraz de 1000mL, ó 500mL de medio en un matraz de 2000mL y los cultivos se agitaron a 300RPM, 37° por 16-24 hrs.

Cuando se utilizaron 250mL se procedió de la siguiente manera: se cosecharon las bacterias por centrifugación a 6000RPM durante 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y se drenó bien la pastilla. Se resuspendió en 10mL de T₂₀E₁₀. Se midió el volúmen de la suspensión celular y se transfirió a un recipiente adecuado (se adicionaran 3.5 volúmenes más). Se adicionaron 2 volúmenes de NaOH 0.2M/SDS 1% y se mezcló por inversión. Se dejó a temperatura ambiente durante 10-15 minutos. Se adicionó 1/2 volúmen de acetato de amonio 7.5M y se mezcló bien con agitación vigorosa. Se dejó en hielo 30 minutos. Los residuos se separaron por centrifugación a 6000RPM, a 4°C por 15 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un tubo corex de centrífuga usando una pipeta, evitando a lo máximo los residuos. Se adicionó 1 volúmen de isopropanol y se dejó el tubo a -20°C durante 30 minutos. Los ácidos nucleicos se colectaron centrifugando a 10000RPM, a 4°C por 20 minutos. Se decantó el sobrenadante y se drenó muy bien la pastilla para después resuspenderla en 3mL de T₁₀E_{0.1}. Se adicionó un volúmen de 1:10 de acetato de sodio 3M pH 5.5 y se mezcló bien. Se adicionaron 2 volúmenes de etanol y los tubos se dejaron a 4°C durante 2 hrs. El DNA se recuperó centrifugando a 10000RPM, a 4°C por 20 minutos. Se decantó el sobrenadante y se drenó muy bien el material centrifugado. La pastilla de ácidos nucleicos se resuspendió en 3mL de T₁₀E_{0.1}. Se midió el volúmen total de la solución y se transfirió a un tubo de polipropileno de 12mL con tapa de seguridad. Se adicionaron 0.6mL de bromuro de etidlo 5mg/mL. Se multiplicó el volúmen total por 0.98 (la cifra resultante es la cantidad de cloruro de cesio que debe adicionarse). El tubo se tapó y se mezcló perfectamente para disolver el cloruro de cesio. El tubo se dejó a temperatura ambiente 1 hr. Después, se

centrifugó el tubo en una centrífuga tipo Sorvall durante 15 minutos a 7000RPM. El sobrenadante se transfirió a un tubo de ultracentrífuga, llenándolo hasta el cuello con una solución de cloruro de cesio (0.98 grs por cada mL de $T_{10}E_{0.1}$) y se selló. Se centrifugó a 5000RPM a 16°C por 16 hrs. Los tubos se observaron bajo luz UV para visualizar las bandas (la banda más baja es el DNA plasmídico). Se perforó el techo del tubo con una jeringa de 5mL. Con otra jeringa, se picó 2mm más abajo de la banda plasmídica para succionarla. El DNA se transfirió a un tubo corex limpio, y se adicionó un volúmen igual de isopropanol equilibrado con SSC 20X, y se mezcló con ayuda de un vortex. Se centrifugó brevemente para separar las fases y se descartó la fase superior de isopropanol. Se repitió hasta que no ver trazas de coloración en el tubo. Se adicionaron 2 volúmenes de $T_{10}E_{0.1}$ y se mezcló. Se adicionaron 2 volúmenes de etanol absoluto. Se mezcló bien, y se dejó a 4°C por 2 hrs. Se centrifugó a 10,000RPM, 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante se tiró, y se drenó bien para resuspender la pastilla en 2mL de $T_{10}E_{0.1}$. Se adicionó un volúmen de 1:10 de acetato de sodio 3M pH5.5 y se mezcló. Se adicionaron 2 volúmenes de etanol absoluto, se mezcló bien y se dejó 2 hrs. a 4°C (o en hielo seco 30 min.). Se centrifugó y secó como se hizo anteriormente. Se resuspendió nuevamente la pastilla en 2mL de $T_{10}E_{0.1}$ y se repitió el paso de precipitación con etanol. La pastilla se lavó adicionando 5mL de etanol al 75% y se centrifugó a 10,000RPM durante 5 min. La pastilla se secó bajo condiciones de vacío y, finalmente, se resuspendió en un pequeño volúmen de $T_{10}E_{0.1}$ (0.5-1mL). Se transfirió a un tubo Eppendorf estéril y se almacenó a 20°C bajo cero.

V.4 EXTRACCIÓN DE DNA TOTAL DE *Rhizobium*

Se inoculó un volúmen de 3-5 ml de PY- Ca^{2+} (10 mM) con el antibiótico adecuado y se incubó de 16-24 hrs a 30°C con agitación y oscuridad. Se centrifugaron las células en un tubo eppendorf a 4°C, por 2 minutos a 7000RPM. La pastilla celular se resuspendió en 1mL de una solución fría de $T_{50}E_{20}$ pH8, se agitó con vortex ó con pipeta Pasteur y se adicionaron otros 400 μ L de $T_{50}E_{20}$.

Además, 50 μ l de pronasa 5mg/mL (predigerida una hora en T₅₀E₂₀) y 50 μ L de RNasa a la misma concentración fueron agregados. Inmediatamente después, se agregaron 50 μ l de SDS 10% en TE pH8 (50/20) y mezcló por inversión varias veces. Los tubos se incubaron a 37°C durante 60 minutos. A los 30 minutos se observaron fibras de DNA. Se pasó el lisado en tres ocasiones por una aguja de jeringa de 1 ml, y se agregaron 500 μ L de fenol-cloroformo-isoamílico (24-24-1) y se agitaron en vortex hasta hacer emulsión. Se centrifugaron 3 minutos a 7000RPM y se tomó la fase acuosa para ser transferida a otro tubo (se repitió este paso dos veces). Se adicionaron 500 μ L de CHCl₃ y se agitaron los tubos con vortex para posteriormente ser centrifugados 3 minutos a 7000RPM, se tomó la fase acuosa y se repitió dos veces más este paso. Se agregaron 15 μ L de NaCl 5M y 800 μ L de etanol absoluto a -20°C y los tubos se colocaron durante 10-15 minutos a -70°C. Se centrifugaron 10 minutos a -4°C a 7000RPM y las pastillas de DNA se lavaron dos veces con etanol al 70% a -20°C, para ser secadas al vacío y resuspendidas en 40 μ L de H₂O. El DNA puede ser usado así, o se puede purificar más digiriendo el RNA. Para esto, se evaporó el agua y se resuspendió la pastilla en 500 μ L de T₁₀E₁, a lo que se le agregaron 10 μ l de RNasa (5mg/mL), se mezcló bien y se incubó 1 hr a 37°C. Transcurrido el tiempo se extrajo dos veces con fenol-cloroformo-isoamílico y dos veces con cloroformo. El DNA se precipitó con 15 μ L de NaCl 5M y 800 μ L de etanol absoluto durante 10 minutos a -70°C. La pastilla se lavó tres veces con una solución fría de etanol al 70% y se secó al vacío para ser resuspendida en 50 μ L de H₂O tetradestilada.

V.5 TÉCNICAS DE TRANSFERENCIA DE DNA

Conjugación en placa (cruza triparental).

Las cruza triparentales se realizaron siempre en cajas de Petri con medio PY. Las cepas a ensayar se crecieron hasta la fase estacionaria temprana, se centrifugaron a 5000RPM durante un minuto, se lavaron con MgSO₄ 10mM, se centrifugaron igual y se mezclaron en una proporción de

1:1:0.1 (células donadoras, células receptoras y células portadoras del plásmido ayudador pRK2013) . Se centrifugaron de la misma manera, y las células se resuspendieron en un volúmen de ~100µL, los cuales se esparcieron en una caja de Petri conteniendo medio PY. Después de 12 horas de crecimiento a 30°C, las células fueron recuperadas con la ayuda de una asa de siembra, resuspendidas en 1mL de MgSO₄ 10mM, centrifugadas y lavadas en 1mL de una solución de MgSO₄ 10mM Tween 0.01%, y vueltas a centrifugar para resuspenderlas finalmente en 1mL de la solución anterior. Se hicieron diluciones, y estas se plaquearon sobre el medio selectivo.

Transformación de *E. coli*.

Para la transformación de células de *E. coli*, se usaron dos protocolos diferentes: 1) Usando cloruro de calcio, y 2) Mediante electroporación.

Transformación de células de *E. coli* usando cloruro de calcio.

Las células de *E. coli* se crecieron hasta la fase exponencial, se transfirieron a tubos de plástico para centrifuga tipo Sorvall y fueron centrifugadas a 6000RPM a 4°C durante 10 min. El sobrenadante fué eliminado, y la pastilla resuspendida en una solución fría de NaCl 10mM para ser centrifugadas durante cinco minutos a 6000rpm, 4°C. Se decantó perfectamente y se resuspendió la pastilla en el buffer de transformación con cloruro de calcio (frío) hasta aforarla a 50mL y se colocaron en hielo durante 20 min. Transcurrido el tiempo, se centrifugó a 6000 rpm, 10 min., 4°C. El sobrenadante se decantó y la pastilla se resuspendió en 1mL del buffer de transformación para ser usado como *stock* de células competentes. Para transformar se colocaron 100µL del buffer de transformación y 200µL de células competentes en un tubo de ensaye chico con tapa hermética, y se adicionó 1µL del DNA con el que se deseaba transformar. Se dejó 1 hr. en hielo y se incubó 2 min. a 42°C. Después de esto se adicionaron 3mL de LB líquido y se incubó a 37°C con agitación durante 1 hr. Se plaquearon 100 µl de cada tubo en cajas con medio selectivo.

Electroporación de células de *E. coli*.

Preparación de células electrocompetentes. Se inoculó 1L de medio LB con un volúmen de 1/100 de un cultivo fresco. Las células se crecieron a 37°C con agitación hasta una ABS_{600} de 0.5-0.8 (es mejor cosechar las células en la fase temprana o media de la fase logarítmica; la densidad celular apropiada depende de la cepa y condiciones de cultivo). El matraz con el cultivo se puso en hielo por 15-30 minutos, y se centrifugó en un rotor frío a 4000 x gmax durante 15 minutos. El sobrenadante se removió, se resuspendieron cuidadosamente las células en 1L de agua bien fría, y se centrifugó de la misma manera. Se resuspendió en 0.5L de agua fría y se centrifugó igual. Se resuspendió en ~20mL de glicerol al 10% previamente enfriado en hielo y se centrifugó. Se resuspendió en un volúmen final de 2-3 mL de una solución fría de glicerol al 10% (la concentración celular debe ser de alrededor de $1-3 \times 10^{10}$ células/mL). Esta suspensión se repartió en alíquotas de ~70µL que se congelaron en hielo seco, y se almacenaron a -70°C. Bajo estas condiciones, las células permanecen en buen estado al menos durante 6 meses.

Electrotransformación. Se descongelaron lentamente las células electrocompetentes e inmediatamente después se pusieron en hielo, al igual que las celdas. En un tubo eppendorf frío de 1.5mL, se mezclaron las células con 1-2µL de DNA (el DNA debe estar en un buffer de fuerza iónica baja, como el TE 10:1). Se mezcló lentamente y se dejó en hielo ~0.5-1.0 minuto. El electroporador se ajustó a 25µF, 200 Ω y 2.50 kV cuando se usaron celdas de 0.2cm (cuando se usan celdas de 0.1cm se ajusta el aparato a 1.5-1.8 kV). La mezcla de DNA y células se transfirió a una celda fría, golpeandola ligeramente para que la suspensión se fuera al fondo. Se pulsó una vez. Inmediatamente después de pulsar, se adicionó 1mL de medio SOC (o LB) a la celda y se resuspendieron las células con una pipeta Pasteur. Las células se pasaron a un tubo estéril para recuperarlas a 37°C por una hora a 225 RPM. El tiempo constante durante el pulso debe estar entre 4 y 5msec (la fuerza de campo puede ser calculada como volts actuales (V/espacio de celda

(cm)). Las células se plaquearon en medio selectivo.

Medio SOC:

Bacto triptona	2.0%
Extracto de levadura	0.5%
NaCl	10mM
KCl	2.5mM
MgCl ₂	10mM
MgSO ₄	10mM
Glucosa	20mM

V.6 REEMPLAZAMIENTO GÉNICO EN *Rhizobium*.

Para la mutagenesis de *nodS* se usó la técnica descrita por Quandt y Hynes (1993). Los vectores pJQ200SK y PjQ200mp18 permiten reemplazar un gen silvestre por uno mutado en muchas bacterias Gram-negativas. Estos vectores contienen el origen de replicación (*ori*) P15A, y poseen el gen *sacB* de *Bacillus subtilis*, cuya expresión es inducible por sacarosa, lo que resulta letal para bacterias Gram-negativas (como *Rhizobium*). Dichos vectores también tienen un marcador de resistencia a gentamicina, y el sistema *lacZα*, lo cual facilita la selección de fragmentos clonados. Además, estos vehículos llevan la región *mob* del plásmido de amplio rango RP4, lo que les permite ser transferidos por conjugación a un gran número de bacterias Gram-negativas; debido a que estos vehículos sólo se pueden replicar en enterobacterias, funcionan como vectores suicidas. El sitio *cos* del fago lambda presente en estos vehículos, permite que sean utilizados para la construcción de bancos genómicos que pueden acarrear insertos de hasta 40kb. Por poseer estas características, estos vehículos son extremadamente útiles para la mutagénesis dirigida, ya que permiten la selección directa de los dobles recombinantes.

Para la mutagenesis de *nodS* de *Rhizobium tropici*, se usó un sitio único de *SphI* para la introducción del cassette de resistencia a kanamicina

proveniente del vehículo pUC4K. El vehículo pUC4K contiene el mismo sitio de clonación múltiple a cada extremo del gen de resistencia a kanamicina, el cual no incluye el sitio *SphI*, por lo que fue necesario crear sitios de restricción *SphI* a cada extremo del cassette. Para esto, se cortó el pUC4K con la enzima *PstI*, y se insertó en el vehículo pCAT19, resultando en la subclona pKam19 que lleva los sitios *SphI* flanqueando al cassette de kanamicina. Para la introducción del cassette en el sitio único *SphI* del gen *nodS*, se utilizó la subclona pSH24, que es un pSK⁺ que contiene un fragmento *Sall-HindIII* de 2.2kb del genoma de *R. tropici*, dentro del cual se ubicó a *nodS*. La subclona resultante fue denominada pSHKam3, la cual fue digerida con las enzimas *Sall* y *EcoRV* para liberar el inserto de ~3.2kb que contienen el gen *nodS* interrumpido con el gen de resistencia a kanamicina. Dicho inserto fue posteriormente ligado en los sitios *Sall* y *SmaI* del vehículo pJQ200SK, resultando en el plásmido pJQnodS::Kam3, el cual fue utilizado para el reemplazamiento génico. Para esto, el vehículo pJQnodS::Kam3 fue movilizado a *Rhizobium tropici* CIAT899, y se seleccionó para la adquisición de resistencia a kanamicina y/o sacarosa al 10%. Se aislaron 100 colonias resistentes a kanamicina y a sacarosa al 10% (candidatas dobles recombinantes), que fueron sembradas en las mismas condiciones, y en gentamicina por separado. Cerca del 80% fueron sensibles a gentamicina. Para su análisis por *Southern*, se seleccionaron al azar 12 colonias.

V.7 RECUPERACIÓN DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA

Los fragmentos de DNA se recuperaron de los geles de agarosa mediante utilizando los kits "GeneClean® I y GeneClean® II" siguiendo las recomendaciones del fabricante

V.8 ANÁLISIS DE DNA GENÓMICO POR HIBRIDACIÓN TIPO "SOUTHERN"

Las estrategias para la localización de secuencias particulares dentro de un DNA genómico, generalmente son acompañadas por las técnicas de transferencia descritas por Southern (1975). El DNA genómico es digerido con

una ó mas enzimas de restricci3n, y los fragmentos resultantes son separados por tama1os por electroforesis a trav3s de un gel de agarosa. Posteriormente, el DNA es desnaturalizado *in situ*, y transferido desde el gel a un soporte s3lido (generalmente un filtro de nitrocelulosa o membrana de nylon). Las posiciones de los fragmentos de DNA son conservadas durante su transferencia al filtro. El DNA "anclado" al filtro es hibridado con DNA ó RNA marcado radioactivamente. A continuaci3n se usan t3cnicas de autoradiograf3a para localizar las posiciones de las bandas complementarias a la sonda. El protocolo usado fu3 el siguiente:

Se corri3 un gel de agarosa con las muestras de DNA a analizar, con la misma t3cnica descrita anteriormente para electroforesis en geles de agarosa. Por otro lado, un recipiente o charola de cristal se llen3 con buffer SSC 20X, se construy3 una plataforma con un cristal apropiado y se coloc3 sobre 3ste 3 pedazos de papel filtro Whatman 3MM (de un tama1o semejante al del gel) saturados con un poco de SSC 20X, sobre los cuales se deposit3 el gel, el cual se cubri3 con un pedazo de membrana Hybond-N+ con el tama1o exacto del gel.

Sobre la membrana, se colocaron otros tres pedazos de papel filtro del mismo tama1o mojados con SSC 20X, y encima de estos se pus3 una "torre" de papel absorbente (aproximadamente de 5 cm), la cual fu3 cubierta con un cristal de tama1o adecuado y se coloc3 sobre este un objeto con un peso de 0.75-1Kg. El aparato de transferencia se desmont3 despu3s de transcurridas 8 hrs. Antes de remover el gel, se marc3 la membrana con un l3piz para la posterior ubicaci3n exacta del mismo. La membrana se coloc3 dentro de una charola con NaOH 0.4M hasta cubrirla perfectamente y se dej3 all3 por 20 minutos. Se enju3garon las membranas suavemente con agitaci3n moderada (m3ximo 1 minuto) en una soluci3n de SSC 5X. A un tubo de hibridaci3n de un tama1o adecuado, se le a1adieron 5mL de soluci3n de prehibridaci3n de fosfatos al 50% y se introdujeron las membranas a hibridar para ser incubadas por 1 hr en un ba1o de agitaci3n a 65°C, despu3s de lo cual fuer3n a1adidas las sondas radioactivas a examinar. Se hibrid3 al menos

durante 12 horas a 65°C. Posteriormente, se lavaron los filtros dos veces en SSC 2X/SDS 0.1% (p/v) a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se volvieron a lavar las membranas con SSC 1X/SDS 0.1% (p/v), incubando a 65°C, durante 15 minutos. Dependiendo del caso, la membrana estuvo lista para ser expuesta a la autoradiografía, o se siguió lavando en condiciones más astringentes.

		Concentración final
Formamida	25.0mL	50.0%
SDS 20%	17.5mL	7.0%
NaH ₂ PO ₄ 2M pH7.2	7.5mL	0.3M
EDTA 0.5 M	100µL	10mM

Nota.. Para la preparación de 1L de la solución de NaH₂PO₄ 2M pH7.2:

NaH ₂ PO ₄ 2M	275.98 gr
NaOH	42.00 gr
Agua	900.00 mL
Ajustar el pH con NaOH 10N. Aforar a 1L.	

V.9 Secuenciación Nucleotídica.

En general, la secuencia mostrada en este trabajo se realizó usando el "kit de Sequenasa" 2.0 (USB), según especificaciones del fabricante, bajo el principio de Sanger *et al.*, 1977.

Electroforesis de geles de secuencia. La cantidad y la exactitud de la lectura de la secuencia nucleotídica está determinada por la calidad de los geles de poliacrilamida usados para separar los fragmentos de DNA marcados radioactivamente. Bajo condiciones óptimas, puede ser posible leer entre 300 y 400 nucleótidos de un solo gel. La concentración de la acrilamida usada para preparar los geles depende del tamaño de los fragmentos de DNA que van a ser analizados. Para poder leer los primeros 50 nucleótidos pegados al primero, los geles deberán de prepararse con

concentraciones más altas que los preparados para leer nucleótidos muy alejados del primero. Para separar los fragmentos de DNA marcados, fueron utilizados geles de acrilamida al 6% y 8%, dependiendo de las condiciones y requerimientos del fragmento a secuenciar. El tiempo de las corridas también fué variable para ajustarse a las necesidades de la lectura; generalmente los geles se corrieron por períodos que oscilaron entre 1 y 10 hrs.

Tomando en cuenta todo esto, los geles se corrieron de manera que se ajustasen a los parámetros requeridos en cada caso. La fórmula para la preparación de los geles de acrilamida fué tomada del manual editado por Maniatis *et al* (1989):

Geles al 8%:

10mL de Acrilamida-Bis 38:2
5mL de TBE 10X
20mL de agua tridestilada
21gr de Urea

Geles al 6%:

7.5mL de Acrilamida-Bis 38:2
5.0mL de TBE 10X
14.5mL de agua tridestilada
24.0gr de Urea

Preparación de TBE 10X:

162 grs de Tris base
9.5 grs de EDTA
27.5 grs de Acido bórico
Aforar a 1L y filtrar a través de papel Wattman #1 bajo vacío.

Debido a que se utilizó (α -³⁵S)-dATP como marca radioactiva, los geles tuvieron que ser fijados después de la corrida con una solución de ácido acético 10%-metanol 10% durante 15 minutos. Posteriormente, los geles fueron transferidos a una hoja de papel Wattman #1 y cubiertos con papel egapack

para ser secados con calor y al vacío con un equipo de secado Bio-Rad 583 durante 1 hr.

Una vez que los geles estaban completamente secos se les retiró el papel egapack, y el gel seco adherido al papel Wattman fué expuesto, generalmente por un día en un cassette apropiado con un film para autoradiografía X-OMAT Kodak. Al término del período de exposición, los films fueron revelados con técnicas convencionales para films de rayos X.

V.10 DETECCIÓN DE METABOLITOS NOD USANDO TLC

Las cepas de *Rhizobium* se crecieron en medio B⁻ durante 24 hr y se diluyeron a un valor de 0.1 de D.O. a 600 nm, inoculándolas en 1 mL de medio B⁻. Para inducir la síntesis de factores de nodulación, se adicionó 1.5 mM de naringenina, añadiendo además 1.0 μ Ci de *D*-(l-¹⁴C)-glucosamina hidrociorada (50 mCi/mmol, Amersham), o 0.5 μ Ci de *L*-(metil-¹⁴C)-metionina (55 mCi/mmol, Amersham), o en su caso 2.0 μ Ci de Sodio(³⁵S)Sulfato (100 mCi/mmol, Amersham). Los cultivos se incubaron a 30°C durante el tiempo requerido del experimento (1-12 hr). La extracción de los metabolitos Nod se realizó con 500 μ L de *n*-butanol saturado con agua, como describe Spaink *et al.* (1992), y se agitaron los tubos por 2 hr. La centrifugación se llevó a cabo a 8000 X *g*, 4°C, 10 min. Después de la centrifugación, el sobrenadante (contiene los factores Nod excretados) se separó de la pastilla celular (contiene los metabolitos Nod asociados a las células), se tomó únicamente el sobrenadante, el cual fué evaporado, y el polvo resultante fué resuspendido en 30 μ L de butanol saturado con agua. Las muestras se almacenaron a 4°C y se separaron mediante cromatografía en capa fina (TLC) como describe Spaink *et al.* (1992) aplicando 3 μ L de cada muestra. Se utilizaron placas de sílica C18 de fase reversa (ODS-100% octadecyl silanization obtenidas de Sigma). Las placas se corrieron usando una cámara saturada con acetonitrilo/agua (1:1, v/v). Para la identificación de los metabolitos Nod marcados radioactivamente, las placas se expusieron de 24-72 hr en

pantallas hipersensibles para equipo de "Molecular Dynamics PhosphorImager" y se analizaron con software "Image Quant".

V.11 EXPERIMENTOS DE NODULACIÓN

Primeramente, se esterilizaron superficialmente las semillas de frijol ó *Leucaena* con una técnica apropiada, dependiendo del tipo de semilla. La variedad de frijol usada fué la negro jamapa, y la especie de *Leucaena* no fué determinada.

Esterilización superficial y germinación de semillas de frijol: se lavaron 2 veces los frijoles con agua corriente para quitar basura y polvo. Se lavaron 1 min. con etanol al 100%. Se enjuagaron 2 ó 3 veces con agua corriente. A partir de aquí todo se hace bajo condiciones de esterilidad. Se mantuvieron los frijoles en una solución de hipoclorito de sodio al 30% durante 15 min. Se enjuagó 5 veces (o las que fueron necesarias) con agua estéril hasta que el olor a cloro desapareció. Los frijoles se transfirieron una charola que contenía una buena cantidad de toallas absorbentes empapadas en agua corriente y cubierta con papel aluminio, previamente esterilizada. Se depositará la charola a 26-28°C durante dos días para permitir la germinación de las semillas.

Esterilización superficial y germinación de semillas de *Leucaena*: Las semillas se colocaron en un matraz con tapa de rosca (estéril) y se vertió ácido sulfúrico al 100% hasta cubrirlos. El matraz tapado se agitó suavemente durante 15 minutos. El ácido sulfúrico se vació a otro recipiente, escurriendo el matraz lo suficiente para dejar la menor cantidad posible de ácido dentro de él, haciendolo cuidadosamente para evitar la pérdida de semillas. Inmediatamente después, se lavaron las semillas rápidamente con por lo menos 5 L de agua estéril (resulta crucial este punto, ya que es importante lavar las semillas rápidamente y con mucha agua para evitar que se "quemem" con la reacción producida por el ácido al contacto con el agua). Una vez alcanzado lo anterior, las semillas se dejaron en hipoclorito de sodio al 20% durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo, se enjuagaron las semillas

con agua estéril hasta que el olor a cloro desapareció. Las semillas se transfirieron a una charola que contenía una buena cantidad de toallas absorbentes empapadas en agua corriente y cubierta con papel aluminio, previamente esterilizada. La charola se depositó a 26-28°C durante dos días para permitir la germinación de las semillas.

Experimentos de nodulación en maceta.

1) La vermiculita se lavó con agua corriente por lo menos tres veces, con la ayuda de una bolsa grande de maya plástica de poro fino. Se vació la vermiculita en macetas y se dejaron escurriendo durante una noche. Cada maceta se tapó con papel aluminio y se sellaron con cinta adhesiva. Se esterilizaron en autoclave durante 45 minutos.

2) En la campana de flujo laminar, se transplantaron 4 plantulitas por maceta (sin cubrir a los cotiledones con la vermiculita), se regaron lentamente con 250ml de medio fáhraeus y se inoculó cada plantulita con 2mL de un cultivo saturado de la cepa de *Rhizobium* adecuada. Todavía en la campana, cada maceta se tapó con papel egapack, sellandolas con cinta adhesiva. Después de esto, las macetas se colocaron en un cuarto oscuro o en una cámara de cultivo (en oscuridad) a una temperatura de 28°C, por un período no mayor a 12 hrs, para permitir la etiolación de la plántulas. Transcurrido el tiempo, las macetas se llevaron otra vez a una campana de flujo laminar, en donde se les retiró la película plástica. Inmediatamente después, se agregó una capa de aproximadamente 2-3cm de arena (tipo cero grueso, esterilizada por 45 minutos en autoclave) a la superficie de la maceta, teniendo cuidado de no cubrir los cotiledones de las plantulitas. Las macetas se trasladaron a un invernadero, y se regaron al cuarto día con 200ml de agua estéril, y en la siguiente ocasión con medio fáhraeus (cada 3 días en el caso de frijol, y cada 5 días en el caso de *Leucaena*). Se monitoreó la nodulación a los tiempos adecuados.

V. 12 INCLUSIÓN EN PARAFINA DE NÓDULOS DE *Leucaena*

A.-Preparación y fijación del tejido:

El tejido fresco que se fijó, se cortó a un tamaño adecuado para su manejo y se colocó en viales de vidrio (en este punto se pueden dejar momentáneamente en hielo, pero jamás debe congelarse). El tejido se cubrió inmediatamente con el fijador (si el tamaño del tejido lo permite, el corte puede hacerse sobre fijador, y, de realizarse así, se debe utilizar tapabocas). Los viales se transfirieron a una campana de vacío y se les aplicó un vacío suave durante 10', al término de los cuales, se eliminó. Se volvió a aplicar vacío por 10 minutos más (todo aquel material que permaneció en flotación después de este período se desechó). El tejido se dejó en el fijador por doce horas con agitación suave en un rotor. Después, los viales se guardaron a 4°C hasta la posterior inclusión en parafina de los tejidos.

B.-Impregnación en parafina:

Después del período de fijación, se realizaron dos lavados con PBS, de media hora cada uno, con la idea de eliminar cualquier rastro de fijador. Se comenzó la deshidratación del tejido con alcoholes graduales: 10, 30, 50, 70, 90, 96 y 100% etanol, Xilol (los tejidos permanecieron en cada alcohol de 20-30 minutos)(Si se tiene que detener la deshidratación en algún punto, se recomienda que sea en alcohol 70% y que se almacene a 4°C). Después del Xilol, se trató al tejido con una mezcla de Xilol-Parafina en proporciones de 75%-25%, 50%-50% y 25%-75%, dejando en cada mezcla una hora a 55°C. Después de la última mezcla en Xilol-Parafina, el tejido se impregnó con parafina y se dejó, al menos dos días en impregnación (se recomienda hacerle algún cambio de parafina durante este período). Terminado el período de impregnación en parafina, se transfirió el tejido a los moldes con ayuda de unas pinzas (se recomienda tener a mano una lámpara de alcohol para calentar las pinzas y, una aguja de disección para "dirigir" el tejido). El tejido ya impregnado en parafina puede conservarse así por largos períodos de tiempo antes de continuar su procesamiento.

C.- Montaje y tinción de los cortes de nódulo:

Se cortaron secciones de 8 μ m de nódulos impregnados en parafina (en microtomo), y se expandieron en H₂O a 42°C. Los cortes se recuperaron con portaobjetos (previamente tratados con "subbing") y se pusieron a secar a 42°C por 12 horas. Posteriormente se desparafinaron con xilol durante 10min, dos veces. Terminado este período, los tejidos se rehidrataron con alcoholes graduales 100, 90, 80, 70, 50, 30, 10% etanol (1 hora en cada alcohol). Se lavaron con PBS, se tiñeron con azul de bromofenol y se montaron con bálsamo de Canada.

Fijador formaldehído-glutaraldehído*:

		Concentración final
Paraformaldehído	2gr	4%
Glutaraldehído (25%)	2mL	1%
Buffer PBS (10X)	5mL	1%
Agua bidestilada	50mL	

*Nota: Disolver el paraformaldehído en 30mL de agua a 50°C, añadiendo NaOH hasta que la solución se torne transparente. Agregar el PBS y el glutaraldehído, mezclar bien y aforar a 50mL.

Preparación del buffer PBS 10X pH7.3 (cacodilato):

		Concentración final
NaCl	80 gr	134mM
KCl	2 gr	2.7mM
Na ₂ HPO ₄ •7H ₂ O	11.5 gr	4.3mM
KH ₂ PO ₄	2 gr	1.4mM
H ₂ O bidestilada	1L	

VI. RESULTADOS

VI.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN FÍSICA DEL GEN *nodS* DE *Rhizobium tropici* CIAT899

Carmen Vargas y colaboradores (1990) reportaron el aislamiento de una región de DNA del plásmido simbiótico de *R. tropici* CIAT899 en donde se encuentran varios genes de nodulación (entre ellos los *nod* comunes: *nodABC*). Esta clona (pCV38, Figura 5) fue aislada por su capacidad de complementar el fenotipo de nodulación a una cepa curada del plásmido simbiótico derivada de CIAT899 (RSP900, Tabla 4) y consta de un fragmento de DNA en el cual no se encuentran los genes de fijación de nitrógeno por lo que produce nódulos Fix⁻.

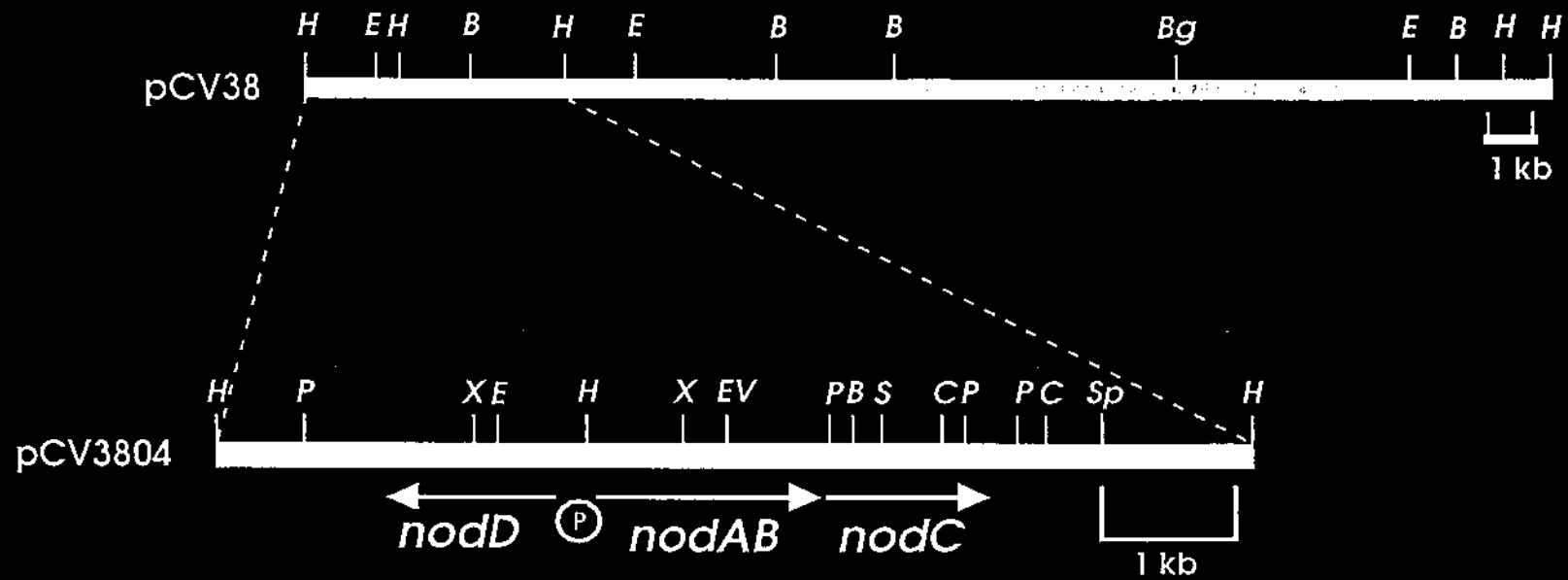
La figura 7 (A) muestra la hibridación tipo "Southern" que se realizó sobre el DNA genómico (digerido con *HindIII*) de las cepas CIAT899 y RSP900, usando como sonda el fragmento de 382pb que se liberó del plásmido pMA2-5 (M. A. Villalobos, tesis de Licenciatura, tabla 4) al digerirlo con las enzimas *BamHI* y *XhoI*; dicho fragmento contiene los nucleótidos correspondientes a los aminoácidos que codifican para la región de la proteína NodS de *R. etli* que presenta homología a metiltransferasas, y que se encuentra conservada en todas las proteínas NodS conocidas. Como la figura 7 (A) lo muestra, en la cepa CIAT899 se detectó una banda de hibridación de 4kb, usando condiciones de alta astringencia.

Usando la misma sonda se realizó una hibridación sobre el DNA de los cósmidos pCV38 y pCV3804. Dentro de estos cósmidos, Vargas *et al.* (1990) reportan la presencia de los genes *nodA*, *nodB* y *nodC* dentro de un fragmento de 4 kb de *HindIII* del genoma de *R. tropici* CIAT899.

La figura 7 (B) muestra que en ambos cósmidos digeridos con *HindIII* se detectó una banda de 4kb, similar a la encontrada en la cepa CIAT899. Esto sugiere que el gen *nodS* de *R. tropici* se encuentra en la región correspondiente a los genes de nodulación comunes.

Al analizar los datos anteriores, se decidió subclonar la región corriente abajo a *nodC*. Se digirió DNA del cósmido pCV3804 con las enzimas de

restricción *Bam*HI y *Hind*III (ver Figura 5), y los fragmentos resultantes se ligaron en pUC19. Usando esta estrategia, se obtuvo la clona pBH3 que contiene un fragmento de aproximadamente 2.5kb (tabla 4). Para determinar si en realidad esta clona llevaba la región de hibridación con *nodS*, se realizaron una serie de hibridaciones usando DNA de este plásmido digerido con diversas enzimas y la misma sonda anteriormente descrita, las cuales sirvieron también para determinar con mayor exactitud la región de hibridación con *nodS*. Como se puede observar en la figura 8 (A y B), la región de hibridación más fuerte con la sonda interna de *nodS* se encuentra en el fragmento liberado por la enzimas *Pst*I-*Hind*III, indicando que el tentativo gen *nodS* se encuentra localizado hacia abajo de *nodC*, como es el caso para *R. etli*, *B. japonicum* y *A. caulinodans*. Como resultado de este "mapeo" mas preciso, se encontraron algunas modificaciones al mapa de restricción que de esta región publicaron Vargas y colaboradores (1990), las cuales se muestran en la figura 8 (E).



59

Figura 5. Mapa físico del DNA de una región simbiótica de *R. tropici* CIAT899. Los mapas representan a las regiones contenidas en los cósmidos pCV38 y pCV3804. Las flechas muestran la localización de los fragmentos de restricción que hibridan con sondas heterólogas de genes *nod*. (Reproducido de Vargas *et al.*, 1990).

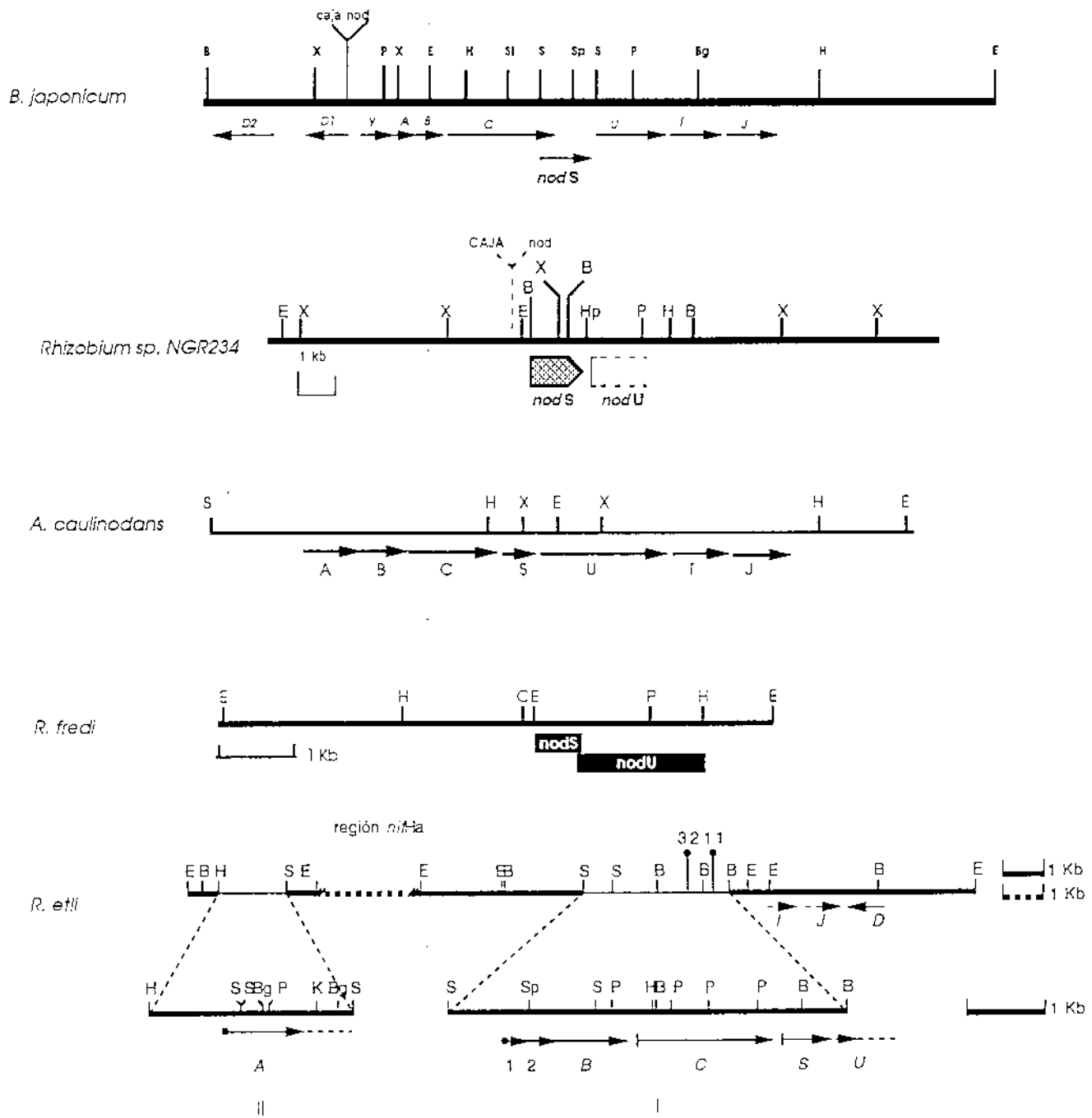


Figura 6. Mapas de restricción de las regiones simbióticas que contienen a *nodS* en diversas especies de *Rhizobium*. (Respectivamente reproducidos de: Göttfert *et al.*, 1990; Lewin *et al.*, 1990; Geelen *et al.*, 1993; Krishnan *et al.*, 1992; y M.A. Villalobos, tesis de Licenciatura, 1993).

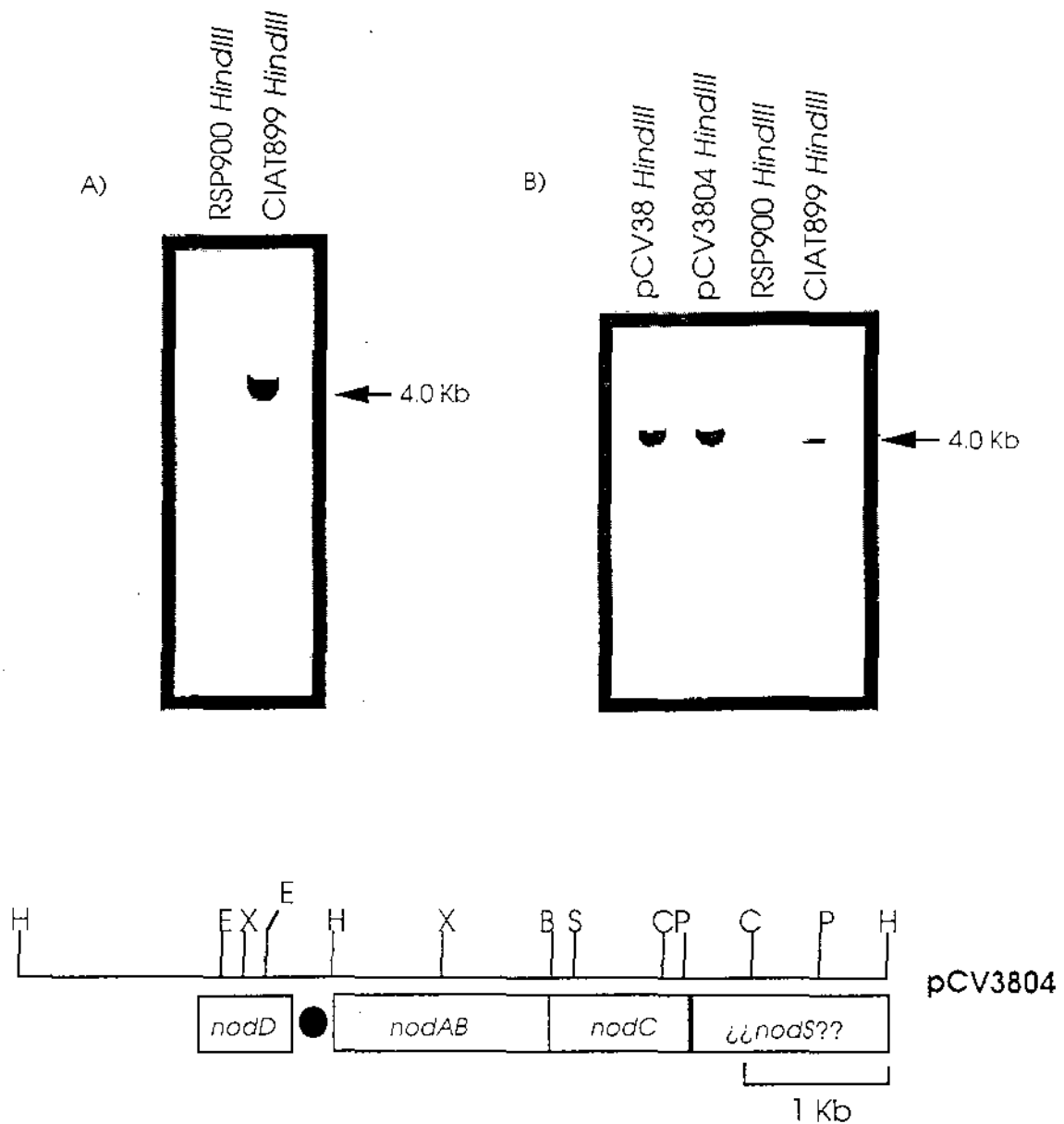


Figura 7. A) Hibridación de una sonda heteróloga de *nodS* contra DNA genómico de CIAT899 digerido con *HindIII*. B) Hibridación en contra de DNA de los cósmidos pCV38 y pCV3804 usando una sonda heteróloga de *nodS*. Abajo, región que hibrida con *nodS* en el cósmido pCV3804.

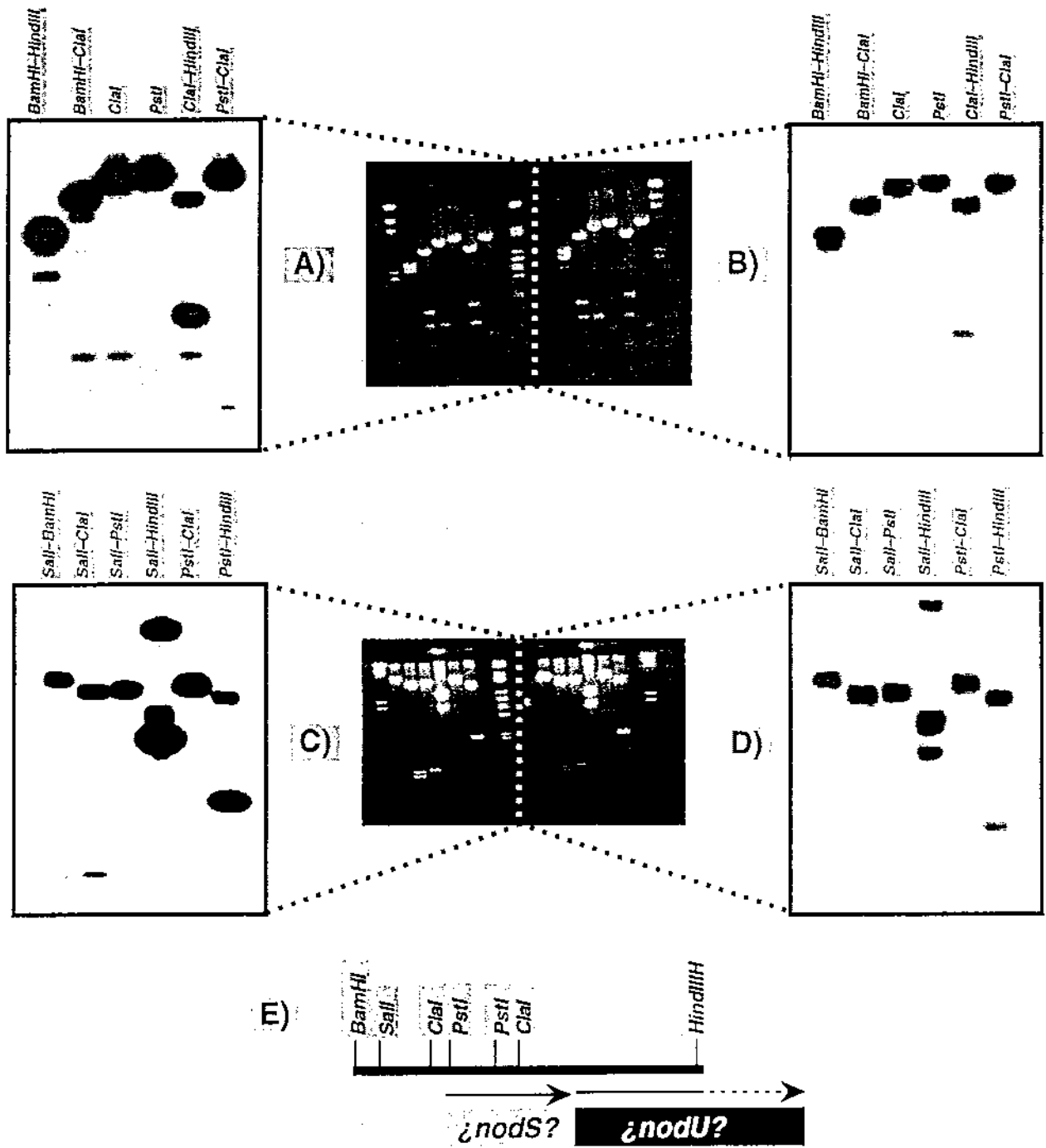


Figura 8. Hibridaciones realizadas sobre DNA del plásmido pBH3 digerido con varias enzimas de restricción y usando diferentes sondas. A y C) Usando una sonda heteróloga de *nodS*. B y D) Utilizando una sonda heteróloga de *nodU*. E) Mapa de restricción de la región de nodulación contenida en el plásmido pBH3.

VI.2 LOCALIZACIÓN FÍSICA DEL GEN *nodU* DE *Rhizobium tropici* CIAT899

En *B. japonicum*, *A. caulinodans* y *R. etli* el gen *nodS* se encuentra localizado entre los genes *nodC* y *nodU* (Fig. 6). Para explorar si este era el caso también para *R. tropici*, se hicieron una serie de hibridaciones bajo las mismas condiciones a las mostradas en la figura 8 (A y B), pero usando una sonda intragénica del gen *nodU* de *R. etli*. Para obtener la sonda, se digirió el cósmido 991.25 (figura 6) con las enzimas *BamHI* y *EcoRI*, y los fragmentos resultantes se ligaron en pUC19. De esta manera se aisló el plásmido pBE41, el cual contiene un inserto de 0.4kb intragénico de *nodU*. Los resultados mostrados en la figura 8 (C y D) indican que existe una región de hibridación con *nodU* en el genoma de *R. tropici* CIAT899, y que dicha región se localiza hacia abajo de la región de hibridación con *nodS*. Tomando en cuenta el tamaño del gen *nodU* en otras especies (~1.7kb), parece ser que este gen se encuentra truncado en el cósmido pCV3804 y, por lo tanto, también en el plásmido pBH3.

VI.3 SECUENCIACIÓN NUCLEOTÍDICA DEL GEN *nodS* DE *R. tropici* CIAT899

Para la secuenciación nucleotídica de la región de hibridación con *nodS*, se subclonaron varios fragmentos de la región de DNA de *R. tropici* contenida en el plásmido pBH3. Usando como referencia los resultados mostrados en las figuras 8 A) y 8 B), se subclonaron en pSK⁺ los fragmentos *Sall-HindIII* (2.2kb), *Clal-Clal* (0.6kb) y *PstI-HindIII* (1.1kb), resultando en los plásmidos pSH24, pCC59 y pPH11, respectivamente. Las primeras reacciones de secuencia obtenidas de estos plásmidos se realizaron usando los oligonucleotidos M13-20 y reverso del pBluescript[®]II (Stratagene). A partir de la secuencia obtenida, se diseñaron una serie de oligonucleotidos para extender las lecturas (Fig. 9 A y B).

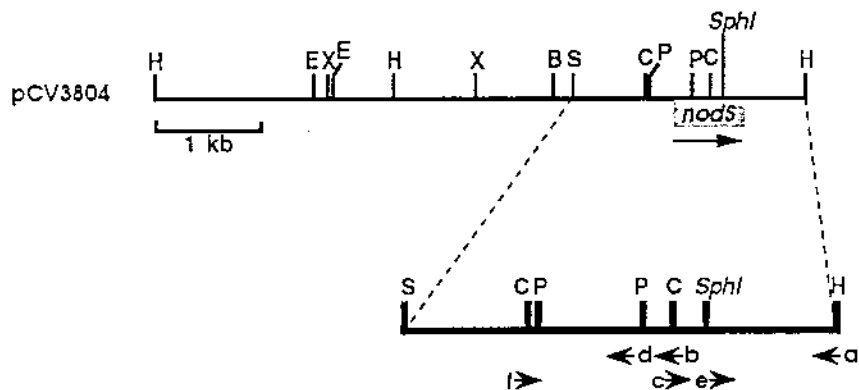
Usando esta estrategia, se secuenciaron 888 pb (fig. 10) que contienen un marco abierto de lectura homólogo al del gen *nodS* de *R. etli* CE3. Esta secuencia se obtuvo con la subclona pCC59, la cual fué secuenciada en su totalidad en ambas direcciones, mientras que la pPH11 se secuenció sólo

parcialmente. La secuencia obtenida se muestra en la figura 10. La secuencia nucleotídica, así como la de aminoácidos deducida de esta, fueron analizadas usando el programa de cómputo GeneWorks® (IntelliGenetics, Inc.).

El marco abierto de lectura homólogo a *nodS* comienza en el nucleótido 249 de la secuencia mostrada en la figura 10, del cual se dedujeron 213 aminoácidos (Fig. 11) que presentan alta identidad a proteínas NodS reportadas: 57% con NodS de *R. etli*, 53% con NodS de *R. sp.* NGR234, 45% con NodS de *B. japonicum*, y con NodS de *A. caulinodans* presenta sólo 16% de identidad. La figura 12(A) muestra un alineamiento de esta secuencia de aminoácidos con la proteína NodS de *R. etli*, que es con la que presenta mayor identidad. Además, en la figura 12(B) se muestra un alineamiento múltiple de las estructuras primarias de las proteínas antes mencionadas, donde entre todas ellas se encontró una identidad de 19%.

El objetivo inicial de este trabajo, además de asegurarnos de que teníamos un marco abierto de lectura, era el de secuenciar la región de hibridación con *nodS* para encontrar un sitio de restricción adecuado e insertar en él un cassette de resistencia a kanamicina para la mutagénesis. Durante el desarrollo de este trabajo, Waelkens y colaboradores (1995) publicaron un artículo en el que muestran la secuencia nucleotídica de los genes *nodSU* de *R. tropici* cepa CIAT899. La secuencia nucleotídica obtenida en este trabajo presenta una identidad de 99% con la región correspondiente de la publicada por Waelkens y colaboradores. La longitud total del gen *nodS* reportado por Waelkens es de 717 pb. Por otro lado, la secuencia de aminoácidos del marco abierto de lectura reportado por Waelkens para NodS, presenta una identidad del 98% con la región correspondiente al marco abierto de lectura encontrado en este trabajo (Fig. 13).

A)



B)

Oligonúcleotido	Secuencia 5' → 3'
a)UP-Hind-1	TCTTATAAGAAAGAACCCGG
b)UP-METHYL-COMP	GGAGCATTGCGCGTGACCG
c)Down-methylcodi	GCGGCCGGCGCCTTCACGG
d)M899-1	GATAATTGTCGTGCGTTTC
e)M899-2	GAGATGCGAATGGCAGTTGG
f)M899-3	GCCAATTCGATTTATCGGC

Figura 9. A) Muestra la ubicación aproximada de los oligonúcleotidos diseñados en este trabajo para la secuenciación del gen *nodS* de *Rhizobium tropici* CIAT899, y B) la secuencia de los mismos.

```

      Clal
ATCGATGACC ATGATCCGCT GCAGCGTCGC AGCGGTTCGT GCTCGCCAAT 50
TTCGATTTAT CGGCTTCTCC CTGCATACCT TCATCAACAT CTTTTTCCTG 100
CTGCCCTTGA AGGCCTACGC GCTCTGTACG TTGAGCAATA GCGATTGGCT 150
GTCGCGCGGC TCTGCTGCCA AGGCAACAGG CAAGGGTGGA AAGCTGGACG 200
CCATCCAAGA CCCGGTTGCT GCATCAAGCC CGAGAGAATC GCAAGAAAAT 250
GAAGCTCCGC TTCGCCGGCA CAATCTTGCG AGAGATGCTA CCAGATCGAT 300
      Clal
GGCATATGAC GGCATTTGCA CCGACCAGTA ATGATCGCTC TATCAAGGTA 350
GACGGCTTGA AAACGCACGA CAATTATCAA CTTTTAAATC GCGAACTGGC 400
      PstI
TGCAGATGAT CCGTGGCGTC GCGACGGAAA TCCGTTCGAA CGCAACGGTC 450
ACGCGCAAAT GCTCCTCGTG TCGCTTGCCC AGGGGCCCAT CGCAAATGCA 500
CTCGAAGTCG GGTGTGCGGC CGGCGCCTTC ACGGAAAAAC TGGCGCCCCA 550
      Clal
TTGCCAGCGC CTCACCGTTA TCGATGTCGT GCCAGAAGCG ATTGATCGAA 600
CGCTCCGGCG CATGAACAAG CCGGCACATA TCAGCTGGGT TGTCTCAGAC 650
GTACAACAGT TTTCCTCTGA AGAGCTTTTC GATCTGATCG TGGTTGCAGA 700
AGTTCTTTAT TACCTCGGAG ACATTGCCGA GATGCGAATG GCAGTTGGGA 750
      SphI
ACCTGCTTCG CATGCTTGCG CCGGGCGGGC ATCTGGTCTT CGGCTCGGCT 800
CGCGATGCGA ACTGCCAGCG CTGGGGTCAT GTTACCGGCG CTGAGACGGT 850
CATTGCCATT CTCACCGAAA TGTGGTTCGA GGTAGAGC 888

```

Figura 10. Secuencia obtenida en este trabajo. Los recuadros muestran los sitios de restricción representativos, así como el codon de inicio del marco abierto de lectura del putativo gen *nodS*.

```

ATGAAGCTCC GCTTCGCCCG CACAATCTTG CGAGAGATGC TACCAGATCG 50
M K L R F A G T I L R E M L P D R

ATGSCATATG ACGGCATTTG CACCGACCAG TAATGATCGC TCTATCAAGG 100
W H M T A F A P T S N D R S I K V

TAGACGGCTT GAAAACGCAC GACAATTATC AACTTTTAAA TCGCGAAGTG 150
D G L K T H D N Y Q L L N R E L

GCTGCAGATG ATCCGTGGCG CCTCGACGGA ATCCGTTTGG AACGCAAGCG 200
A A D D P W R L D G N P P E R K R

TCACGCGGCA ATGCTTCCTG TGTCGGTTTC CCGGGGGGCC ATCGCAATG 250
H A Q M L L L S L A Q S P I A N A

CAGTCAAGT CCGTGTGCG GCGGGCGGCT TCACGAAAA ACTGGGGGCG 300
L E V G C A A G A F T E K L A P

GHTGGCAGG GCGTCACCGT TATCGATGTC GTGCGAAGG CGATTGATCG 350
H C Q R L T V I D V V P E A I D R

AACGCGGCG CGGCTGACCA AGCGGGGACA TATCGCTGG GTTGTCTCAG 400
T R R R M N K P A H I S W V V S D

AGHTACACA GTTTTCTCT GAGAGGTTT TCGATCTGAT CGTGGTTGCA 450
V Q Q F S S E E L F D L I V V A

GAACTCTTT ATTACCTCGG AGACATTGTC GAGATGCGAA TGGCAGTTGG 500
E V L Y Y L G D I A E M R M A V G

GAACTCTTT CGGCTGCTTG CCGCGGGGCG GCGTCTGGTC TTGGGCTCGG 550
H L L R M L A P G G H L V F G S A

CTCGGATGTC GAACTGCGAG CCGTGGGTC ATGTTACCGG CGCTGAGAGG 600
R D A N C Q E W G H V T G A E T

GACATGCGA TTGTCACCGA ATGTTGCTC GAGGTAGAGG 640
V I A I L T E M L V E V E

```

Figura 11. Marco abierto de lectura para *nodS* encontrado en la secuencia nucleotídica obtenida en este trabajo. Como se aprecia en la figura, no se localizó el codón de término, debido a que se suspendió la secuenciación.

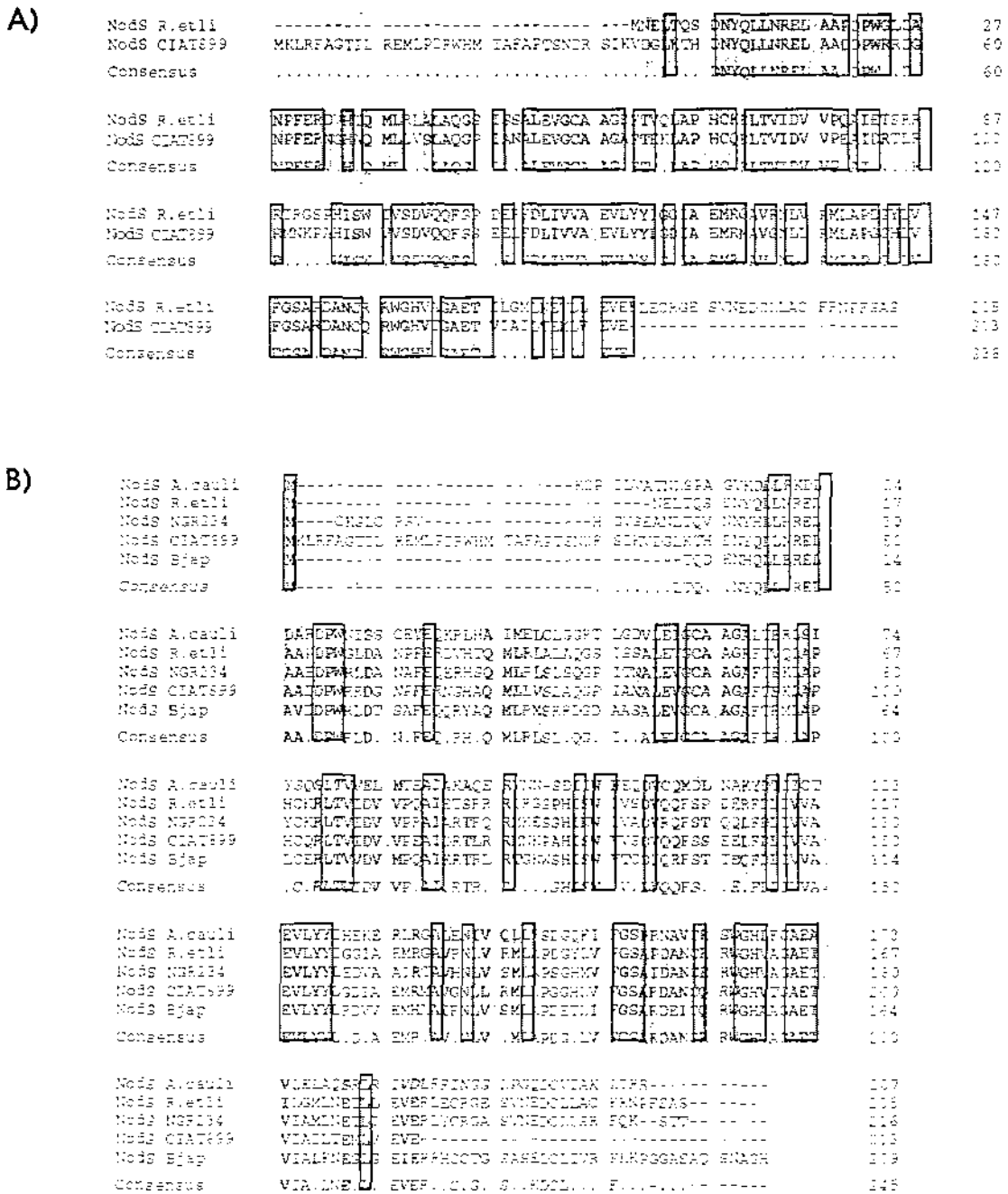


Figura 12. A) Alineamiento de aminoácidos realizado entre la proteína NodS de *R. etli* y la putativa proteína (truncada) NodS de *R. tropici*, mostrando una identidad de 57%. B) Alineamiento múltiple entre los aminoácidos de la putativa NodS de *R. tropici* y los de las proteínas NodS de *A. caulinodans*, *R. etli*, *R. sp.* NGR234, y *B. japonicum* (la identidad entre ellas es de 19%).

NodSWaelk/truncada	MKLRFAGTIL REMLPDRWHM TAFAPTSNDR SIKVDGLKTH DNYQLLNREL	50
NodS Villalobos	MKLRFAGTIL REMLPDRWHM TAFAPTSNDR SIKVDGLKTH DNYQLLNREL	50
Consensus	MKLRFAGTIL REMLPDRWHM TAFAPTSNDR SIKVDGLKTH DNYQLLNREL	50
NodSWaelk/truncada	AADDPWRFDG NPFERKRHAQ MLLSLAQQP IANALEVGCA AGAFTEKLAP	100
NodS Villalobos	AADDPWRFDG NPFERNGHAQ MLLSLAQQP IANALEVGCA AGAFTEKLAP	100
Consensus	AADDPWRFDG NPFERKHAQ MLLSLAQQP IANALEVGCA AGAFTEKLAP	100
NodSWaelk/truncada	HCQRLTVIDV VPEAIDRTLR RMNKPAHISW VVSDVQQFSS EELFDLIVVA	150
NodS Villalobos	HCQRLTVIDV VPEAIDRTLR RMNKPAHISW VVSDVQQFSS EELFDLIVVA	150
Consensus	HCQRLTVIDV VPEAIDRTLR RMNKPAHISW VVSDVQQFSS EELFDLIVVA	150
NodSWaelk/truncada	EVLYYLG DIA EMRMVGNLL RMLAPGCHLV FGSARDANCO RWGHVTCGET	200
NodS Villalobos	EVLYYLG DIA EMRMVGNLL RMLAPGCHLV FGSARDANCO RWGHVTCGET	200
Consensus	EVLYYLG DIA EMRMVGNLL RMLAPGCHLV FGSARDANCO RWGHVTCGET	200
NodSWaelk/truncada	VIAILTEMLV EVE	213
NodS Villalobos	VIAILTEMLV EVE	213
Consensus	VIAILTEMLV EVE	213

Figura 13. Alineamiento de aminoácidos realizado entre los deducidos del marco abierto de lectura encontrado en este trabajo y el reportado por Waelkens y col. (1995), para NodS de *R. tropici* (el tamaño total de la proteína NodS reportada por Waelkens es de 238 residuos aminoácidos). La identidad mostrada entre ambas en la región representada en el alineamiento es de 98%.

VI.4 MUTAGÉNESIS DEL GEN *nodS* DE *R. tropici* CIAT899

Para la mutagénesis del gen *nodS* se eligió el sitio interno de *SphI* para la inserción del cassette de kanamicina contenido en el plásmido pUC4K (figura 14), ya que se trata de un sitio único dentro del gen, y del plásmido pSH24.

Como primer paso, se tuvieron que crear sitios *SphI* a ambos extremos del cassette de kanamicina, para esto se digirió el plásmido pCAT19 (un derivado de pUC19 que contiene un cassette de resistencia a cloramfenicol flanqueado por sitios *PstI* y *SphI*, entre otros) con la endonucleasa de restricción *PstI* para desechar el cassette que contiene. El cassette de kanamicina contenido en el plásmido pUC4K se liberó con la enzima *PstI*, y posteriormente se ligó en el plásmido pCAT19 (sin el cassette de Cm), resultando en el plásmido pKam19 (con el cassette de Km flanqueado por el sitio *SphI*). Posteriormente, el cassette se liberó con *SphI* y se ligó en el sitio interno *SphI* del gen *nodS* contenido en el plásmido pSH24, resultando en el plásmido pSHKam3. Para la subclonación del gen *nodS* (interrumpido por el cassette de Km) en los sitios *Sall-EcoRV* del vehículo suicida pJQ200SK, se purificó el fragmento *Sall-EcoRV* del plásmido pSHKam3 y se ligó en el vehículo anteriormente descrito, resultando en el plásmido pJQnodS::Kam3.

Para provocar un reemplazamiento del gen *nodS* por el gen interrumpido, se siguió el protocolo descrito en material y métodos. Como resultado de esto, se seleccionaron 100 colonias bacterianas que crecieron en sacarosa/rifampicina/nalidíxico/kanamicina, de las cuales 23 fueron posteriormente desechadas por presentar resistencia a gentamicina (lo cual habla de eventos de recombinación sencilla, ya que aún presentan resistencia selectiva al vehículo suicida pJQ200SK, (figura 15). Del resto, se tomaron 12 colonias para ser analizadas por "Southern" para la comprobación del reemplazamiento génico. Los resultados se mostrados en las figuras 16, 17 y 18 demostraron que efectivamente la mutagénesis del gen *nodS* tuvo éxito.

Para el posterior análisis de su fenotipo de nodulación y de producción de factores de nodulación, se eligió al azar la mutante *nodS::Kam1-20*.

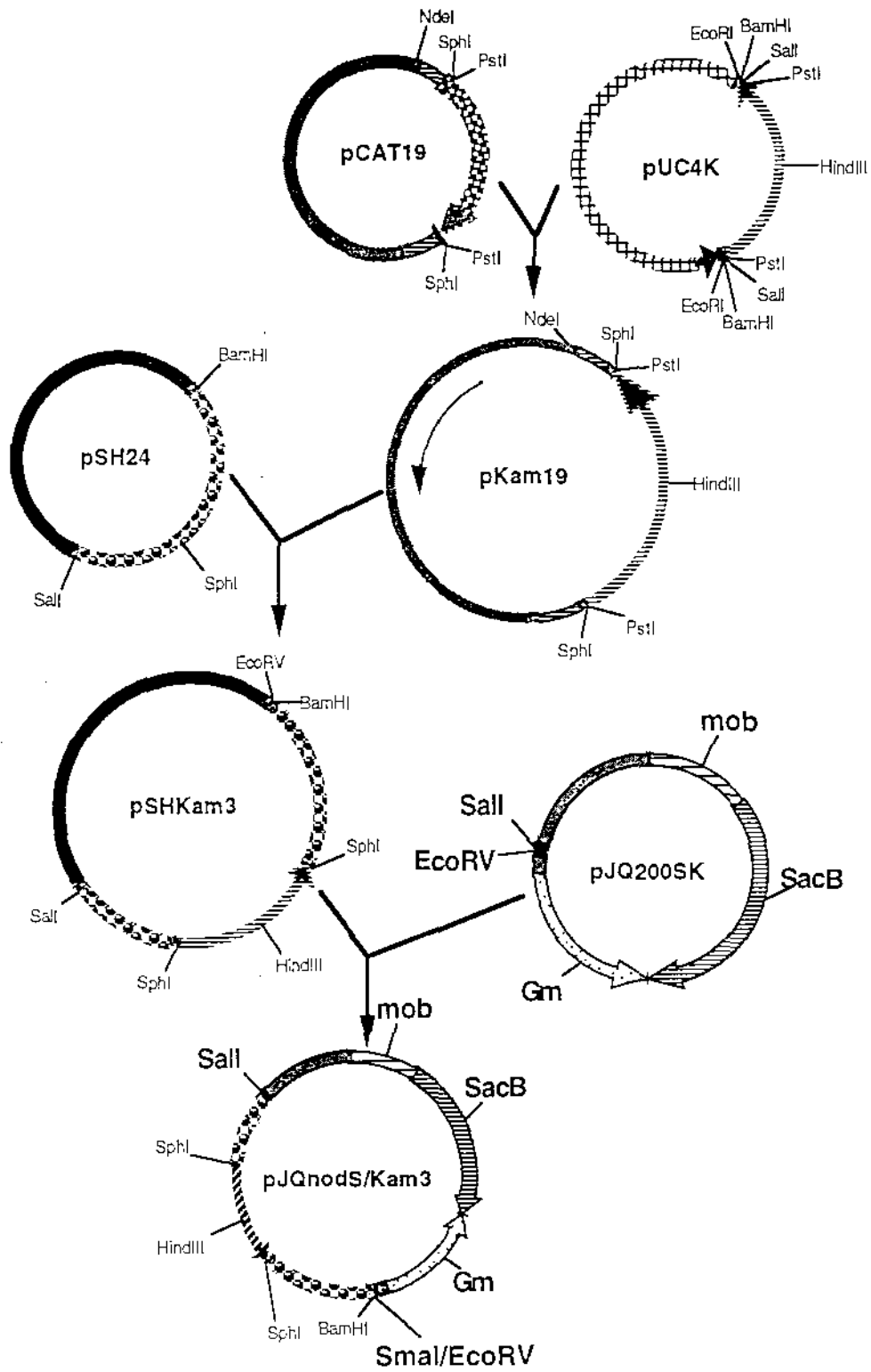


Figura 14. Construcción de los plásmidos pKam19, pSHKam3 y pJQnodS::Kam3.

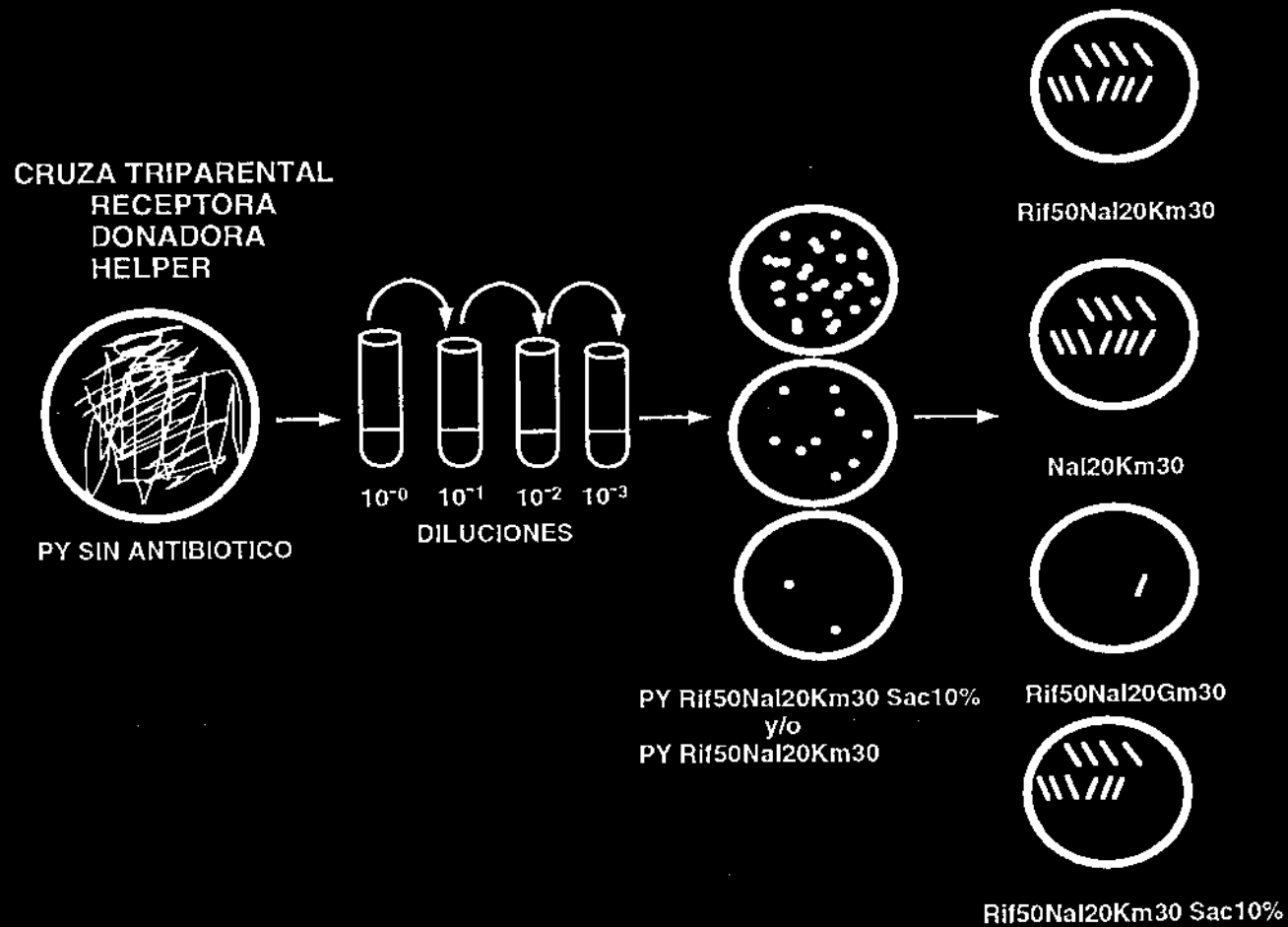


Figura 15. Estrategia de selección en la cruce triparental llevada a cabo para la doble recombinación del gen *nodS* interrumpido por el cassette de resistencia a kanamicina en el genoma de *R. tropici* CIAT899.

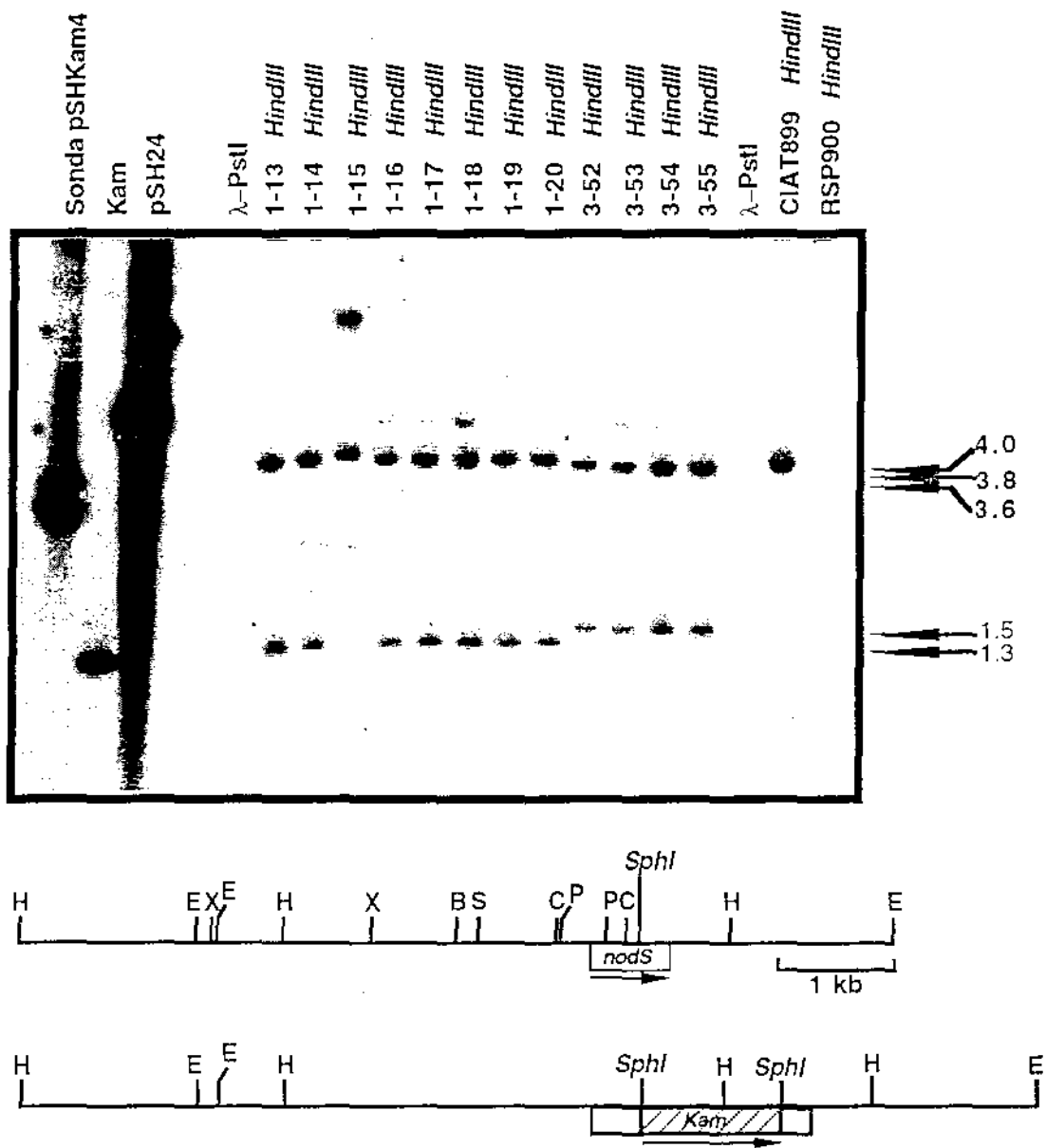


Figura 16. Hibridación tipo "Southern" llevado a cabo sobre DNA genómico de 12 tentativas mutantes en *nodS*. La sonda usada fué el plásmido pSH24 linealizado con *HindIII*. Las cepas 3-52, 3-53, 3-54 y 3-55 llevan el cassette de kanamicina en orientación invertida. Los mapas de restricción muestran la localización física del gen *nodS* antes y después de la mutagénesis.

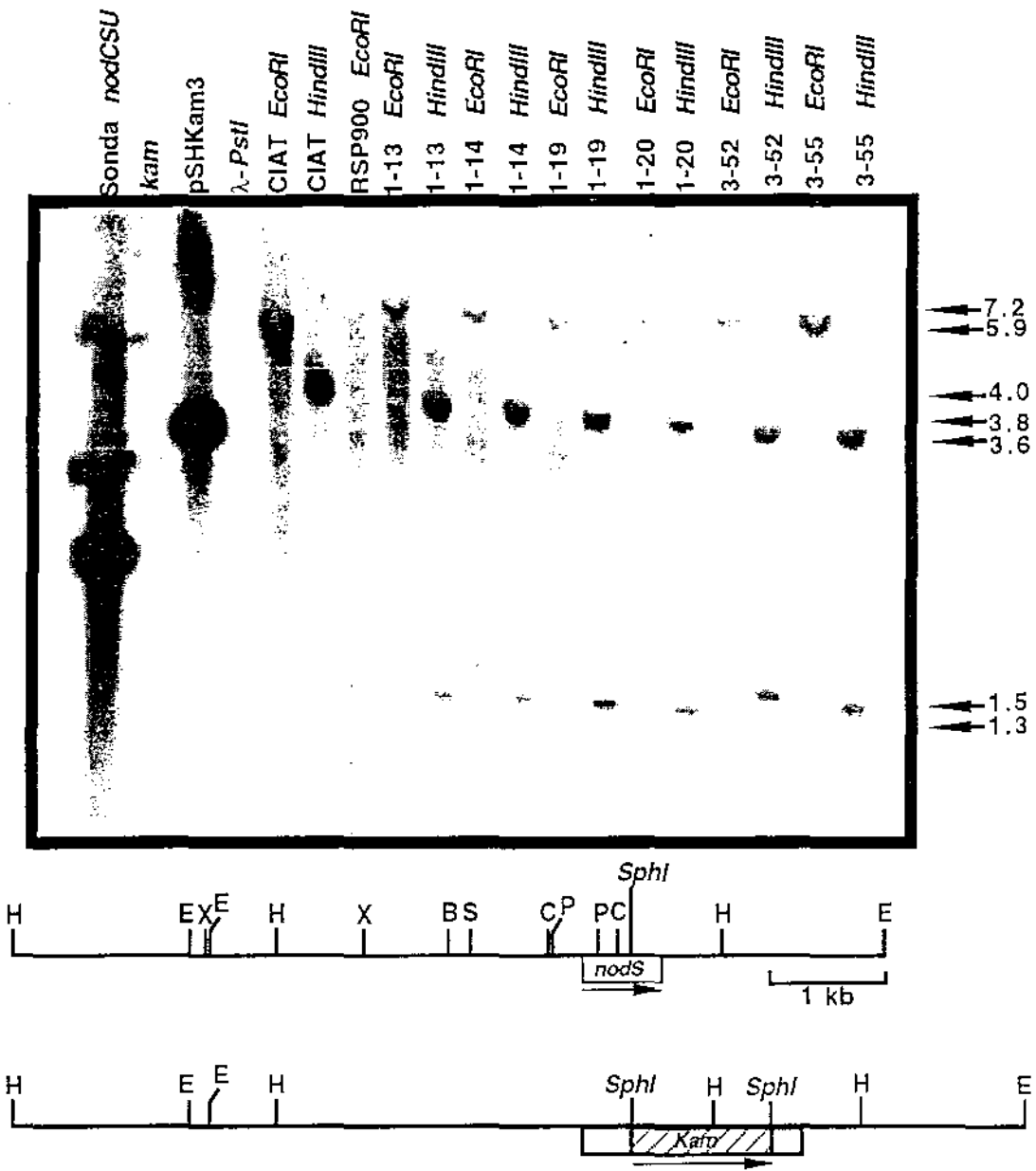


Figura 17. Hibridación tipo "Southern" llevado a cabo sobre DNA genómico de 12 putativas mutantes en *nodS*. La sonda usada fué el fragmento *EcoRI*-*XhoI* liberado del plásmido pSH24. Las cepas 3-52, 3-53, 3-54, y 3-55 llevan el cassette de kanamicina en orientación invertida. Los mapas de restricción muestran la localización física del gen *nodS* antes y después de la mutagénesis.

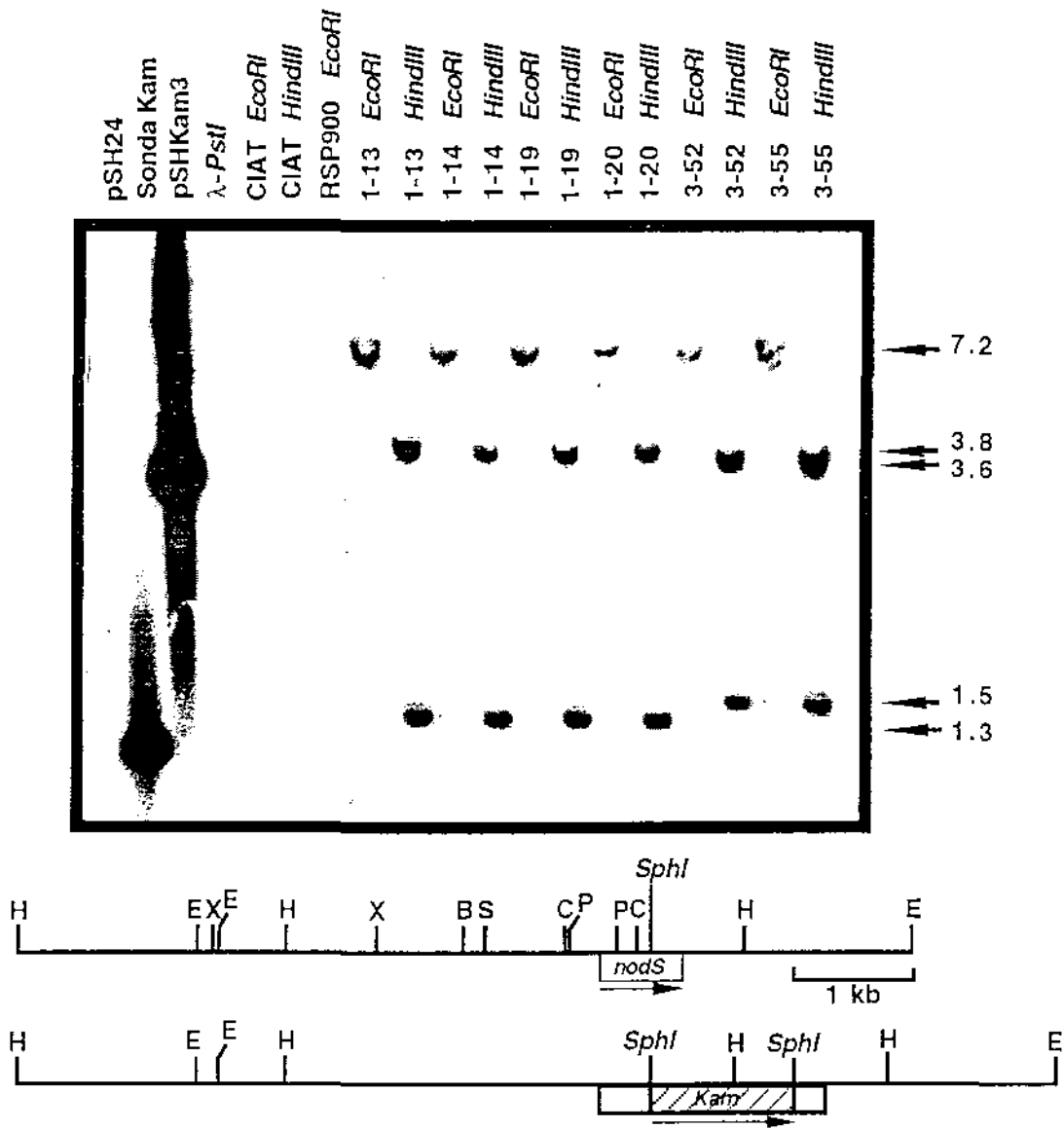


Figura 18. Hibridación tipo "Southern" llevado a cabo sobre DNA genómico de 12 putativas mutantes en *nodS*. La sonda usada fué el fragmento liberado del plásmido pUCAK al digerirlo con *Pst*I. Las cepas 3-52, 3-53, 3-54 y 3-55 llevan el cassette de kanamicina en orientación invertida. Los mapas de restricción muestran la localización física del gen *nodS* antes y después de la mutagénesis.

VI.5 ANÁLISIS EN TLC DE LOS FACTORES NOD PRODUCIDOS POR CEPAS MUTANTES EN *nodS*.

Los factores de nodulación producidos por 4 de las 12 cepas analizadas por hibridación, fueron estudiadas en cromatografía en capa fina (TLC).

Al incubar las cepas con 1.0 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ de *D*-(1-¹⁴C)-glucosamina como precursor de los factores Nod y 1.5 μM de naringenina como inductor de los genes de nodulación se observó en TLC en todas las mutantes la desaparición de una de las dos bandas típicas de factores Nod producidas por la cepa silvestre CIAT899. La banda que no se produjo es la que corresponde a los factores Nod que se encuentran sulfatados por la acción de NodH, según datos de J. Folch *et al.* (1996), lo cuál indicó un posible correlación entre la metilación y la sulfatación en los factores Nod producidos por *R. tropici* CIAT899 (fig. 19 A). El experimento se llevó a cabo por duplicado.

Para comprobar la pérdida de actividad de metiltransferasas, las mismas 4 cepas mutantes fueron incubadas con 0.5 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ de L-(metil-¹⁴C)-metionina como donador del grupo metilo, además de 1.5 μM de naringenina como inductor de los genes de nodulación. Extractos butanólicos de estos cultivos corridos en una placa de sílica demostraron que todas las mutantes analizadas resultaron incapaces de metilar sus factores Nod. Los resultados presentados en la figura 19 (B) comprobaron que las cepas obtenidas en la mutagenesis efectivamente tenían nulificada la actividad de NodS. De igual manera, el experimento se llevó a cabo por duplicado.

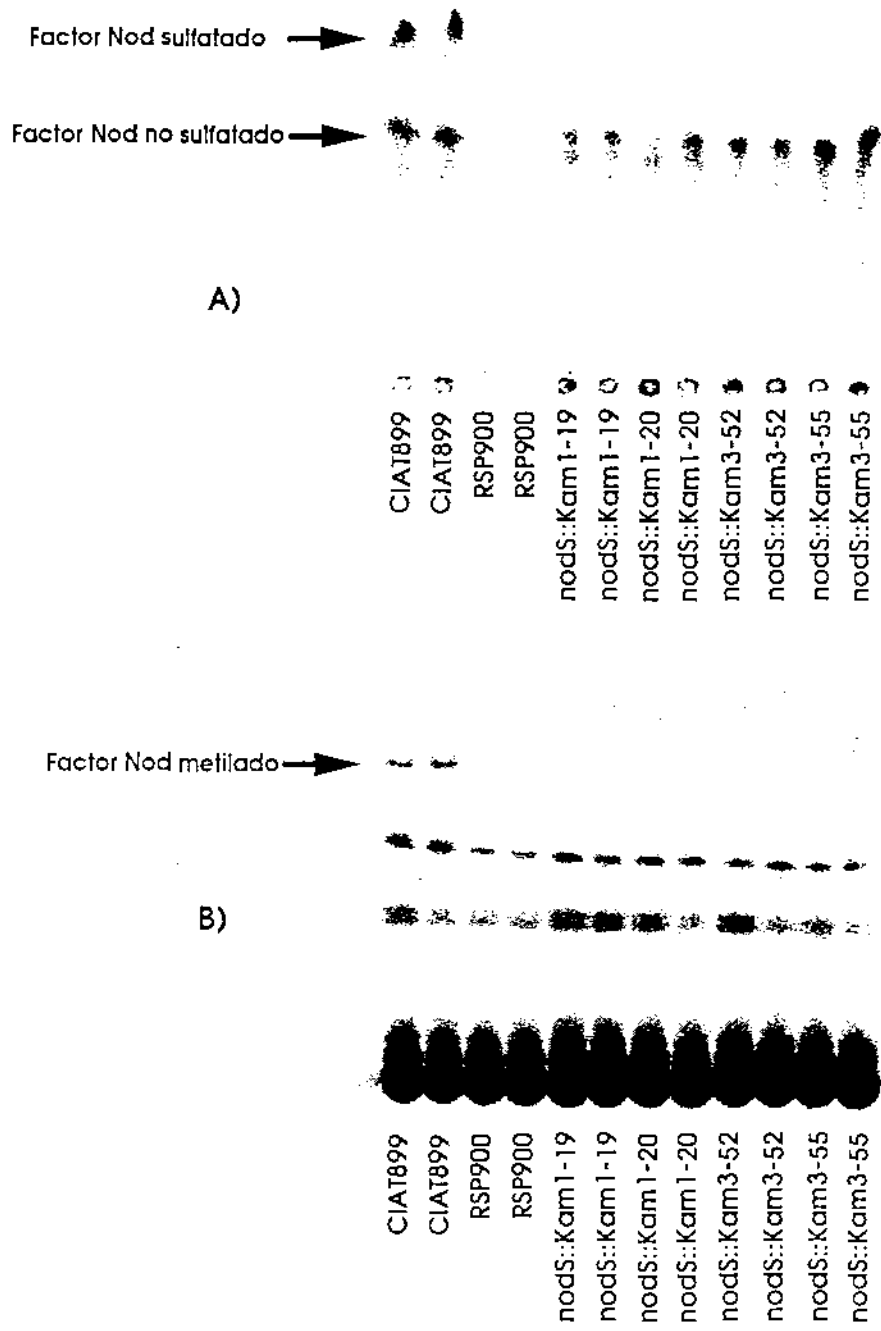


Figura 19. Cromatografías en capa fina de los factores de nodulación producidos por algunas de las mutantes *nodS*-obtenidas. A) Extractos butanólicos de cultivos bacterianos incubados con 1.0 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ de *D*-(*l*- ^{14}C)-glucosamina como precursor de los factores Nod y 1.5 μM de naringenina como inductor de los genes de nodulación. B) Extractos butanólicos de cultivos bacterianos incubados con 0.5 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ de *L*-(*metil*- ^{14}C)-metionina como donador del grupo metilo y 1.5 μM de naringenina.

VI.6 ANÁLISIS DE LOS FACTORES NOD PRODUCIDOS POR LA CEPA MUTANTE *nodS::Kam1-20* COMPLEMENTADA CON LOS GENES *nodS* DE *R. tropici* Y *nodS* DE *R. loti*.

La construcción del plásmido para complementar a la mutante *nodS::Kam1-20* se realizó de la siguiente manera: el plásmido pSH24 (tabla 4), se digirió con las enzimas de restricción *KpnI* y *BamHI* (*KpnI* se encuentra en el polylinker del pBluescript), liberando un fragmento de 2.2 kb que fue ligado en el vehículo pMP3510 (tabla 4), resultando en el plásmido pMPAnodS. Así, el gen *nodS* quedó integrado a un vehículo que es replicable en *Rhizobium* y además, bajo la regulación del promotor del gen *nodA* de *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Estos dos vehículos (pMPAnodS y PMPRL3510), fueron transferidos de manera independiente a la mutante *nodS::Kam1-20* por medio de cruas triparentales, resultando en las cepas *nodSRt/1-20* y *nodSRV/1-20*, respectivamente.

Ambas cepas fueron estudiadas en su capacidad de complementar la falta de actividad de NodS, usando cromatografía en capa fina para determinar el tipo de factores de nodulación producidos. En los ensayos llevados a cabo exponiendo los cultivos a glucosamina marcada radioactivamente, no se observa la banda superior (factores Nod sulfatados) en ninguna de las cepas complementantes (Fig 20 A y B). Los niveles de complementación en la síntesis de factores Nod metilados fueron muy bajos (Fig. 20 C y D) , aunque los mejores resultados se observan en la cepa que lleva el *nodS* de *R. tropici* (*nodSRt/ 1-20*).

Para comprobar que la mutante *nodS::Kam 1-20* es incapaz de sintetizar factores Nod sulfatados (además de no producir factores Nod metilados), se realizó otro experimento incubando los cultivos con 2 μ Ci/mL de sodio(³⁵S)sulfato como donador del grupo sulfato, induciendo además los cultivos con 1.5 μ M de naringenina. Los resultados obtenidos muestran que efectivamente la mutante *nodS-* resulto incapaz de sulfatar los factores Nod que produce. Inesperadamente, las cepas complementadas fueron incapaces de producir factores Nod sulfatados, mientras que las cepas *nodSRt/899* y *nodSRV/899* (CIAT899 portando una copia extra de *nodS* de *R.*

tropici y *R. leguminosarum*, respectivamente) muestran un incremento en su capacidad de producir lipo-oligosácaridos sulfatados (Fig. 21).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

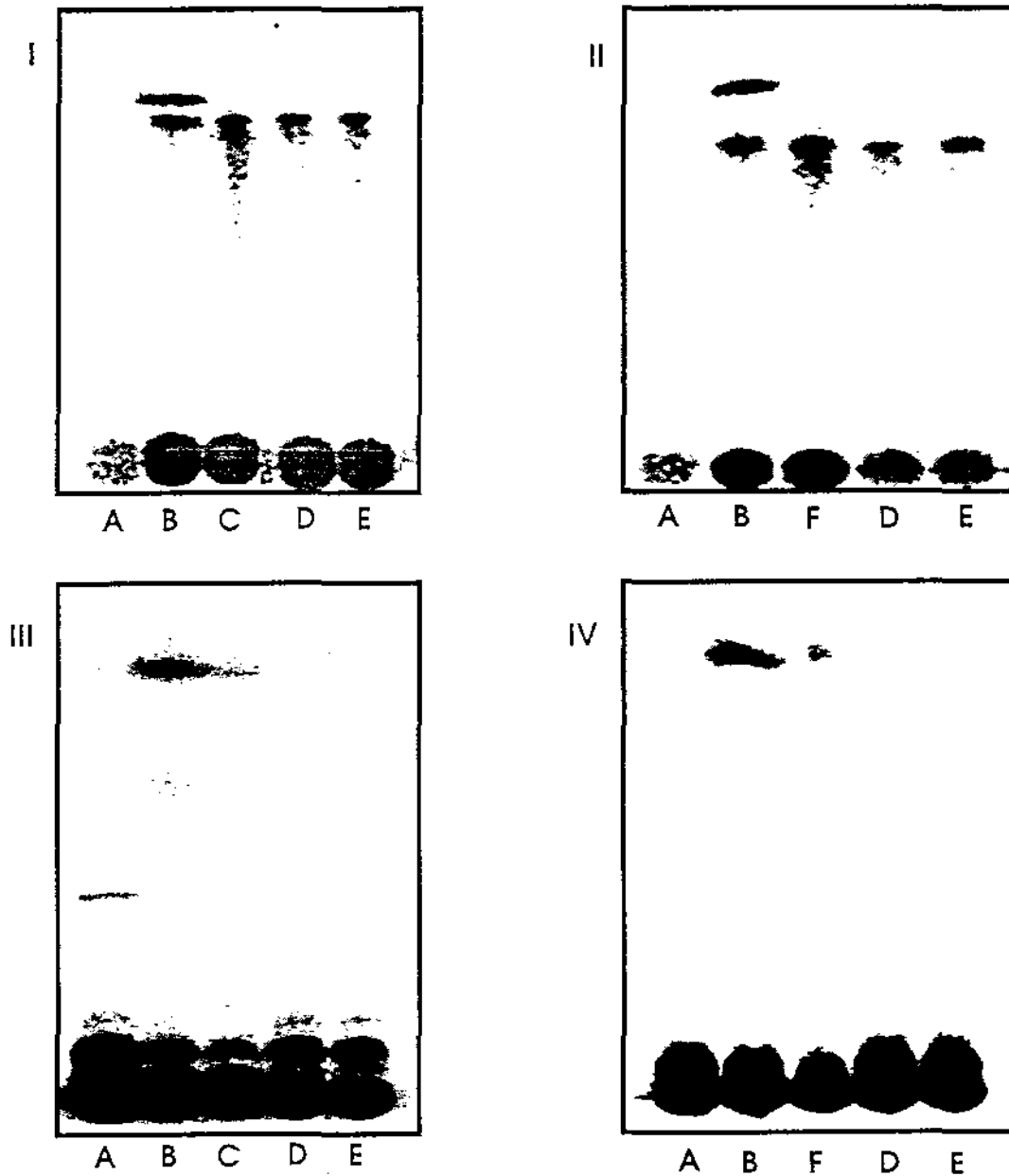
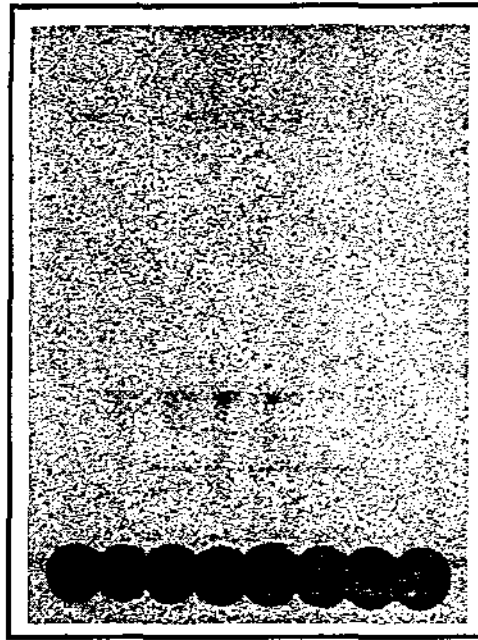


Figura 20. Cromatografías en capa fina (TLC) de los factores de nodulación producidos por la mutante *nodS::Kam1-20* complementada con el gen *nodS* de *R. tropici* (SRt/1-20) o con el *nodS* de *R. loti* (SRl/1-20). I y III) complementación con SRt/1-20, respectivamente usando glucosamina y metionina. II y IV) Complementación con SRl/1-20, respectivamente usando glucosamina y metionina. A) RSP900, B) CIAT899, C) SRt/1-20, D) 1-20, E) pMP3510/1-20, y F) SRl/ 1-20.



RSP900
899
3510/899
SRt/899
SRl/899
1-20
SRt/1-20
SRl/1-20

Figura 21. Cromatografía en capa fina de extractos butanólicos de distintos cultivos de cepas bacterianas incubadas con sodio(³⁵S) sulfato. Las cepas SRt/899 y SRt/1-20 contienen el gen *nodS* de *R. tropici*. Las cepas SRl/899 y SRl/1-20 contienen el gen *nodS* de *R. loti*. La cepa 3510/899 fué usada como un control, ya que únicamente porta el plásmido pMP3510 (donde se subclonaron los genes *nodS* de *R. tropici* y de *R. loti*).

VI.7 ANÁLISIS EN TLC DE LOS FACTORES NOD PRODUCIDOS POR UNA MUTANTE EN *nodS* DE *Rhizobium etli* (pRP17.1).

Dado el estudio previo de la caracterización inicial del gen *nodS* de *R. etli* (M.A. Villalobos, tesis de licenciatura, 1993) quisimos también analizar la participación del *nodS* de *R. etli* CE3 en la metilación de factores de nodulación. Para ésto, se realizaron una serie de TLCs usando glucosamina y metionina marcada radioactivamente.

En un primer experimento, extractos butanólicos de las cepas CE3, RSP900, 2001/991.25 y 2001/pRP17.1 (ver tabla 4) fueron incubados con 0.5 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ de *L*-(metil- ^{14}C)-metionina y 1.5 μM de naringenina como inductor de los genes de nodulación. Los resultados obtenidos muestran que la cepa mutante en *nodS* es incapaz de incorporar el grupo metilo radioactivo a sus factores de nodulación (Fig. 22 A).

Para estudiar en 2001/pRP17.1 un posible efecto polar sobre los genes *nodIJ* de *R. etli* provocado por la inserción del mini MudPR13 en el gen *nodS*, se realizó una cinética de exportación de los factores Nod de esta cepa, comparandola con aquellos exportados por el cósmido silvestre (991.25). El experimento se hizo con ambos cósmidos dentro del fondo genético de la cepa curada del pSym (2001). Las dos cepas se incubaron con 1.0 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ de *D*-(^{14}C)-glucosamina y se extrajeron los lipo-oligosacaridos con butanol. A los extractos butanólicos se les corrió en TLC. Los resultados presentados en la figura 22 (B), muestran que efectivamente existe un retraso en la capacidad de exportación de factores Nod por parte de la cepa 2001/17.1.

Con la idea de complementar la disminución en la exportación de los factores Nod por parte de la cepa 2001/17.1, a esta se le transfirió el plásmido pMP2421 el cual porta los genes *nodIJ* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* (ver la tabla 4), resultando en la cepa 2001/pMP2421. Las transconjugantes 991.25/2001, pRP17.1/2001 y la pMP2421/2001 se analizaron por TLC en una cinética de exportación de factores Nod, incubando los cultivos con 1.0 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ de *D*-(^{14}C)-glucosamina como precursor de los lipo-oligosacaridos y 1.5 μM de naringenina para inducir el promotor *nodA* de los vehículos derivados del

plásmido pMP3510(ver la tabla 4). Los resultados obtenidos muestran que la complementación se llevó a cabo, aunque el nivel de exportación de factor mostrado por la cepa 2001/pMP2421 resultó mayor al producido por la cepa con el cósmido silvestre (2001/991.25), demostrando que las proteínas Nod^U de *R. leguminosarum* bv. *viciae* son activas para la exportación de los factores Nod producidos por *R. etli* (Figura 22 C).

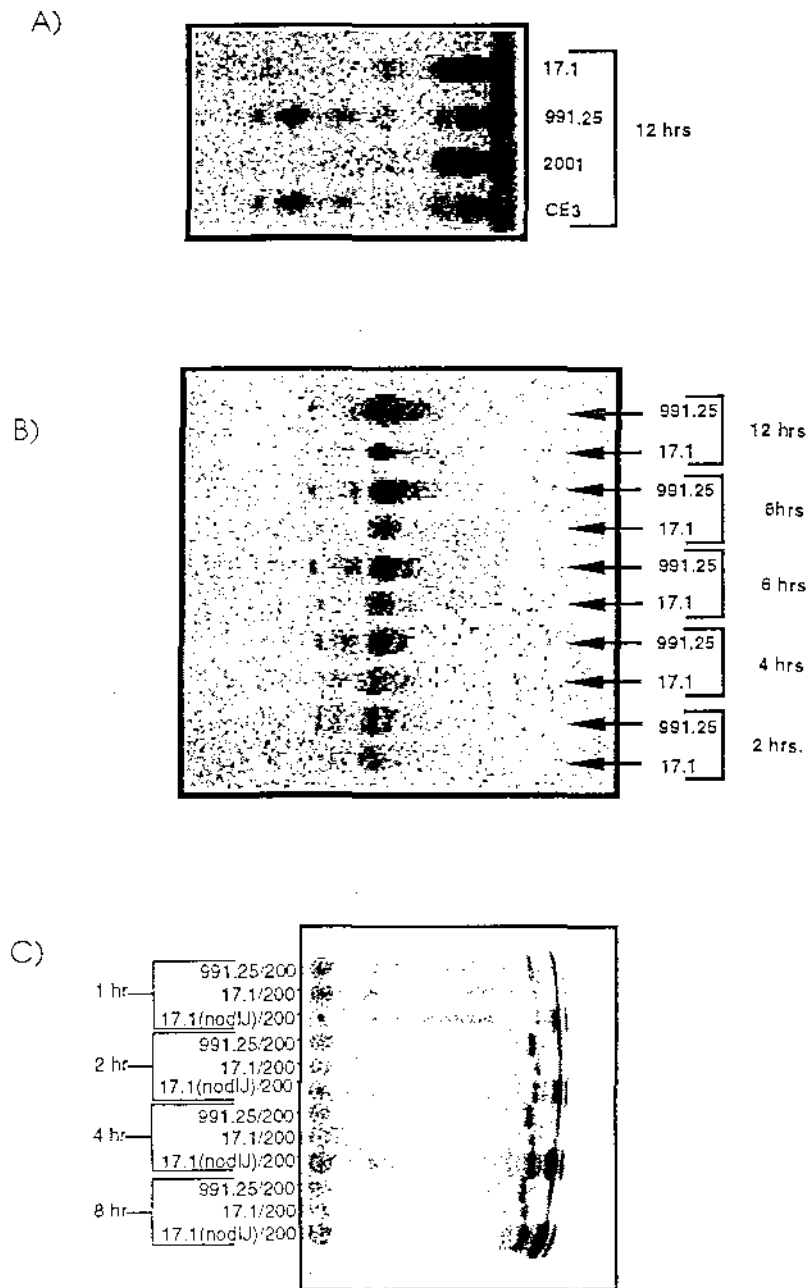


Figura 22. Cromatografías en capa fina de los factores Nod producidos por *R. etli*, y por las transconjugantes 991.25/2001, pRP17.1/2001 y pMP2421/2001, inducidas con $1.5\mu\text{M}$ de naringenina. A) TLC de cultivos incubados con metionina. B) Cinética de exportación de lipo-oligosacáridos producidos por cultivos incubados con glucosamina. C) Cinética de exportación de factores Nod de cultivos incubados con glucosamina.

VI.8 CINÉTICA DE NODULACIÓN DE LA MUTANTE *nodS::Kam1-20* EN RAÍCES DE *Leucaena*

Se llevaron a cabo experimentos para determinar el fenotipo de nodulación de la mutante *nodS::Kam1-20* sobre raíces de *leucaena*, realizando cinéticas de nodulación de plantas inoculadas con las cepas CIAT899, RSP900 y *nodS::Kam1-20*, de acuerdo al protocolo experimental descrito en la sección de material y métodos de este trabajo. La nodulación fue monitoreada primero a los 11 días después de la inoculación, y después a los 13, 15, 16, 17, 18, 21, 25 y 51 días. Desde los 11 hasta los 18 días las raíces fueron teñidas con azul de metileno y analizadas al microscopio estereoscópico debido al pequeño tamaño de los primordios y nódulos tempranos. De los 21 a los 51 días la cuantificación de nódulos se realizó a simple vista. Los resultados obtenidos muestran una clara disminución en el número (Figura 23) y tamaño (Fig. 24) de los nódulos inducidos por la mutante *nodS::Kam1-20* al compararla con el fenotipo de nodulación de la cepa silvestre CIAT899 en *Leucaena*. A los once días de haber sido iniciado el experimento, las plantas inoculadas con la cepa silvestre presentaron un promedio de 3.25 nódulos por planta, contra 0.9 nódulos por planta por parte de la cepa *nodS::Kam1-20*.

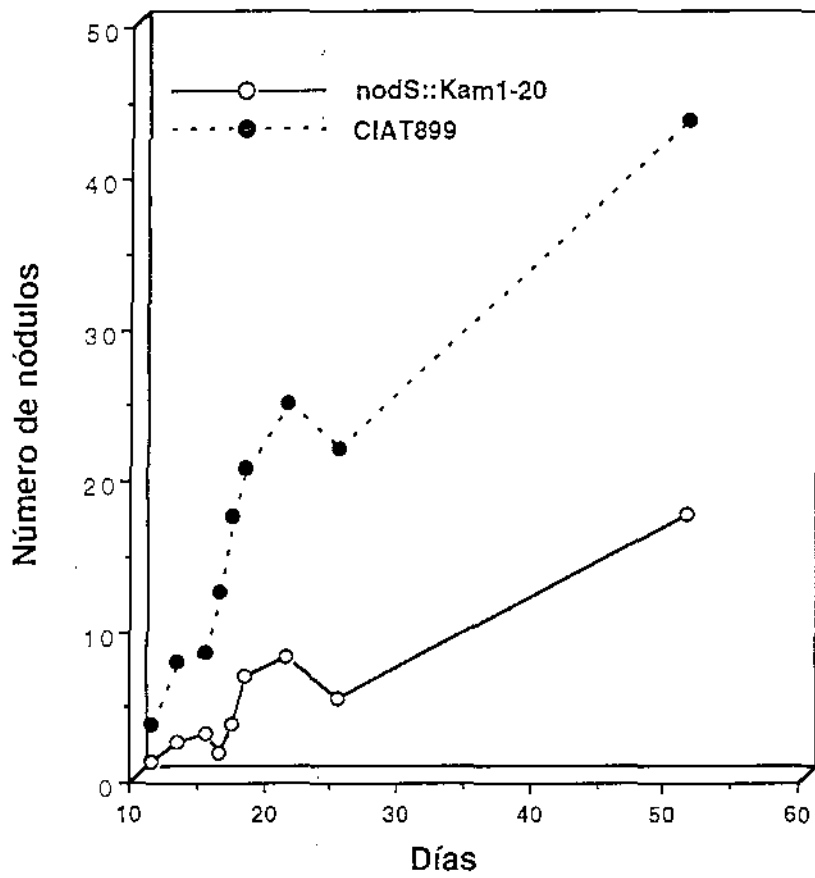


Figura 23. Cinética de nodulación de la cepa mutante *nodS::Kam1-20* sobre raíces de *Leucaena*. Los datos mostrados corresponden a un sólo experimento, cuantificando los nódulos de 12 plantas por cada monitoreo

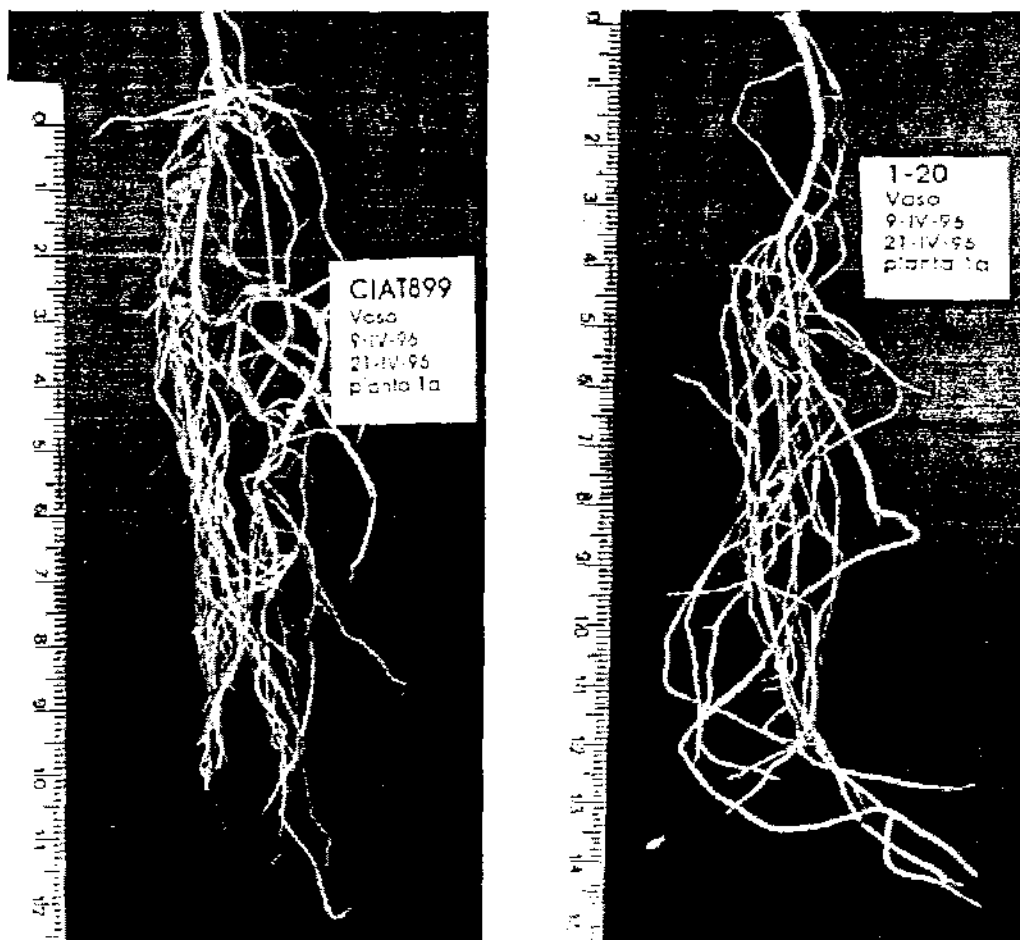


Figura 24. Nódulos formados en plantas de *Leucaena* por las cepas CIAT899 y nodS::Kam1-20. Las raíces inoculadas con la cepa RSP900, así como con otras sin inocular se incluyeron como controles negativos (ver la siguiente página).

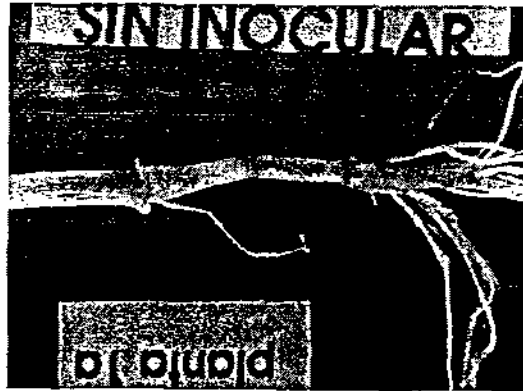
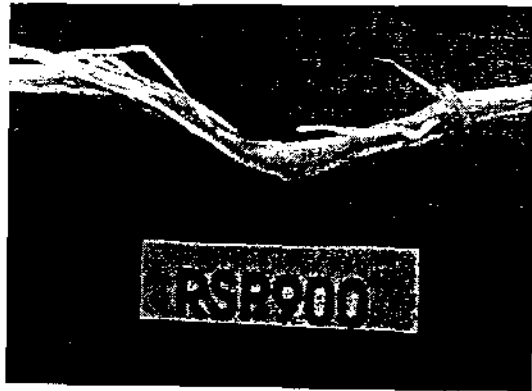
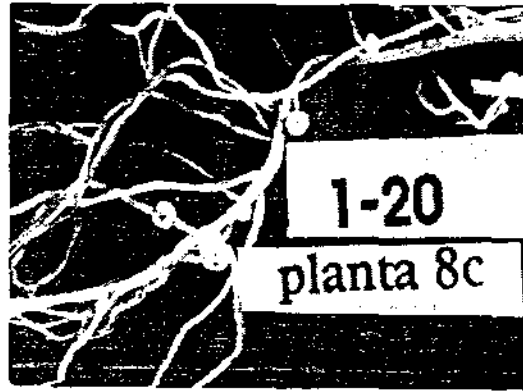


Figura 24. (Continuación).

VI.9 FIJACIÓN DE NITRÓGENO EN LOS NÓDULOS INDUCIDOS POR *nodS::Kam1-20* EN RAÍCES DE *Leucaena*.

Además, los nódulos formados por las plantas inoculadas con la mutante *nodS⁻* presentan una coloración blanca, mientras que los nódulos inducidos por la silvestre presentaban el típico color rosado de los nódulos fijadores de nitrógeno (Figura 24).

Para analizar la capacidad de fijación de nitrógeno de nódulos de 30 días, inducidos en *Leucaena* por la mutante *nodS::Kam1-20*, se realizó un experimento de determinación de reducción de acetileno, usando diez raíces completas y recién cortadas por cada una de las condiciones de inoculación usadas. La tabla 5 muestra claramente que la cepa mutante *nodS::Kam1-20* presenta valores de ARAa muy similares a las lecturas basales encontradas tanto en las raíces no inoculadas como en las inoculadas con la cepa curada del plásmido simbiótico.

CEPA	Muestra	# de Plantas	Tiempo	# nódulos/ muestra	Unidad de Area	ARA ^a
CIAT899	I	2	1 hr	48	21637	609.3
"	II	2	1 hr	20	3927	110.5
"	III	2	1 hr	38	13080	368.3
"	IV	2	1 hr	88	34634	975.2
"	V	2	1 hr	36	19857	559.1
Promedios				46		501.4
nodS::Kam1-20	I	2	1 hr	2	0	0
"	II	2	1 hr	4	0	0
"	III	2	1 hr	4	116.0	9.9
"	IV	2	1 hr	0	0	0
"	V	2	1 hr	5	0	0
Promedios				3		1.98
RSP900	I	2	1 hr	0	0	0
"	II	2	1 hr	0	0	0
"	III	2	1 hr	0	116	3.26
"	IV	1	1 hr	0	0	0
Promedios				0		0.815
SIN INOCULAR	I	2	1 hr	0	0	0
"	II	2	1 hr	0	0	0
"	III	2	1 hr	0	0	0
"	IV	1	1 hr	0	112	6.3
Promedios				0		1.575

Tabla V. Resultados obtenidos para la reducción de acétileno.

VI.10 ESTUDIOS HISTOLÓGICOS DE LOS NÓDULOS PRODUCIDOS POR *nodS::Kam1-20* EN RAÍCES DE *Leucaena*.

Los estudios histológicos realizados en nódulos de *Leucaena* inducidos por las cepas CIAT899 y *nodS::Kam1-20* muestran que estos nódulos presentan grandes diferencias (fig. 25). Primero, el número de células infectadas se reduce considerablemente en los nódulos inducidos por la mutante. Segundo, sin excepción todos los nódulos infectados por la mutante que se analizaron presentan una zona de aparente "colapsamiento" celular, la cual se localiza en la región contigua al meristemo nodular. La presencia de presuntos taninos aumenta en los nódulos infectados con la mutante, en relación de los infectados con la silvestre. La morfología general de los nódulos es más conservada en los inducidos por la silvestre, mientras que por el contrario, los inducidos por la mutante presentan una morfología variada que va desde redondos hasta ovalados, pero siempre con "accidentes" a lo largo de su circunferencia.

Tomando en cuenta todos los resultados anteriormente descritos, algunas macetas con plantas de *Leucaena* inoculadas con las cepas CIAT899 y *nodS::Kam1-20* fueron mantenidas en el invernadero por espacio de 64 días para su posterior estudio. La figura 26 muestra que las plantas inoculadas con la cepa mutante en *nodS* presenta una seria deficiencia en su capacidad de crecimiento, además de cierto nivel de clorosis.

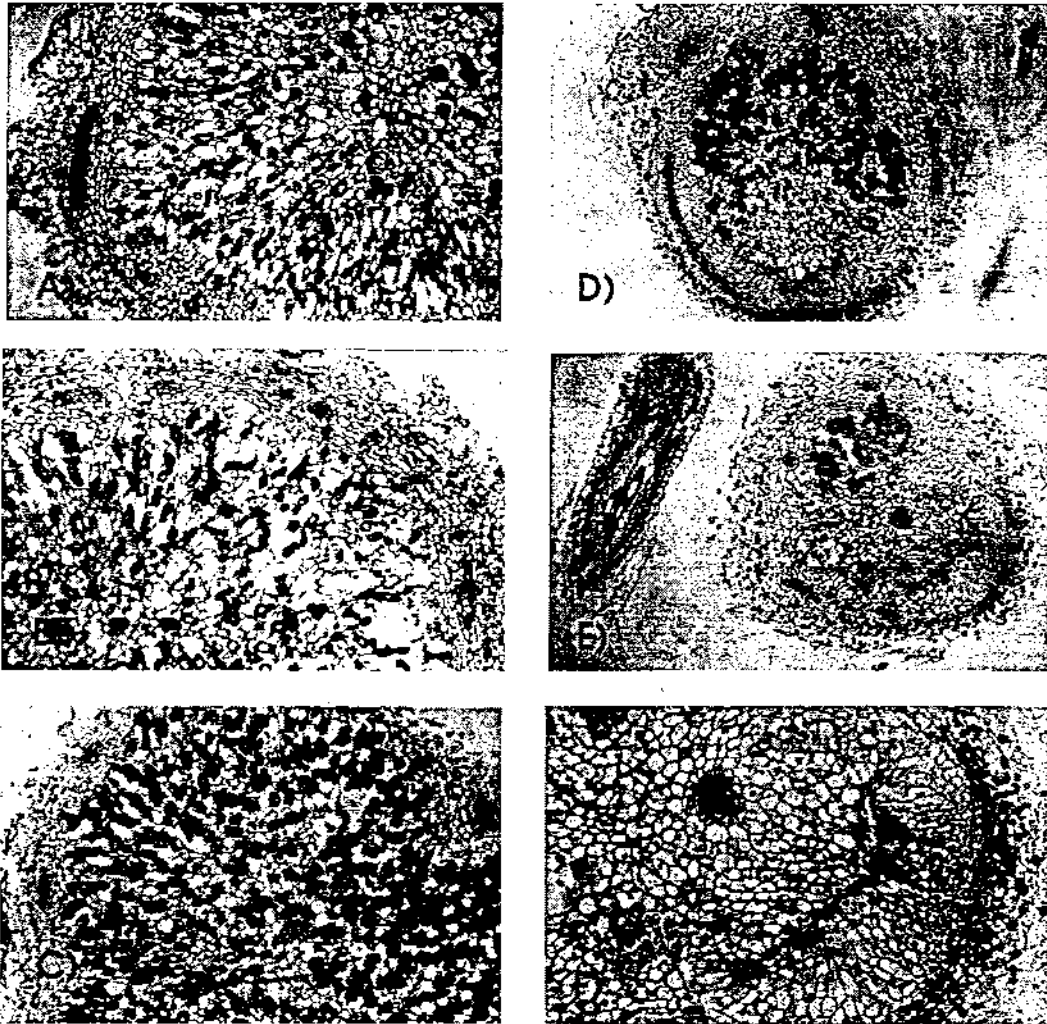


Figura 25. A, B y C) Micrografías de luz de nódulos de *Leucaena* infectados con la cepa CIAT899. D, E y F) Micrografías de luz de nódulos de *Leucaena* infectados con la cepa mutante *nodS::Kam1-20*.

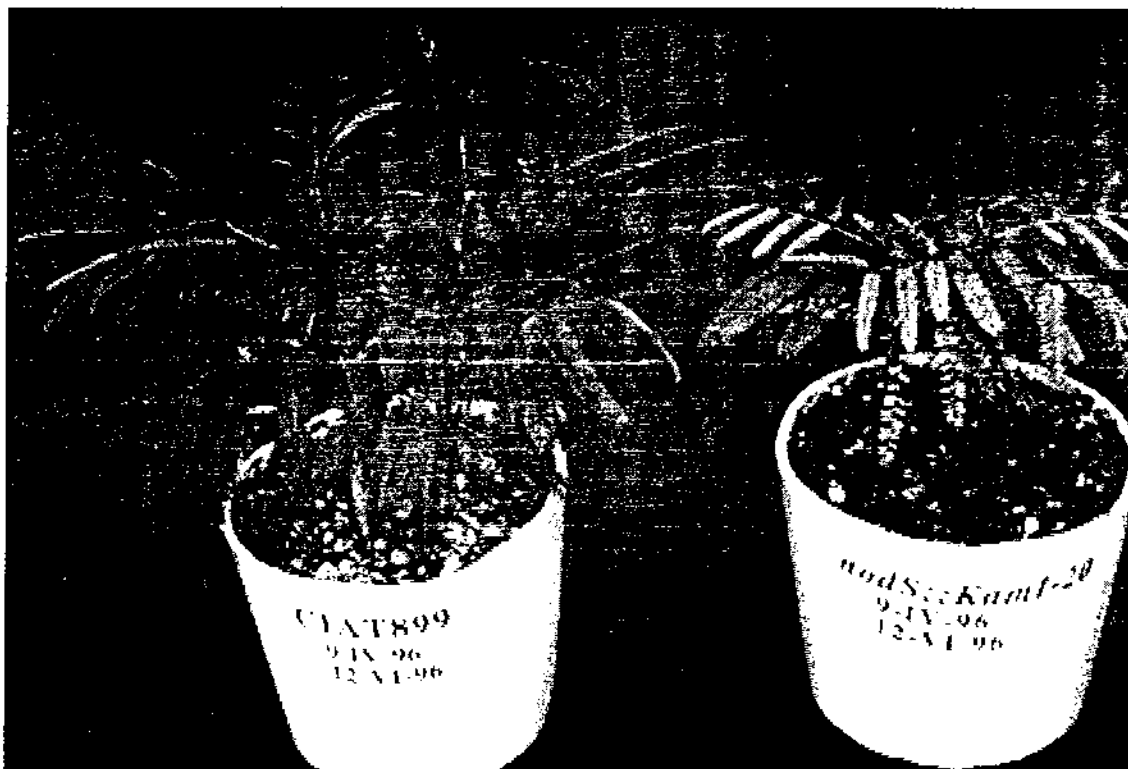


Figura 26. Ejemplares representativos de un experimento de nodulación en plantas de *Leucaena*, 64 días después de haber sido inoculadas.

VI.11 FENOTIPO DE NODULACIÓN DE LA CEPA MUTANTE *nodS::Kam1-20* SOBRE RAÍCES DE *Phaseolus vulgaris* VAR. NEGRO JAMAPA.

Para estudiar la importancia de la metilación de los factores Nod de *R. tropici* en la nodulación de frijol, se realizó una cinética de nodulación inoculando con la cepa mutante *nodS::Kam1-20* y se comparó con la cepa silvestre CIAT899. Después de la inoculación, las raíces se sacaron de las macetas a los 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 16 y 20 días, y se tiñeron con azul de metileno para facilitar la observación de primordios nodulares incipientes. Los datos presentes en la figura 27, muestran una disminución en la capacidad de nodular frijol por parte de la cepa mutante en *nodS*. Se usaron como controles negativos a plantas sin inoculo y a plantas inoculadas con la cepa curada del plásmido simbiótico.

Cinética de nodulación de *Rhizobium tropici* CIAT899 y de la mutante *nodS::Kam1-20* sobre raíces de *Phaseolus vulgaris*.

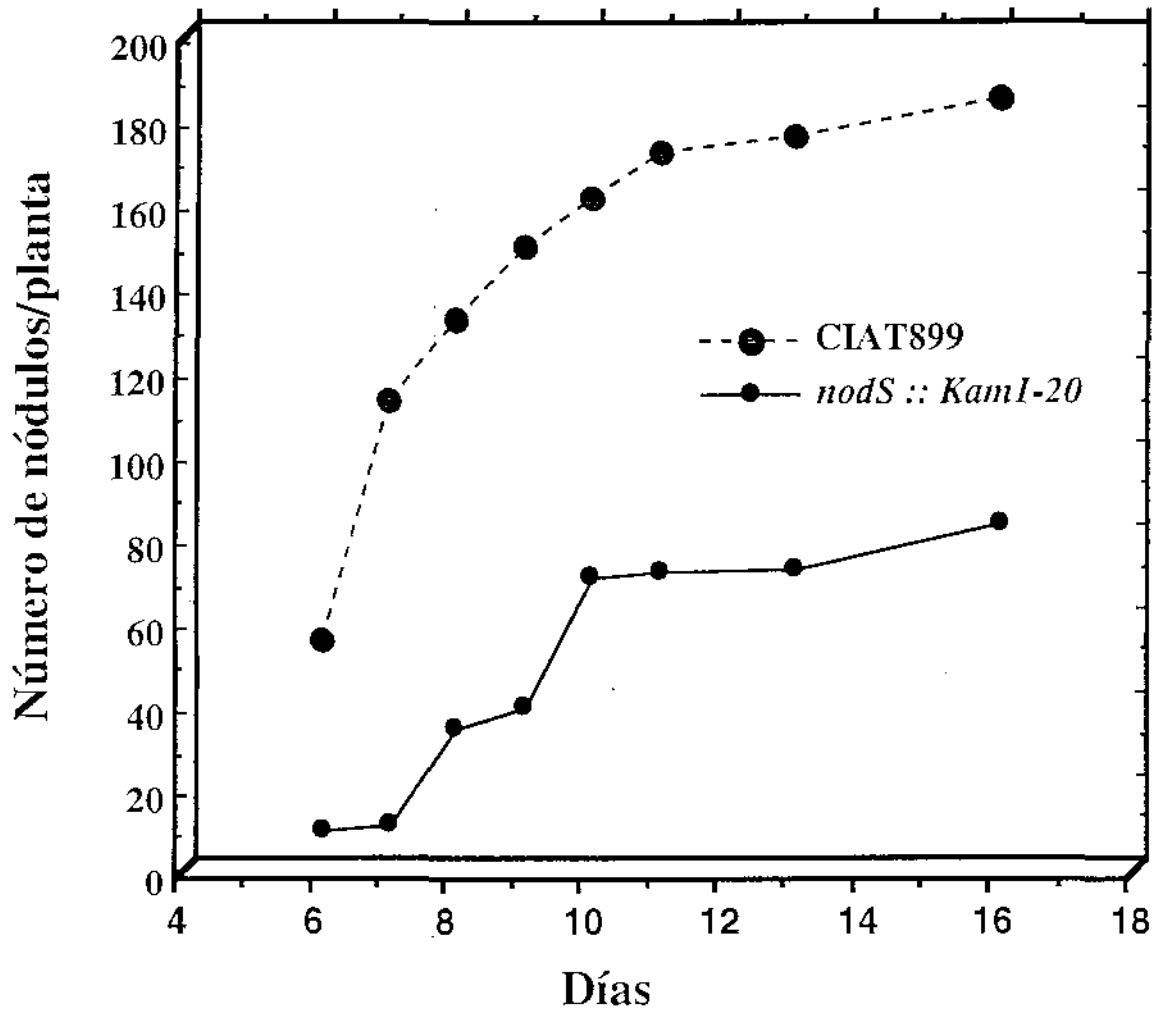


Figura 27. Cinética de nodulación de las cepas CIAT899 y *nodS::Kam1-20* en plantas de *P. vulgaris* variedad negro Jamapa.

VII DISCUSIÓN

Rhizobium tropici es una especie de amplio espectro de nodulación que es capaz de nodular plantas de *Phaseolus*, *Leucaena*, *Medicago* y *Macroptilium*. Además de esta capacidad para nodular muchas leguminosas no relacionadas filogenéticamente y que son de importancia agronómica, ésta especie es tolerante a pHs ácidos y a altas temperaturas, lo que la hace un modelo de estudio interesante.

En este proyecto de investigación, nos hemos centrado en estudiar algunos eventos moleculares que determinan la capacidad de la cepa CIAT899 de *R. tropici* para nodular varias leguminosas (particularmente *Phaseolus* y *Leucaena*). Como ya se mencionó en la Introducción, las barreras de especificidad dentro de esta simbiosis se encuentran determinadas principalmente por los llamados genes de nodulación bacterianos y las rutas metabólicas que estos codifican. Específicamente, en este trabajo se ha enfatizado en el estudio de la participación del gen *nodS* en la síntesis del factor Nod, y las repercusiones que tiene para la simbiosis la ausencia de un gen *nodS* funcional.

VII.1 LOCALIZACIÓN FÍSICA DEL GEN *nodS* DE *Rhizobium tropici* CIAT899

En *A. caulinodans*, el gen *nodS* se ubica dentro de un operón constituido por los genes *nodABCSUIJ* (Geelen *et al.*, 1993). Para el caso de *B. japonicum*, el gen *nodS* también se sitúa dentro del operón conformado por los genes *nodYABCSUIJ* (Göttfert *et al.*, 1990); un dato adicional en *B. japonicum* es que los genes *nodC* y *nodS* se encuentran sobrelapados por 71 pb. En *R. etli* cepa CE3, *nodS* se localiza corriente abajo de los genes *nodBC* y seguido por los genes *nodUIJ* (Vázquez *et al.*, 1991; Villalobos *et al.*, 1994). Aunque no ha sido demostrado conclusivamente, los datos de secuencia apuntan que tanto en *R. etli*, como en *A. caulinodans* y *B. japonicum*, el gen *nodS* se encuentra inmerso dentro de un operón que contiene a los genes *nod* comunes, y siempre corriente abajo del gen *nodC*

(ver figura 6 en resultados).

En *R. tropici* localizamos el gen *nodS* en los cósmidos pCV38 y pCV3804 previamente aislados (Vargas et al., 1990), dentro de la misma región que contiene a los genes comunes *nodABC*. Los resultados encontrados muestran que el tentativo gen *nodS* en *R. tropici* se encuentra localizado corriente abajo de *nodC*, como es el caso para *R. etli*, *B. japonicum* y *A. caulinodans*, encontrándose algunas modificaciones en el mapa de restricción que de esta región publicaron Vargas y colaboradores (1990). Estas variaciones fueron corroboradas por análisis de secuencia nucleotídica. La presencia de *nodS* en *R. tropici*, de alguna manera concuerda con la capacidad de esta especie para nodular *Leucaena*, ya que datos publicados por Lewin y colaboradores en 1990, muestran que mutantes *nodS*⁻ de *R. sp.* NGR234 resultan incapaces de nodular esta leguminosa. Además, la transferencia de *nodS* de *R. sp.* NGR234 al fondo genético de *R. fredii* (especie que solo nodula variedades silvestres de soya), confiere a esta de la capacidad para nodular *Leucaena* (Krishnan et al., 1992).

La caracterización del gen *nodU* en *R. tropici* se encontraba fuera de los objetivos de este proyecto, pero dado que en otras especies de *Rhizobium* los genes *nodS* y *nodU* se encuentran contiguos, se decidió realizar una serie de hibridaciones con el fin de saber si en el genoma de *R. tropici* también se encontraba presente el gen *nodU*. Precisamente, se encontró una señal de hibridación en la zona "corriente abajo" a la correspondiente a *nodS*. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 8 (B y D). Datos parciales de secuencia (no mostrados), confirman la existencia de una región altamente homologa a *nodU* de *R. sp.* NGR234. En base a estos resultados, podríamos hipotetizar que en *R. tropici* la organización estructural de los genes *nod* sería *nodABCSU*, y complementando ésta hipótesis con algunos de los datos presentados por J. L. Folch (tesis doctoral) (que encontró que existe hibridación con sondas heterólogas a los genes *nodU* en la región correspondiente a la localizada "corriente abajo" de la región de hibridación con *nodU* reportada en el presente trabajo), es

probable que la organización sea *nodABCSUIJ*.

VII.2 SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DEL GEN *nodS* DE *R. tropici* CIAT899

Resulta interesante que a pesar de la alta identidad encontrada entre las proteínas NodS de *R. tropici* y *R. sp.* NGR234 (53 %), en el nivel nucleotídico la identidad entre ambos genes sea únicamente de 20%. Esto pone en evidencia el alto grado de conservación de esta proteína entre estas dos especies bacterianas, a pesar de la gran divergencia existente a nivel de secuencia nucleotídica, lo que indica la importancia funcional que evolutivamente NodS ha jugado como parte de este complejo intercambio molecular entre estas bacterias y sus plantas hospederas. Curiosamente, es en *R. sp.* NGR234 donde se ha encontrado un claro fenotipo de nodulación en una mutante *nodS*⁻. Estas mutantes son incapaces de nodular plantas de *Leucaena*, una de las más de 70 especies vegetales que normalmente esta bacteria puede nodular. Además de *R. sp.* NGR234, la bacteria *R. tropici* CIAT899 es otra especie de *Rhizobium* que además de nodular *Leucaena* (entre otra leguminosas) también posee un gen *nodS*. Durante el transcurso de esta discusión se volverá a tocar este tema de la nodulación de *Leucaena* más ampliamente.

Por otro lado, al nivel nucleotídico, la identidad que presenta el gen *nodS* de *R. tropici* con los de *R. etli*, *B. japonicum* y *A. caulinodans* es de 48, 45 y 23 %, respectivamente. Curiosamente, Waelkens y colaboradores (1995), realizaron un "Southern" sobre DNA genómico de *R. etli* cepa CE3 (especie que únicamente nodula frijol) usando condiciones de baja astringencia, con la finalidad de encontrar alguna secuencia homóloga a *nodS*, utilizando una sonda heteróloga para *nodSU* aislada de *R. sp.* NGR234. Los resultados que ellos reportan son negativos. Sin embargo, varios meses antes de la publicación de ese artículo, nuestro grupo de investigación reportó la secuencia y caracterización preliminar del gen *nodS* de *R. etli* cepa CE3 (Villalobos *et al.*, 1994).

VII.3 LA CEPA MUTANTE *nodS*⁻ DE *R. tropici* PRODUCE FACTORES NOD NO METILADOS, ASÍ COMO UNA ALTERACIÓN GENERAL EN LA PRODUCCIÓN DE ESTOS

Los factores de nodulación producidos por cuatro de las doce cepas mutantes analizadas por Southern, fueron estudiadas en cromatografía en capa fina (TLC) para observar la producción de factores Nod. De tal manera, al incubar las cepas mutantes con *D*-(1-¹⁴C) glucosamina se observó en todas las mutantes la desaparición de una de las dos bandas típicas de factores Nod producidas por la cepa silvestre CIAT899. La banda que no se produjo es la que corresponde a los factores Nod que se encuentran sulfatados por la acción de NodH, según datos de Folch *et al.* (1996), lo cuál indicó una posible correlación entre la metilación y la sulfatación en los factores Nod producidos por *R. tropici* CIAT899 (fig. 19 A). Resulta lógico hipotetizar que NodH reconozca preferentemente factores Nod que ya se encuentren metilados por NodS para poder sulfatarlos. En páginas subsecuentes se discutirá un poco más sobre este asunto, en base a otro experimento que fué diseñado para abundar en este punto. A pesar de que esta es sólo una hipótesis basada en la observación por TLC, resulta por demás interesante la futura determinación de la estructura química de los factores de nodulación que las cepas mutantes en *nodS* producen (trabajo en proceso). Folch y colaboradores (1996) reportan la producción de al menos 16 diferentes tipos de factores de nodulación en *R. tropici* CIAT899, que varían en el número de monómeros de N-acetil-glucosamina (4 o 5), y en el tipo de sustituyentes que la componen (grupos sulfato, metilo, ácidos grasos, manosa), usando para ésta determinación diferentes técnicas de HPLC, Espectrometría de Masas, y Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas. Esto apoya al hecho de que *R. tropici* CIAT899 sea una especie de amplio espectro de hospederos, ya que se encuentra preparada con una gran batería de diferentes factores Nod para poder interaccionar varias leguminosas.

Por otro lado, para comprobar la pérdida de actividad de metiltransferasas, las mismas 4 cepas mutantes fueron incubadas con *L*-(metil-¹⁴C)-metionina. Extractos butanólicos de estos cultivos corridos en una placa

de sílica demostraron que todas las mutantes analizadas resultaron incapaces de metilar los factores Nod. Los resultados presentados en la figura 19(B) comprobaron que las cepas que tienen interrumpido el gen *nodS* no producen factores metilados. Esto concuerda con reportes en donde se había observado la participación de la proteína NodS en la *N*-metilación de los factores de nodulación de *R. sp.* NGR234 (Jabbouri *et al.*, 1995) y *A. caulinodans* (Geelen *et al.*, 1993; Geelen *et al.*, 1995) en donde se muestra que NodS es una metil-transferasa cuya actividad es específica sobre factores Nod. Los datos reportados para *R. sp.* NGR234 muestran que mutaciones en *nodS* y en *nodU* reducen drásticamente la producción de factores de nodulación, aunque con la excepción de los factores sulfatados (los cuales deben ser parcialmente *N*-metilados y mono-carbamilados) los demás son idénticos a los que produce la cepa silvestre (Jabbouri *et al.*, 1995). Debido a la posible existencia de otros genes que codifiquen funciones similares en NGR234, el análisis de la actividad de NodS de *R. sp.* NGR234 fué realizada en el fondo genético de *R. fredii* USDA257 (que a pesar de tener su propia copia de los genes *nodSU* estos no se transcriben debido a una delección en su región promotora). La cepa silvestre USDA257 produce factores Nod que difieren a lo producidos por NGR234 por la ausencia de grupos sulfato y acetilo sobre la 2-O-metilfucosa, además de carecer de los grupos *N*-metilo y carbamilo en su extremo no reductor. La introducción del gen *nodS* de *R. sp.* NGR234 en el fondo genético de *R. fredii* USDA257, provoca la metilación de pentámeros de *N*-acetilglucosamina, mientras que las especies tri y tetraméricas dejan de producirse. En resumen, Jabbouri y col. (1995) reportan que los niveles de factores de nodulación, su grado de oligomerización, y la *N*-metilación, se encuentran ligados a la actividad codificada por *nodS* en *R. sp.* NGR234. Resulta interesante que las cepas *nodS*⁻ de *R. tropici* CIAT899 aisladas en este trabajo también presenten un desajuste en la producción de factores de nodulación. Al parecer, no sólo la pérdida de *N*-metilación en sus factores Nod es la única diferencia entre estos y los producidos por la cepa silvestre CIAT899, aunque este comentario se

basa únicamente en la observación por TLC de la producción de factores Nod, y esto hace necesaria la determinación de la estructura química de los factores producidos por la mutante para saber a ciencia cierta que es lo que realmente pasa (determinación en proceso).

En *A. caulinodans* cepa ORS571, el análisis in vitro de NodS mostró que esta es una proteína que une S-adenosil-L- metionina (SAM) como donador del grupo metilo, y que ejerce su función específicamente sobre quitooligosacáridos deacetilados en su extremo no reductor ya que no puede metilar adecuadamente a quitooligosacáridos acetilados o acilados en su extremo no reductor, aunque se requiere un grado de polimerización de 2 a 6 monómeros de quitina para ser reconocidas apropiadamente por NodS (Geelen *et al.*, 1995). Estos datos sugieren que el paso de metilación en la vía de biosíntesis de los factores Nod de *A. caulinodans* ocurre después de la deacetilación (llevada a cabo por NodB) y previamente a la incorporación del ácido graso (por acción de NodA) en sus quitooligosacáridos. Al deacetilar el extremo no reductor de los quitooligosacáridos, la proteína NodB provoca la formación de un grupo amino libre. Esto apoya la idea de que NodB actúe de manera previa a la metilación efectuada por NodS, ya que un grupo amino libre es mucho más nucleófilo (y de hecho, un mejor sustrato para la metilación) que una amida (presente en los quitooligosacáridos y en los factores Nod) (Geelen *et al.*, 1995).

Por otro lado, proyectando estas observaciones hacia lo que podría estar ocurriendo en *R. tropici* CIAT899, es posible que la ausencia de quitooligosacáridos deacetilados metilados y la presencia de quitooligosacáridos deacetilados en una cepa *nodS*⁻ de CIAT899, podría estar afectando el reconocimiento de NodA por su sustrato, y de esta manera alterar el patrón de factores Nod que la cepa silvestre normalmente produce. Reportes recientes presentan datos novedosos sobre la especificidad del tipo de ácidos grasos que transfiere la proteína NodA (Ritsema *et al.*, 1996; Debelle *et al.*, 1996). Tal parece que la antigua idea de que los genes *nod* comunes son intercambiables entre especies sin afectar el espectro de

hospederos en la cepa receptora debe ser revisada, ya que en estos artículos queda demostrado que la proteína NodA de cada especie de *Rhizobium* presenta una especificidad diferente para la transferencia de un ácido graso al esqueleto de los factores de nodulación. Spaink y col. (1995), reportaron datos que sugieren que para el caso de *R. leguminosarum*, el ácido graso de los factores Nod de esta especie es un determinante importante de hospederos. De lo anterior surge la pregunta, ¿La ausencia de factores metilados en una mutante *nodS*⁻ afecta, o no, a la especificidad de transferencia de los ácidos grasos por parte de la proteína NodA endógena, alterando de esta manera el tipo de ácidos grasos que se incorporan al esqueleto del factor? Dentro de los diferentes tipos de factores Nod producidos por *R. tropici* (Folch *et al.*, 1996), la gran mayoría de los quito-oligosacáridos que se encuentran metilados presentan un ácido graso C18:1, aunque también se encuentran de mayor a menor proporción C18:0, C16:1, C16:0, C20:1 y C20:0. Tomando en cuenta esto, se podría esperar que la proporción en el tipo de ácidos grasos unidos al esqueleto de los factores Nod producidos por una cepa *nodS*⁻ (que no están metilados) pudiera ser diferente a la presentada por la cepa silvestre CIAT899. Si este fuera el caso, es probable que se afecte como consecuencia, el espectro o la capacidad de realizar simbiosis con diferentes hospederos. Sólo hasta que se determine la estructura de los factores Nod producidos por alguna de las cepas *nodS*⁻ aisladas en este trabajo será posible despejar esta incógnita.

Otro aspecto que se cubrió en este proyecto es el de la complementación de una de las cepas mutantes *nodS*⁻ de *R. tropici* con el mismo gen *nodS* de *R. tropici*, y con el *nodS* de *R. loti*. La intención era la de reestablecer el patrón de metilación en los factores Nod producidos por la cepa mutante. Ambos genes fueron introducidos a la cepa mutante, vía de un plásmido conteniendo el promotor del gen *nodA* de *R. leguminosarum* *bv. viciae*. Los datos presentados en el apartado de resultados muestran que, al menos por TLC, se observa una muy baja producción de factores Nod metilados por parte de la mutante complementada con cualquiera de los

dos genes *nodS* (Fig. 20 II y IV). Además, cuando los cultivos fueron expuestos a glucosamina radioactiva, en las cepas complementadas no se detectó la producción de la banda que corresponde a la mezcla de factores Nod sulfatados en *R. tropici*, ya que éstas dieron el mismo perfil de quito-oligosacáridos que produce la cepa mutante llamada *nodS::kam1-20* (Fig. 20 I y III). Es sorprendente que se observe (aunque en un nivel muy bajo) la síntesis de factores metilados y que no se restituya la producción de la banda que corresponde a los factores sulfatados. No se puede descartar la posibilidad de que la producción de factores metilados fué demasiado baja como para poder observar la producción de la banda de factores sulfatados. También, esto pudiera explicarse por el efecto multicopia que provoca el plásmido que usamos para los ensayos de complementación. Es posible que para la síntesis adecuada del factor Nod se requiera un nivel de expresión semejante al del gen *nodS* silvestre. Este es un problema que surge de manera frecuente en este tipo de experimentos.

A pesar de no haberse mencionado anteriormente, es conveniente decir que con el fin de investigar los niveles de expresión de *nodS* en *R. tropici*, se intentó la realización de experimentos tipo Northern, sin embargo no pudimos obtener RNA en cantidades suficientes. Para tratar de solucionar esto, se ensayaron diferentes protocolos sin éxito. Tal parece que este es un problema particular para *R. tropici*, ya que al mismo tiempo se logró obtener RNA de *R. etli*, bacteria que fué utilizada a manera de control en nuestras extracciones. Es posible que este problema pueda ser solucionado utilizando técnicas más sensibles como el RT-PCR que utilizan muy poco RNA.

Por otro lado, el uso de sulfato radioactivo nos permite proponer que existe una relación directa entre la metilación y la sulfatación de los factores Nod producidos por *R. tropici* CIAT899. La falta de incorporación del grupo sulfato en los quito-oligosacáridos sintetizados por la mutante *nodS::kam1-20* (Fig. 21) es un dato más que apoya a nuestra hipótesis. La producción de factores sulfatados se ve ligeramente incrementada en la cepa silvestre CIAT899 cuando se le introduce (vía un plásmido) una copia extra de su

propio gen *nodS* o cuando se utilizó el gen *nodS* de *R. loti*. El hecho de que no se observe producción de factores sulfatados en la cepa *nodS::kam1-20* cuando se le complementa, puede explicarse por el simple hecho de que, como se discutió anteriormente, ésta cepa complementada produce una muy baja cantidad de factores metilados que preferentemente pudieran ser sulfatados por la acción de NodH en un paso posterior dentro de la biosíntesis de los factores Nod. Alternativamente, no se descarta la posibilidad de que en la mutante, la región de NodS que es responsable para la unión de SAM (S-adenosil-L-metionina) pudiera estar expuesta, y titulando de esta manera la disponibilidad de SAM.

Por otro lado, Poupot y colaboradores en 1995, reportaron un análisis bioquímico que sugiere una probable relación entre la sulfatación y la metilación de los factores Nod producidos por la cepa 299 de *R. tropici*, cepa relacionada filogenéticamente a la CIAT899. Este grupo propone que en esa cepa, la fuente interna de intermediarios sulfatados no es suficiente para asegurar una completa O-sulfatación ni una eficiente N-metilación de sus factores, ya que es posible que dentro del metabolismo del azufre en la bacteria, exista una competencia entre la activación de formas de sulfato oxidadas (para la O-sulfatación) y reducidas (para la N-metilación). Por el contrario, nuestros datos sugieren cosas diferentes. Si en *R. tropici* 899 existiese una competencia entre la metilación y la sulfatación por intermediarios comunes, entonces la cepa mutante *nodS::kam1-20* tendría que producir preferentemente factores sulfatados, cosa que no ocurre.

VII.4 UNA MUTANTE *nodS*⁻ DE *R. etli* (pRP17.1) PRODUCE FACTORES NOD NO METILADOS, ADEMÁS DE PROVOCAR UN EFECTO POLAR SOBRE LOS GENES *nodIJ*.

R. etli cepa CE3 es una especie de espectro de nodulación reducido, que induce nódulos en plantas del género *Phaseolus*. La organización estructural de los genes *nod* en esta especie es muy singular, ya que el gen *nodA* se encuentra separado por al menos 20 kb de la unidad transcripcional conformada por los genes ORF1, ORF2, *nodBCSUIJ* (Fig.6) (Vázquez *et al.*, 1991;

Villalobos M.A., tesis de licenciatura, 1993). Los factores Nod producidos por esta especie constan básicamente de pentasacáridos de *N*-acetilglucosamina con el extremo no reductor *N*-metilado y *N*-acilado con ácido *cis*-vaccénico (C18:1) o ácido esteárico (C18:0), y que además llevan un grupo carbamilo en C4; por otro lado el extremo reductor se encuentra substituído en la posición C6 con *O*-acetilfucosa (Cárdenas *et al.*, 1995). La producción de factores Nod metilados correlaciona con la presencia del gen *nodS* en *R. etli* CE3 (Villalobos *et al.*, 1994).

La cepa llamada pRP17.1, es una mutante *nodS*⁻ que lleva una inserción del mini MudII PR13 en el gen *nodS* localizado en un cósmido (991.25) que porta la región de nodulación de *R. etli* CE3 dentro del fondo genético de la cepa 2001 que es una curada del plásmido simbiótico derivada de la silvestre CE3. La falta de incorporación del grupo metilo radioactivo en los quitooligosacáridos producidos por la cepa mutante pRP17.1 (Fig. 22 A) es un dato que sugiere que en *R. etli*, al igual que en *R. tropici*, *R. sp.* NGR234 y *A. caulinodans*, el gen *nodS* codifica para una metiltransferasa que metila a factores Nod. Un problema que aparece al usar transposones para la obtención de mutantes en genes de un operón, es que se puede provocar un efecto polar en la expresión de los genes que se localizan en la misma unidad transcripcional. En *R. etli*, los genes *nodI* y *nodJ* se encuentran hacia abajo del gen *nodS*, probablemente dentro de un mismo operón, como se ha observado por datos de secuencia (N. Nava, comunicación personal). Se ha propuesto que los genes *nodI* y *nodJ* codifican para proteínas encargadas de la excreción de los factores Nod (Vázquez *et al.*, 1993; Spaink *et al.*, 1995; Cárdenas *et al.*, 1996). La cinética de excreción de factores Nod marcados con glucosamina radioactiva realizada en *R. etli* muestra que efectivamente la mutación en *nodS* provoca un efecto polar sobre la actividad de NodI y NodJ, ya que desde el inicio del monitoreo la cepa que porta el cósmido silvestre 991.25 secreta mayor cantidad de quitooligosacáridos (Fig. 22 B). Este mismo fenotipo se mantiene en mutantes *nodI* y mutantes *nodJ*, de ahí que queda descartada la posibilidad de que el

problema en la secreción sea debida a una probable disminución en la síntesis de factores mas que a la apropiada secreción de estos. Además, datos de nuestro laboratorio muestran que el nivel de síntesis de factores Nod se mantiene en las mutantes *NodI* y *nodJ*, sólo que la mayoría de estos se quedan retenidos en el interior de la bacteria (Cárdenas *et al.*, 1996), lo que pone de manifiesto la posibilidad de que existan otros sistemas de secreción alternos a *NodIJ*.

Por otro lado, en este trabajo de tesis se logró la introducción de un plásmido que porta los genes *nodIJ* de *R. leguminosarum bv. viciae* (pMP2421) a la cepa mutante en *nodS* (pRP17.1). La cinética de excreción de factores Nod muestra una recuperación en los niveles de excreción en la mutante *nodS*⁻ que porta el plásmido pMP2421, e inclusive estos niveles llegan a ser muy superiores a los que presenta la cepa que porta el cósmido silvestre 991.25. Este es un dato importante ya que demuestra que la síntesis de quito-oligosacáridos en la mutante *nodS*⁻ se mantiene, y que la limitante en el bajo nivel de secreción esta dada por el efecto polar que sobre *nodI* y *nodJ* provoca la inserción del mini MudII PR13. Además, también queda de manifiesto que las proteínas *NodIJ* de *R. leguminosarum bv. viciae* son activas para la secreción de los factores Nod producidos por *R. etli*. En nuestro conocimiento, esta es la única evidencia presentada por TLC de que genes *nodIJ* heterólogos puedan complementen a una cepa deficiente en la secreción de factores Nod. Sería muy interesante analizar si estas proteínas heterólogas presentan alguna preferencia para la exportación de un determinado tipo de factor Nod, o si secretan sin distinción los diferentes quito-oligosacáridos que sintetiza *R. etli* CE3, aunque para esto se necesitaría utilizar técnicas como HPLC y espectrometría de masas.

VI.5 A PESAR DE SER DISPENSABLE PARA LA NODULACIÓN DE *Leucaena* Y *Phaseolus*, LA EXPRESIÓN DE *nodS* ES REQUERIDA PARA UN ADECUADO DESARROLLO DEL NÓDULO SIMBIÓTICO.

Una de las interrogantes iniciales en este proyecto era precisamente si el gen *nodS* era, o no, necesario para la nodulación de *Leucaena*, ya que

diferentes antecedentes apuntaban hacia que este gen era importante, sino es que indispensable, para que se logrará la nodulación de especies de *Leucaena* (ver apartado de antecedentes). Un enfoque inicial para contestar esta pregunta fué la realización de cinéticas de nodulación sobre plantas de *Leucaena*, comparando las capacidades de *R. tropici* CIAT899 y de la mutante *nodS*⁻ llamada *nodS::kam1-20* para la inducción de nódulos sobre raíces de plantas de este género (Fig. 23). Los resultados obtenidos muestran que a pesar de tener interrumpido el gen *nodS*, la cepa *nodS::kam1-20* es capaz de nodular a *Leucaena*, aunque en una proporción marcadamente menor a la inducida por la cepa silvestre CIAT899.

Un hecho importante de mencionar, es que la aparición de nódulos en las plantas inoculadas con cualquiera de las dos cepas ocurrió de manera sincronizada a los 11 días después de la inoculación. Lo anteriormente expuesto descarta la posibilidad de que al mutar el gen *nodS* estuviéramos provocando un efecto polar sobre genes posteriormente dispuestos a *nodS*, tomando en cuenta que la estrategia usada para la mutagénesis fué diseñada para evitar problemas de este tipo (ver apartado de resultados).

Un caso de efecto polar fué el que se encontró años antes en la mutante *nodS*⁻ (pRP17.1) de *R. etli*, donde se observa un retraso de 5 días en la aparición de nódulos, así como una importante reducción en el número de estos cuando plantas de frijol son inoculadas con esta cepa, en comparación con la cepa que porta el cósmido "silvestre" (991.25) (M.A. Villalobos, tesis de Licenciatura, 1993). Tomando en cuenta lo que a la capacidad secretora de factores Nod en ambas cepas se refiere, como se discutió en páginas anteriores, existe un efecto polar sobre los genes *nodJ* en la cepa pRP17.1. Tomando en cuenta lo anterior, es probable que el fenotipo de nodulación presentado en mi tesis de Licenciatura para la mutante pRP17.1, sea debida directamente a la deficiencia en la secreción de factores Nod más que a la falta de factores Nod metilados. Tal parece, que la bacteria necesita una rápida y eficiente síntesis y secreción de los factores de nodulación para evitar la respuesta de defensa de las plantas (quitinasas,

oxidantes, cambios hormonales, etc), asegurando de esta manera, una nodulación exitosa.

Por lo que se refiere al fenotipo de nodulación sobre *Leucaena*, presentado por la mutante *nodS::kam1-20*, un dato interesante es que los nódulos inducidos por esta cepa son invariablemente de una coloración blanca y de un tamaño pequeño cuando se les compara con los inducidos por la cepa silvestre, que presentaban siempre el típico color rosado que presentan los nódulos fijadores de nitrógeno (Fig. 24). El ensayo de reducción de acetileno que se realizó, muestra claramente que la cepa mutante *nodS::kam1-20* presenta valores de ARA similares a los basales encontradas tanto en la raíces no inoculadas como en las tratadas con la cepa curada del plásmido simbiótico, mientras que la cepa silvestre induce nódulos que sí fijan nitrógeno de una manera adecuada. Esto pone de manifiesto el papel que juega el grupo metilo en los factores Nod de *R. tropici*, que si bien no es requerido para la inducción de nódulos en *Leucaena*, éste si parece requerirse, ya sea directa o indirectamente, para que se lleve a cabo una simbiosis exitosa con esta leguminosa.

Aunado a lo anterior, los estudios histológicos realizados mostraron claramente que los nódulos de *Leucaena* inducidos por la cepa *nodS::kam1-20* presentan una serie de marcadas diferencias con respecto a los inducidos por la cepa silvestre. En primer lugar se observa que el número de células vegetales infectadas se reduce considerablemente en aquellos nódulos inducidos por *nodS::kam1-20*; segundo, sin excepción todos los nódulos infectados por la mutante que se analizaron, presentan una zona de aparente colapsamiento celular, la cual se localiza en la región contigua al meristemo nodular; tercero, la presencia de presuntos taninos aumenta en los nódulos infectados por la mutante; y cuarto, la morfología general de los nódulos es más conservada en los inducidos por la silvestre, mientras que por el contrario, los inducidos por la cepa *nodS::kam1-20* presentan una morfología variada que va desde redondos hasta ovalados, pero siempre con "accidentes" a lo largo de su circunferencia. Estos datos revelan, que la

expresión de *nodS* es un requerimiento indispensable para que se logre una adecuada simbiosis entre *R. tropici* CIAT899 y *Leucaena*, ya que sin la participación de NodS se producen nódulos con un bajo nivel de infección, amorfos y sin la capacidad de fijar nitrógeno.

La participación de *nodS* en la nodulación de *Leucaena* también ha sido analizada por otros grupos. Por ejemplo, en *R. sp.* NGR234 se requiere de la participación de *nodS* para lograr una nodulación exitosa en *Leucaena*, ya que al inocular estas plantas con una cepa que tiene una delección de 9 kb que incluyen a *nodS*, o bien utilizando una cepa que porta una inserción en el gen *nodS*, se provoca una disminución del 90% en la capacidad de inducir nódulos, con respecto a la cepa silvestre NGR234 (Lewin *et al.*, 1990). A diferencia de lo observado en nuestro grupo, estos nódulos están vacíos, esto es, no son infectados por ninguna cepa *nodS*⁻ de NGR234. Además, la anatomía vascular de estos nódulos es parecida a la de una raíz, ya que presentan un córtex amplio con una pequeña región vascular al centro.

Los taninos son componentes de la células vegetales, y forman parte de las llamadas sustancias ergásticas, que son inclusiones de materiales relativamente puros, frecuentemente almacenadas en plástidos o vacuolas. A los taninos se les han atribuido diversas funciones, que van desde inhibidores del crecimiento, agentes alelopáticos, o protectores contra el ataque por bacterias y hongos. Si efectivamente son taninos las inclusiones que se acumulan en la periferia de los nódulos inducidos por la cepa *nodS::kam1-20* en *Leucaena*, es probable que su producción sea inducida por la planta para defenderse de la infección de una bacteria que no reúne los requisitos indispensables para "engañar" o "vencer" las barreras que el sistema de defensa que la planta utiliza ante una infección, provocando de esta manera, que se detenga el crecimiento del nódulo y que la infección se vea suspendida. Esto explicaría el aparente colapsamiento celular, la baja infección y la morfología de los nódulos producidos por la mutante *nodS::kam1-20* en *Leucaena*. A su vez, sería muy interesante estudiar en estos nódulos la expresión de genes que participan en las diferentes respuestas de

defensa de la planta, tales como las chalconas-sintasa e -isomerasa, o la fenilalanin-amonio-liasas, por citar algunos.

¿Porqué los nódulos inducidos por la mutante *nodS*⁻ no fijan nitrógeno? Este hecho es difícil de explicar ya que ésta cepa sólo lleva mutado un gen de nodulación que no está relacionado a genes *fix* que llevan a cabo la fijación biológica de nitrógeno. Es posible que ésta deficiencia en fijación de nitrógeno sea consecuencia directa de la falta de un adecuado desarrollo del nódulo, como se ha discutido anteriormente. La aparente senescencia temprana a la que entran estos nódulos podría estar impidiendo la expresión de genes de la planta que codifiquen para proteínas necesarias para la fijación de nitrógeno. Una posible candidata puede ser la leghemoglobina. La leghemoglobina produce el típico color rosado de los nódulos fijadores de nitrógeno, ausente en los nódulos inducidos por la cepa *nodS::kam1-20*. En una simbiosis efectiva esta proteína se expresa en el nódulo, y su función es la de formar una barrera ante el oxígeno, asegurando de esta manera la creación del microambiente anaeróbico que necesita la nitrogenasa bacteriana para funcionar. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que la probable falta de expresión de ésta y tal vez de otras proteínas implicadas, sea debida a la incapacidad de los factores Nod no metilados producidos por la cepa *nodS::kam1-20* para inducir o provocar la expresión de éstas, más que una consecuencia de la senescencia que se lleva a cabo en estos nódulos. Esto pudiera estar hablándonos de una ramificación en la vía de transducción de la señal provocada por los factores Nod, y que en el caso de nuestra mutante ésta cascada se vea interrumpida en algún punto de regulación importante para el adecuado funcionamiento del nódulo; hablese de posibilidades, tales como segundos mensajeros (calcio, iP3, DAG), proteínas reguladoras (quinasas, fosfatasa, factores de transcripción) o inclusive niveles hormonales. El estudio de esta vía de transducción provocada por factores Nod en células vegetales está llamando fuertemente la atención de muchos grupos de investigación, aunque la información acumulada actualmente todavía es muy pobre.

Lamentablemente, la falta de tiempo impidió que se realizaran tanto un análisis histológico (en proceso) como experimentos de reducción de acetileno en los nódulos inducidos por la cepa *nodS::kam1-20* en *P. vulgaris*. A pesar de esto, los datos obtenidos en la cinética de nodulación que se realizó, sugieren que en frijol pudiera estar pasando algo similar a lo que ocurre en *Leucaena*. Como puede observarse en la figura 27, el monitoreo comenzó a realizarse a partir del sexto día después de la inoculación, y en este tiempo fueron identificados bajo el microscopio nódulos incipientes tanto en las plantas inoculadas con la cepa silvestre así como también en las inoculadas con *nodS::kam1-20*. Debido a que no se incluyeron tiempos más cortos en el experimento, no se descarta la posibilidad de un retraso en la aparición de nódulos en frijol inducidos por la mutante. Sin embargo, está claro que la mutante en *nodS*- de *R. tropici*, presenta una disminución marcada en el número y tamaño de los nódulos inducidos en *P. vulgaris*.

VIII CONCLUSIONES

-LA CEPA MUTANTE *nodS*⁻ EN *R. tropici* PRODUCE FACTORES NOD NO METILADOS, ASÍ COMO UNA ALTERACIÓN GENERAL EN LA PRODUCCIÓN DE ESTOS.

-UNA MUTANTE *nodS*⁻ DE *R. etli* (pRP17.1) QUE PRODUCE FACTORES NOD NO METILADOS, PROVOCA ADEMÁS UN EFECTO POLAR SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *nodJ*.

-A PESAR DE SER DISPENSABLE PARA LA NODULACIÓN DE *Leucaena* Y *Phaseolus*, LA EXPRESIÓN DE *nodS* ES REQUERIDA, DIRECTA O INDIRECTAMENTE, PARA LA FUNCIONALIDAD Y EL ADECUADO DESARROLLO DEL NÓDULO SIMBIÓTICO.

IX BIBLIOGRAFÍA

- Atkinson, E.M., & Long, S.R. 1992. Homology of *Rhizobium meliloti* NodC to polysaccharide polymerizing enzymes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5: 439-442.
- Banfalvi, Z., Nieuwkoop, A., Shell, M., Besl, L., Stacey, G. 1988. Regulation of nod gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Gen. Genet.* 214: 420-424.
- Baev, N., Endre, G., Petrovics, G., Banfalvi, Z., & Kondorosi. 1991. Six nodulation genes of nod box locus 4 in *R. meliloti* are involved in nodulation signal production: nodM codes D-glucosamine synthetase. *Mol. Gen. Genet.* 214: 420-424.
- Baev, N., Schultze, M., Barlier, I., Cann, H.D., Virelizier, H., Kondorosi, E., & Kondorosi, A. 1992. *Rhizobium nodM* and *nodN* genes are common nod genes: *nodM* encodes functions for efficiency of Nod signal production and bacteroid maturation. *J. Bacteriol.* 174: 7555-7565.
- Barnett, M.J. and Long S.R. 1990. DNA sequence and translational product of a new nodulation-regulatory locus: SyrM has sequence similarity to NodD proteins. *J. Bact.* 172: 3695-3703.
- Baureithel, K., Felix, G., & Boller, T. 1994. Specific, high affinity binding of chitin fragments to tomato cells and membranes. *J. Biol. Chem.* 264: 17931-17938.
- Bec-Feré, M.P., Krishnan, H.B., Promé, D., Savagnac, A., Pueppke, S., & Promé, J.C. 1994. Structures of nodulation factors from the nitrogen-fixing soybean symbiont *Rhizobium fredii* USDA257. *Biochemistry.* 33: 11782-11788.
- Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.B.J. & Spaink, H.P. 1992. *In vitro* transacetylating activity of the NodL protein of *R. leguminosarum* bv. *viciae*. In 6th International Symposium on the Molecular Genetics of plant-Microbe Interactions, Seattle, Washington, USA. 11-16 July, 1992.
- Bloemberg, G.V., Thomas-Oates, J.E., Lugtenberg, B.J.J., & Spaink, H. 1994. Nodulation protein NodL of *Rhizobium leguminosarum* O-acetylates lipo-oligosaccharides, chitin fragments and N-acetyl-glucosamine. *Mol. Microbiol.* 11: 793-804.
- Bloemberg, G.V., Kamst, E., Hartveld, M., van der Drift, K.M.G.M., Haverkamp, J., Thomas-Oates, J.E., Lugtenberg, B.J.J., & Spaink, H.P. 1995. A control domain of *Rhizobium nodE* protein mediates host specificity by determining the hydrophobicity of a fatty acyl moiety of nodulation factors. *Mol. Microbiol.* 16(6): 1123-1136.
- Bono, J.J., Rland, J., Nicolau, K.C., Bockovich, N.J., Estevez, V.A., Cullimore, J.V., & Ranjeva, R. 1995. Characterization of a binding site for chemically-synthesized lipo-oligosaccharidic NodRm factor in particulate fractions prepared from roots. *Plant J.* 7: 233-260.
- Brom, S., Martínez, E., Dávila, G., and Palacios, R. 1988. Narrow and broad-host range plasmids of *Rhizobium* spp strains that nodulate *Phaseolus vulgaris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1280-1283.
- Bullock, W.O., et al. (1987). *Biotechniques.* 5: 376-378.
- Campos, F., Carsollo, C., Kuin, H., Bisseling, T., Rocha-Sosa, M., & Sánchez, F. 1995. Characterization and gene expression of nodulin Npv30 from common bean. *Plant Physiol.* 109: 363-370.
- Cárdenas, L., Domínguez, J., Quinto, C., López-Lara, I., Lugtenberg, B.J.J., Spaink, H.P., Rademarker, G.J., Haverkamp, J., & Thomas-Oates, J.E. 1995. Isolation, chemical structure and biological activity of the lipo-oligosaccharide nodulation signal from *Rhizobium etli*. *Plant Mol. Biol.* 29: 453-464.
- Cárdenas, L., Domínguez, J., Santana, O. & Quinto, C. 1996. The role of the *nodI* and *nodJ* genes in the transport of Nod metabolites in *Rhizobium etli*. *Gene.* 173: 183-187.
- Carlson, R.W., San Juan, J., Bhat, U.R., Glushka, J., Spaink, H.P., Wijffjes, A.H.M., van Brussel, A.A.N., Stokkermans, T.J.W., Peters, N.K., & Stacey, G. 1993. The structures and biological activities of the lipo-oligosaccharide nodulation signals produced by type I and II strains of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Biol. Chem.* 268: 18372-18381.
- Carlson, R.W., Price, N.P.J., & Stacey, G. 1995. The biosynthesis of rhizobial lipo-oligosaccharide nodulation signal molecules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7: 684-695.
- Carsollo, C., Campos, F., Sánchez, F., & Rocha-Sosa, M. 1994. The expression of a chimeric *Phaseolus vulgaris* nodulin 30-GUS gene is restricted to the rhizobially infected cells in transgenic *Lotus corniculatus* nodules. *Plant Mol. Biol.* 26: 1995-2001.
- Cevallos, M. A., Vázquez, M., Dávalos, A., Espín, G., Sepúlveda, J., and Quinto, C. 1989. Characterization of *Rhizobium phaseoli* Sym plasmid regions involved in nodule morphogenesis and host-range specificity. *Mol. Microbiol.* 3: 879-889.

- Cren, M., Kondorosi, A. & Kondorosi, E. 1995. NodR controls expression of the *Rhizobium meliloti* nodulation genes involved in the core Nod factor synthesis. *Mol. Microbiol.* 15(4): 733-747.
- Csanádi, G., Szécsi, J., Kaló, P., Kiss, P., Endre, G., Kondorosi, A., Kondorosi, E. & Kiss, G.B. 1994. Enod12, an early nodulin gene, is not required for nodule formation and efficient nitrogen fixation in alfalfa. *Plant Cell.* 6: 201-213.
- Dart, P. 1977. Infection and development of leguminous nodules. In: *A treatise on dinitrogen fixation* (R.W.F. Hardy & W.S. Silver, Eds.), Sect. III, pp. 367-472. Wiley, New York.
- Davis, E.O. & Johnston, A.W.B. 1990. Regulatory functions of three *nodD* genes of *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. *Mol. Microbiol.* 3: 1567-1577.
- Debellé, F., Rosenberg, C., & Dénarie, J. 1992. The *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Azorhizobium* NodC proteins are homologous to yeast chitin synthases. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3: 317-326.
- Debellé, F., Plazanet, C., Roche, P., Pujol, C., Savagnac, A., Rosenberg, C., Promé, J.C., & Dénarie, J. 1996. The NodA protein of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium tropici* specify the N-acetylation of Nod factors by different fatty acids. *Mol. Microbiol.* 22(2): 303-314.
- DeJong, A.J., Heidstra, R., Spalink, H.P., Hartog, M.V., Meijer, E.A., Hendriks, T., LoSehivo, F., Terzi, M., Bisseling, T., Van Kammen, A., & DeVries, S.C. 1993. *Rhizobium* lipo-oligosaccharides rescue a carrot somatic embryo mutant. *Plant Cell.* 5: 615-620.
- Delwiche, C.C. 1970. The nitrogen cycle. *Scientific American.* 223, (3) 136-146.
- Delwiche, C.C. 1981. The cycle of Nitrogen and Nitrous Oxide. John Wiley & sons, Inc. 1-15.
- Demont, N., Debellé, F., Aurelle, H., Dénarie, J., & Promé, J.C. 1993. Role of the *Rhizobium meliloti* *nodF* and *nodE* genes in the biosynthesis of lipo-oligosaccharidic nodulation factors. *J. Biol. Chem.* 268: 20134-20142.
- Dénarié, J., Debellé, F. & Rosenberg, C. 1992. Signaling and host range variation in nodulation. *Annual Review of Microbiology.* 46, 497-531.
- Dhamatilake, A.J., & Bauer, W.D. 1992. Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* towards nodulation gene-inducing compounds from alfalfa roots. *App. Envir. Microbiol.* 58(4): 1153-1158.
- Ditta, G., Schmieghausen, T., Jacobson, E., Lu, P., Liang, X.-W., Finlay, D.R., Guiney, D., & Helinski, D.R. 1985. Plasmid related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. *Plasmid.* 13: 149-153.
- Djordjevic, M.A., Redmond, J.W., Batley, M. & Rolfe, B.G. 1987. Clovers secrete specific phenolic compounds which either stimulate or repress *nod* gene expression in *R. trifolii*. *EMBO Journal.* 6: 1173-1179.
- Downie, J.A., Sutton, J.M. & Lea, E.J.A. 1992. *nodO*: a nodulation protein that form pores in membranes. In 6th International Symposium on the Molecular Genetics of plant-Microbe interactions, Seattle, Washington, USA. 11-16 July, 1992.
- Dusha, I., Bakos, A., Kondorosi, A., De Bruijn, F. & Schell, J. 1989. The *R. meliloti* early nodulation genes (*nodABC*) are nitrogen regulated: isolation of a mutant strain with efficient nodulation capacity on alfalfa in the presence of ammonium. *Mol. Gen. Genet.* 219: 89-96.
- Economou, A., & Downie, J.A. 1992. The nodulation of legumes by *Rhizobia*. In: *Nitrogen fixation and its research in China*, ed. Hong Kong, G.F. pp 315-339. Berlin and Helseberg: Springer Verlag.
- Ehrhardt, D. W., Atkinson, E.M., Long, Sharon R. (1992). Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science.* Vol. 256. 998-1000.
- Ehrhardt, D.W., Atkinson, E.M., Faull, K.F., Freedberg, D.I., Sutherland, D.P., Armstrong, R., & Long, S.R. 1995. *in vitro* sulfotransferase activity of NodH, a nodulation protein of *Rhizobium meliloti* required for host-specific nodulation. *J. Bacteriol.* 177: 6237-6245.
- Elkan H.G. 1984. Taxonomy and metabolism of *Rhizobium* and its genetic relationship. In: *Biological Nitrogen Fixation (Ecology, Technology and Physiology)* Martin Alexander (ed.) pp 1-38. Plenum Publication Corporation.
- Evans, I. J., & Downie, J. A. 1986. The *nodJ* gene product of *Rhizobium leguminosarum* is closely related to ATP-binding bacterial transport proteins; nucleotide sequence analysis of the *nodJ* and *nodJ* genes. *Gene* 43: 95-101.
- Figurski, D.H., & Helinski, D.R. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK 2 dependent on a plasmid function provided in *trans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 1648-1652.
- Firmin, J.L., Wilson, K.E., Carlson, R.W., Davies, A.E., & Downie, J.A. 1993. Resistance to nodulation of cv. Afghanistan peas is overcome by *nodX*, which mediates an O-acetylation of

- the *Rhizobium leguminosarum* lipooligosaccharide nodulation factor. *Mol. Microbiol.* 10: 351-360.
- Fisher, R.F., Swanson, J.A., Mulligan, J.T. & Long, S.R. 1987. Extended region of nodulation genes in *Rhizobium meliloti* 1021. II. Nucleotide sequence, transcription start sites and protein products. *Genetics*. 117: 191-201.
- Fisher, R.F., & Long, S.R. (1992). *Rhizobium*-plant signal exchange. *Nature*. Vol. 357. 655-660
- Folch-Mallof, J.L., Marroquí, S., Sousa, C., Manyani, H., López-Lara, M.I., van der Drift, K.M.G.M., Haverkamp, J., Quinto, C., Gil-Serrano, A., Thomas-Oates, J., Spaink, H., & Megias, M. 1996. Characterization of *Rhizobium tropici* CIAT899 nodulation factor: the role of *nodH* and *nodPQ* genes in their sulfation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9(3): 151-163.
- Fuqua, W.C. 1992. An improved Chloramphenicol resistance gene cassette for site-directed marker replacement mutagenesis. *Biotechniques*. 12(2): 223-225.
- Geelen, D., Mergaert, P., Geremia, R.A., Goormachtig, S., Van Montagu, M. & Holsters, M. 1993. Identification of *nodS* genes in Nod locus 1 of *Azorhizobium caulinodans*: evidence that *nodS* encodes a methyltransferase involved in Nod factor modification. *Mol. Microbiol.* 9(1), 145-154.
- Geelen, D., Leyman, B., Mergaert, P., Klarskov, K., Van Montagu, M., Geremia, R., & Holsters, M. 1995. NodS is an S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase that methylates chitooligosaccharides deacetylated at the non-reducing end. *Mol. Microbiol.* 17(2): 387-397.
- Geiger, O., Thomas-Oates, J.E., Glushka, J., Spaink, H.P. & Lugtenberg, B.J.J. 1994. Phospholipids of *Rhizobium* contain *nodE*-determined highly unsaturated fatty acid moieties. *J. Biol. Chem.* 269 (15), pp 11090-11097.
- Geremia, R.A., Mergaert, P., Geelen, D., Van Montagu, M., & Holsters, M. 1994. The NodC protein of *Azorhizobium caulinodans* is an N-acetylglucosaminyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 2699-2673.
- Göttfert, M., Grob, P., Hennecke, H. 1990 (a). Proposed regulatory pathway encoded by the *nodV* and *nodW* genes, determinants of host specificity in *Bradyrhizobium japonicum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 2680-2684.
- Göttfert, M., Hitz, S., Hennecke, H. 1990 (b). Identification of *nodS* and *nodU*, two inducible genes inserted between the *Bradyrhizobium japonicum nodYABC* and *nodIJ* genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* Vol: 3, No. 5, 301-316.
- Greck, M., Platzer, J., Sourjik, V., & Schmitt, R. 1995. Analysis of a chemotaxis operon in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.* 15(6): 989-1000.
- Györgypal, Z., Iyer, N. & Kondorosi, A. 1988. Three regulatory *nodD* alleles of diverged flavonoid specificity are involved in host-dependent nodulation by *R. meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* 212, 85-92.
- Hanahan, D. 1983. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580
- Heidstra, R.; Geurts, R.; Frassen, H.; Spaink, H.P.; Kammen, A.v.; and Bisseling T. (1994). Root hair deformation activity of nodulation factors and their fate on *Vicia sativa*. *Plant Physiol.* Vol. 105. pp. 787-797.
- Hirsch, A.M. 1992. Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.* 122: 211-237.
- Ho, S.C., Wang, J.L., Schindler, M., & Loh, J.T. 1994. Carbohydrate binding activities of *Bradyrhizobium japonicum*. III. Lectin expression, bacterial binding, and nodulation efficiency. *Plant J.* 5: 873-884.
- Horvath, B., Bachem, C.W.B., Scheil, J. & Kondorosi, A. 1987. Host-specific regulation of nodulation genes is mediated by a plant-signal, interacting with the *nodD* gene product. *EMBO J.* 6: 841-848.
- Horvath, B., Heidstra, R., Lados, M., Moerman, M., Spaink, H.P., Promé, J.C., Van Kammen, A., & Bisseling, T. 1993. Lipo-oligosaccharides of *Rhizobium* induce infection-related early nodulin gene expression in pea root hairs. *Plant J.* 4: 727-733.
- Hungria, M.A., Joseph, C.M., & Phillips, D.A. 1991. *Rhizobium nod* gene inducers exuded naturally from roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiol.* 97: 759-764.
- Jabbouri, S., Fellay, R., Talmont, F., Kamalaprifa, P., Burger, U., Relic, B., Promé, J.C., & Broughton, W.J. 1995. Involvement of *nodS* in N-methylation and *nodU* in 6-O-carbamoylation of *Rhizobium* sp. NGR234 Nod factors. *J. Biol. Chem.* 270 (39): 22968-22973.

- John, M., Röhrig, H., Schmidt, J., Wieneke, U., & Schell, J. 1993. *Rhizobium* NodB protein involved in nodulation signal synthesis is a chitooligosaccharide deacetylase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 625-629.
- Johnston, A.W.B., Benynon, J.L., Buchanan-Wollaston, A.V., Stchell, S.M., Hirsch, P.R. & Beringer, J.E. 1978. High frequency transfer of nodulation ability between strains and species of *Rhizobium*. Nature, 276: 634-636.
- Kijne, J.W. 1991. The infection process. In: Biological Nitrogen Fixation. G. Stacey, R.H. Burris and H.J. Evans (Eds.). Chapman and Hall. New York-London.
- Knauf, V.C & Nester, E.W. 1982. Wide host range cloning vectors: a cosmid clone bank of an *Agrobacterium* Ti plasmid. Plasmid, 8: 45-54.
- Kondorosi, E., Banfalvi, Z. & Kondorosi, A. 1984. Physical and genetical analysis of symbiotic region of *R. meliloti*: identification of nodulation genes. Mol. Gen. Genet. 193: 445-452.
- Kondorosi, E., Gyuris, J., Schmidt, J., John M., Duda, E., Hoffman, B., Scheil, J., and Kondorosi, A. 1989. Positive and negative control of *nod* gene expression in *Rhizobium meliloti* is required for optimal nodulation. EMBO J. 8: 1331-1340.
- Kondorosi, E., Bulre, M., Cren, M., Iyer, N., Hoffman, B., and Kondorosi, A. 1991. Involvement of the *syrM* and *nodD3* genes of *Rhizobium meliloti* in *nod* gene activation and in optimal nodulation of the plant host. Mol. Microbiol. 5 (12), 3035-3048.
- Krishnan, H. B., Lewin, A., Fellay, R., Broughton, W.J., and Pueppke, S. G. 1992. Differential expression of *nodS* accounts for the varied abilities of *Rhizobium fredii* USDA257 and *Rhizobium* sp. NGR234 to nodulate *Leucaena* spp. Mol. Microbiol. 6(22), 3321-3330.
- Kustu, S., Weiss, D.S., Klose, K., Porter, S., North, A. & Wedel, A. 1992. Prokaryotic enhancers and enhancer proteins. In: International Symposium on the Molecular genetics of Plant-Microbe interactions. Seattle Washington, USA, 11-16 July, 1992.
- Leigh, J.A., & Walkin, G.C. 1994. Exopolysaccharides of *Rhizobium*: synthesis, regulation and symbiotic function. Trends Genet. 10(2): 63-67.
- Legocki, R.P. & Verma, D.P.S. 1980. Identification of "nodule-specific" host proteins (nodulins) involved in the development of *Rhizobium*-Legume symbiosis. Cell, 20: 153-163.
- León-Barrios, M., Dakora, F.D., Joseph, C.M., & Phillips, D. 1993. Isolation of *Rhizobium meliloti* gene inducers from alfalfa rhizosphere soil. App. Environ. Microbiol. 59(2): 636-639.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J. C., and Dénarié, J. 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. Nature, 344: 781-784.
- Lewin, A., Cervantes, E., Hoong, W. C., Broughton, W. J. 1990. *nodSU*, two new *nod* genes of the broad host range *Rhizobium* strain NGR234 encode host-specific nodulation of the tropical tree *Leucaena leucocephala*. 3 (5), 317-326.
- Long, S.R. 1989. *Rhizobium*-legume nodulation: life together in the underground. Cell, 56: 203-214.
- Long, S.R. & Staskawicz. 1993. Prokaryotic plant parasites. Cell, 73: 921-935.
- López-Lara, M.I., van den Berg, J.D.J., Thomas-Oates, J., Glushka, J., Lugtenberg, B.J.J., & Spaink, H.P. 1995. Structural identification of the 'lipo-chitin oligo-saccharide nodulation signals of *Rhizobium loti*. Mol. Microbiol. 15(4): 627-638.
- Maillet, F., Debelle, F & Dénarié, J. 1990. Role of the *nodD* and *syrM* genes in the activation of the regulatory *nodD3* and of the common and host specific *nod* genes of *R. meliloti*. Mol. Microbiol. 4: 1975-1984.
- Martínez, E., Romero, D. & Palacios, R. 1990. The *Rhizobium* Genome. Plants Science, 9: 59-93.
- Martínez, E., Segovia, L., Martins-Mercante, F., Franco, A.A., Graham, P. & Pardo, M.A. 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. International Journal of Systematic Bacteriology, 41(3): 417-426.
- Martínez-Romero, E., Segovia, L., Mercante, F.M., Franco, A.A., Graham, P., & Pardo, M.A. 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. Int. Syst. Bacteriol. 41: 417-426.
- Matvienko, M., van de Sande, K., Yong, W.C., van Kammen, A., Bisseling, T. & Frassen, H. 1994. Comparison of soybean and pea ENOD40 cDNA clones representing genes expressed during both early and late stages of nodule development. Plant Mol. Biol. 26: 487-493.
- McKhann, H.I. & Hirsch A.M. 1994. Does *Rhizobium* avoid the host response?. Curr. Top. Immunol. 192: 139-162.

- Mergaet, P., van Montagu, M., Promé, J.C. & Holsters, M. 1993. Three unusual modifications, a D-arabinosyl, an N-methyl, and a carbomoyl group, are present on the Nod factors of *Azorhizobium caulinodans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 1551-1555.
- Michiels, J., De Wilde, P. & Vanderleyden J. 1993. Sequence of the *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* *sym* gene. Nuc. Acids Reser. 21(16): 3893.
- Milner, J.L., Araujo, R.S., & Handelsman, J. 1992. Molecular and symbiotic characterization of exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium tropici* strain CIAT899. Mol. Microbiol. 6(21): 3137-3147.
- Mylona, P., Pawlowski, K., & Bisseling, T. 1995. Symbiotic nitrogen fixation. The Plant Cell. 7: 869-885.
- Nap, J.P & Bisseling, T. (1990). Developmental biology of a Plant-Prokaryote symbiosis: The legume root nodule. Science. Vol. 250. 948-954.
- Ndoye, I., De Billy, F., Vasse, J., Dreyfus, B. & Truchet, G. 1994. Root nodulation of *Sesbania rostrata*. J. Bacteriol. 176: 1060-1068.
- Nguyen, T., Zelechowska, M., Foster, V., Bergmann, H., & Verma, D.P.S. 1985. Primary structure of the soybean nodulin-35 gene encoding uricase II localized in the peroxisomes of uninfected cells of nodules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 5040-5044.
- Nicolau, K.C., Bockovich, N.J., Carcanague, D.R., Hummel, C.W., & Even, L.F. 1992. Total synthesis of the NodRM-IV factors, the *Rhizobium* nodulation signals. J. Amer. Chem. Soc. 114: 8701-8702.
- Noel, K.D., Sánchez, A., Fernández, L., Leemans, J., & Cavallos, M.A. 1984. *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5. J. Bacteriol. 158: 148-155.
- Nuti, M.P., Lepicij, A.A., Prakash, P.K., Schilperoot, R.A. & Cannon, F.C. 1979. Evidence for nitrogen fixation genes on indigenous *Rhizobium* plasmids. Nature. 282: 533-535.
- Palacios, R., Quinto, C., de la Vega, H., Flores, M., Fernández, L., Hernández, M., Ballado, T., & Soberón, G. 1983. General organization of nitrogen fixation genes in *Rhizobium phaseoli*. In A. Pülher (ed.), Molecular genetics of bacteria-plant interactions. Springer Verlag K.G., Berlin. 164-168.
- Peters, N.K. & Verma, D.P.S. 1990. Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interactions. Mol. Plant-Microbe Interact. 3: 4-8.
- Phillip-Hollingsworth, S., Orgambide, G.G., Bradford, J.J., Smith D.K., Hollingsworth, R.I., & Dazzo, F.B. 1995. Mutation or increased copy number of *nodE* has no effect on the spectrum of chitolipooligosaccharide Nod factors made by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. J. Biol. Chem. 270(36): 20968-20977.
- Pichon, M., Journet, E.P., de Billy, F., Ded'ou, A., Huguet, T., Truchet, G. & Barker, D.G. 1994. ENOD12 gene expression as a molecular marker for comparing *Rhizobium*-dependent and-independent nodulation in alfalfa. Mol. Plant-Microbe Interact. 7(6): 740-747.
- Poupot, R., Martínez-Romero, E. & Promé, J.C. 1993. Nodulation factors from *Rhizobium tropici* are sulphated or nonsulphated chitopentacosaccharides containing an N-methyl-N-acetylglucosaminyl terminus. Biochemistry. 32: 10430-10435.
- Poupot, R., Martínez-Romero, E., Maillet, F., & Promé, J.C. 1995. *Rhizobium tropici* nodulation factor sulfation is limited by the quantity of activated form of sulfate. FEBS Letters. 368: 536-540.
- Price, N.P.J., Relic, B., Talmont, F., Lewin, A., Promé, D., Pueppke, S.G., Maillet, F., Denarié, J., Promé J.C. & Broughton, W.J. 1992. Broad host range *Rhizobium* species strain NGR234 secretes a family of carbomoylated, and fucosylated, nodulations signals that are O-acetylated or sulphated. Mol. Microbiol. 6: 3575-3584.
- Quandt, J., & Hynes, M.F., 1993. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria. Gene. 127: 15-21.
- Recourt, K., van Tunen, A.J., Mur, L.A., van Brussel, A.A.N., Lugtenberg, B.J.J. & Kijne J.W. 1992. Activation of flavonoid biosynthesis in roots of *Vicia sativa* subsp. *nigra* plants by inoculation with *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. Plant Mol. Biol. 19: 411-420.
- Relic, B., Talmont, F., Kopicinska, J., Golinowski, W., Promé, J.C., & Broughton, W.J. 1993. Biological activity of *Rhizobium* sp. NGR234 Nod-factors on *Macroptilium atropurpureum*. Mol. Plant-Microbe Interact. 6: 764-774.

- Ritsemá, T.**, Wijffjes, A.H.M., Lugtenberg, B.J.J., & Spaink, H.P. 1996. *Rhizobium* nodulation protein NodA is a host-specific determinant of the transfer of fatty acids in Nod factor biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* 251: 44-51.
- Rivilla, R.**, Sutton J.M., & Downie, J.A. 1995. *Rhizobium leguminosarum* NodT is related to a family of outer-membrane transport proteins that includes TolC, PrtF, CyaE and AprF. *Gene.* 161: 27-31.
- Roche, P.**, Debelle, F., Maillet, F., Lerouge, P., Faucher, C., Truchet, G., Denarié, J. & Promé, J.C. 1991. Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti* nodH and nodPQ genes encode the sulfation of lipo-oligosaccharide signals. *Cell.* 67:1131-1143.
- Rodríguez-Quinones, F.**, Banfalvi, Z., Murphy, P. & Kondorosi, A. 1987. Interspecies homology of nodulation genes in *Rhizobium*. *Plant Mol. Biol.* 8: 61-67.
- Röhrig, H.**, Schmidt, J., Wieneke, U., Kondorosi, E., Barlier, I., Schell, J., & John, M. 1994. Biosynthesis of lipo-oligosaccharide nodulation factors: *Rhizobium* NodA protein is involved in N-acylation of the chitooligosaccharide backbone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 3122-3126.
- Rossen, L.**, Shearman, C. A., Johnston, A. W. B., and Downie, J. A. 1984. DNA sequence of the *Rhizobium leguminosarum* nodulation genes nodAB and C required for root hair curling. *NAR.* 12 (24): 9497-9508.
- Rossen, L.**, Shearman, C.A., Johnston, A.W.B. & Downie, J.A. 1985. The nodD gene of *R. leguminosarum* is autoregulatory and in the presence of plant exudates induces the nodABC genes. *EMBO J.* 4: 3369-3373.
- Sadosky, M.J.**, Foster, E.R., Olson, V.E. & Verma, D.P.S. 1991. Two host-inducible genes of *Rhizobium fredii* and characterization of the inducing compound. *J. Bact.* 170: 171-178.
- Sánchez, F.M.**, Lara, M., Padilla, J., & Folch, J. 1987. Heterogeneity of glutamine synthetase polypeptides in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* 76: 1019-1023.
- Sánchez, F.**, Padilla, J., Pérez, H. & Lara, M. 1991. Control in root-nodule development and Metabolism. *Ann. Rvw. Plant Physiol. and Mol. Biol.* 42: 502-528.
- Sanger, F.**, Nicklen, S., and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 5463-5467.
- San Juan, J.**, Carlson, R.W., Spaink, H.P., Bhat, U.R., Barbour, W.M., Glushka, J. & Stacey, G. 1992. A 2-O-methylfucose moiety is present in the lipo-oligosaccharide nodulation signal of *Bradyrhizobium japonicum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 8789-8793.
- San Juan, J.**, Grab, P., Göttfert, M., Hennecke, H. & Stacey, G. 1994. NodW is essential for full expression of the common nodulation genes in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Plant-Microbe interact.* 7: 364-369.
- Schlaman, H.R.M.**, Okker, R.J.H. & Lugtenberg, B.J.J. 1992. Regulation of nodulation gene expression by NodD in Rhizobia. *J. Bact.* 74: 5177-5182.
- Schultze, M.**, Quiclet-Sire, B., Kondorosi, E., Virilizier, H., Glushka, J.N., Gero, S.D. & Kondorosi, A. 1992. *Rhizobium meliloti* produces a family of sulphated lipo-oligosaccharides exhibiting different degrees of plant host specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 192-196.
- Schultze, M.**, Staehelin, C., Röhrig, H., John, M., Schmidt J., Kondorosi, E., Schell J. & Kondorosi, A. 1995. *In vitro* sulfotransferase activity of *Rhizobium meliloti* NodH protein: lipo-oligosaccharide nodulation signals are sulfated after synthesis of the core structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 2706-2709.
- Schwedock, J.S.**, Liu, C., Leyh, T.S., & Long, S.R. 1994. *Rhizobium meliloti* NodP and NodQ form a multifunctional sulphate-activating complex requiring GTP for activity. *J. Bacteriol.* 176: 7055-7064.
- Shearman, C.A.**, Rossen, L., Johnston, A.W.B. & Downie, J.A. 1986. The *Rhizobium leguminosarum* nodulation gene nodF encodes a polypeptide similar to acyl-carrier protein and is regulated by nodD plus a factor of pea root exudates. *EMBO. J.* 5: 647-652.
- Sheldon, P.S.**, Kelwick, R.G.O., Sidebottom, C., Smith, C.G. & Slabas, A.R. 1990. 3-oxo-(acyl-carrier protein) reductase from avocado (*Persea americana*) fruit mesocarp. *Biochemistry.* 27: 713-720.
- Segovia, L.**, Young, J.P.W., & Martínez-Romero. 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bact.* 43: 374-377.
- Smit, G.**, Kijne, J.W. & Lugtenberg, B.J.J. 1987. Involvement of both cellulose fibrils and Ca²⁺-dependent adhesin in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. *J. Bact.* 169: 4294-4301.

- Sousa, C., Folch, J.L., Boloix, P., Megias, M., Nava, N. & Quinto, C. 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(6): 1157-1168.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503.
- Spaank, H.P., Wijffelman, C.A., Pees, E., & Lugtenberg, B.J.J. 1987. *Rhizobium* nodulation gene *nodD* as a determinant of host specificity. *Nature.* 328: 337-340.
- Spaank, H.P., Okker, R.J.H., Wijffelman, C.A., Tak, T., Goosen de Roo, L., Pees, E., van Brussel, A.A.N., & Lugtenberg, B.J.J. 1989. Symbiotic properties of *Rhizobia* containing a flavonoid independent hybrid *nodD* product. *J. Bact.* 171: 4045-4053.
- Spaank, H.P., Sheely, D.M., van Brussel, A.A.N., G'ushka, J., York, W.S., Tak, T., Geiger, O., Kennedy, E.P., Reinhold, V.N. & Lugtenberg, B.J.J. 1991. A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature.* 354: 125-130.
- Spaank, H.P., Aarts, A., Stacey, G., Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.J.J., & Kennedy, E. 1992. Detection and separation of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* Nod metabolites using thin-layer chromatography. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5(1): 72-82.
- Spaank, H.P., Wijffes, A.H.M. & Lugtenberg, B.J.J. 1995. *Rhizobium* NodI and NodJ proteins play a role in the efficiency of secretion of lipochitin oligosaccharides. *J. Bacteriol.* 177: 6276-6281.
- Spaank, H.P., Bloemberg, G.V., van Brussel, A.A.N., Lugtemberg, B.J.J., van der Drift, K.M.G.M., Haverkamp, J., & Thomas-Oates, J.E. 1995. Host specificity of *Rhizobium leguminosarum* is determined by the hydrophobicity of highly unsaturated fatty acyl moieties of the nodulation factors. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8: 155-164.
- Stacey, G., Luka, S., Sanjuan, J., Banfalvi, Z., Nieuwkoop, A.J., Chun, J.Y., Forsberg, L.S. & Carlson, R.W. 1994. *nodZ*, a unique host-specific nodulation gene, is involved in the fucosylation of the lipooligosaccharide nodulation signal of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bact.* 176: 620-633.
- Subba-Rao, N.S., Mateos, P.F., Baker, D., Pankratz, H.S., Palma, J., Dazzo, F.B., & Sprent, J.I. 1995. The unique root-nodule symbiosis between *Rhizobium* and the aquatic legume, *Neptunia natans*. (L.f) Druce. *Planta.* 196: 311-320.
- Sutton, M.J., Lea, E.J.A. & Downie, A.J. 1994. The nodulation-signaling protein NodO from *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* forms ion channels in membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 9990-9994.
- Toro, N. & Olivares, J. 1986. Analysis of the *R. meliloti* sym mutants obtained by heat treatment. *Applied and Environ. Microbiol.* 51: 1148-1150.
- Török, I., Kondorosi, E., Stepkowski, T., Posfai, J., and Kondorosi, A. 1984. Nucleotide sequence of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Nucleic Acids Res.* 12: 9509-9524.
- Truchet, G., Roche, P., Lerouge, P., Vasse, J., Camut, S., De Billy, F., Promé, J.C. & Dénarié, J. 1991. Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. *Nature.* 351: 670-673.
- Van Brussel, A.A.N., Bakhuizen, R., van Spronsen, P. C., Spaank, H. P., Tak, T., Lugtenberg, B. J. J. & Kijne, J. W. 1992. Induction of pre-infection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipo-oligosaccharides by *Rhizobium*. *Science.* 257: 70-72.
- Van den Bosch, K.A., Rodgers, L.R., Sherrier, D.J., & Kishineusky, B.D. 1994. A peanut nodule lectin in infected cells and in vacuoles and the extracellular matrix of nodule parenchyma. *Plant Physiol.* 104: 327-337.
- Van den Eede, G., Dreyfus, B., Goethals, K., Montagu, V.M. & Holters, M. 1987. Identification and cloning of nodulation genes from stem nodulating bacterium ORS571. *Mol. Gen. Genet.* 206: 291-299.
- Van Rhijn, P.J.S., Feys, B., Varreth, C., & Vanderleyden, J. 1993. Multiple copies of *nodD* in *Rhizobium tropici* CIA7899 and BR816. *J. Bact.* 175(2): 438-447.
- Van Rhijn, P.J.S., Desair, J., Vlassak, K., & Vanderleyden, J. 1994. The NodD proteins of *Rhizobium* sp. BR816 differ in their interactions with coinducer and their activities for nodulation of different host plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(10): 3615-3623.
- Vargas, C., Martinez, L. J., Megias, M., and Quinto, C. 1990. Identification and cloning of nodulation genes and host specificity determinants of the broad host-range *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* strain C.AT899. *Molec. Microbiol.* 4(11), 1899-1910.

- Vasse, J., De Billy, F., Camut, S. & Truchet, G. 1990. Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J. Bact.* 172: 4295-4306.
- Vázquez, M., Dávalos, A., de las Peñas, A., Sánchez, F., and Quinto, C. 1991. Novel organization of the common nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* strains. *J. Bact.* 173 (3): 1250-1258.
- Vázquez, M., Santana, O. & Quinto, C. 1993. The NodI and NodJ proteins from *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* strains are similar to capsular polysaccharides secretion proteins from Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* 8(1): 369-377.
- Verma, D.P.S. 1992. Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of *Rhizobium*. *Plant Cell.* 4: 373-382.
- Vijn, I., Yang, W.C., Pallisgård, N., Østergaard, E.J., Kammen, A.V., & Bisseling, T. 1995. VsENOD5, VsENOD12 and VsENOD40 expression during *Rhizobium*-induced nodule formation on *Vicia sativa* roots. *Plant Mol. Microbiol.* 28: 1111-1119.
- Villalobos, M.A. 1993. Secuenciación nucleotídica de *nodS* de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* cepa CE3. Tesis de Licenciatura.
- Villalobos, M.A., Nava, N., Vázquez, M. & Quinto, C. 1994. Nucleotide sequence of the *Rhizobium etli* *nodS* gene. *Gene.* 150: 201-202.
- Waelkens, F., Voets, T., Vlassak, K., Vanderleyden, J., & van Rhijn, P. 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(1): 147-154.
- Wisniewski, J.P., & Delmotte, F.M. 1996. Modulation of carbohydrate-binding capacities and attachment ability of *Bradyrhizobium* sp. (lupinus) to white lupin roots. *Can. J. Microbiol.* 42(3): 234-242.
- Yanish-Perron, C., Vieira, J., & Messing, J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC vectors. *Gene.* 33: 103-119.
- Young, J.P.W. & Johnston, A.W.B. 1989. The evolution of specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Tree.* 4: 341-349.