

86



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Caracterización del compuesto exudado de la raíz del frijol (*Phaseolus vulgaris*) que induce la expresión de los genes *teu* en *Rhizobium tropici*.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIOLOGA



Silvina González Rizzo Krasniansky

PRESENTA:
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

DIRECTOR DE TESIS:
DRA ESPERANZA MARTÍNEZ - ROMERO
FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

2002.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Caracterización del compuesto exudado de la raíz del frijol
(Phaseolus vulgaris) que induce la expresión de los genes teu en
Rhizobium tropici."

realizado por **Silvina Andrea González-Rizzo Krasniansky**

con número de cuenta 9755636-7, quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Esperanza Martínez-Romero

Esperanza Martínez R.

Propietario

Dr. Miguel Lara Flores.

Miguel Lara Flores

Propietario

Dra. Mónica Rosenblueth I.

Mónica Rosenblueth I.

Suplente

Dra. Gladys I. Cassab.

Gladys I. Cassab.

Suplente

Dra. Luisa Alba Lois.

Luisa Alba Lois
FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

Patricia Ramos

Dra. Patricia Ramos



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

*El tiempo madura todas las cosas.
Ningún hombre nace sabio.*

Miguel de Cervantes Saavedra.

*A mis abuelos,
quienes me transmitieron
el gen químico-biológico,
con todo mi amor.*

-AGRADECIMIENTOS-

La realización del presente trabajo no hubiera sido posible sin la dirección y el invaluable estímulo y apoyo de la Dra. Esperanza Martínez-Romero, investigadora del Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno. Para ella mi más profundo reconocimiento.

A mis padres, a quienes les debo la vida. Gracias por todo su amor, apoyo y comprensión, por creer en mí, y por permitirme realizar mis sueños.

A mi hermana mayor predilecta, por enseñarme desde chica tantas cosas, y estar conmigo en los mejores y malos momentos de mi vida. Vane, te adoro con todo mi corazón, eres alguien muy importante para mí.

A la Universidad Nacional Autónoma de México mi más sincero agradecimiento. En especial, a la Facultad de Ciencias y al Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, que me formaron académicamente y con los que siempre estaré en deuda. Gracias CIFN, por acogerme tan cálidamente durante dos años, y permitir la realización de esta tesis.

A todos mis compañeros del laboratorio, por hacer del lugar de trabajo un espacio agradable y divertido. Gracias por soportar mis gritos, mis cantos, y estar ahí cuando sufrí el accidente del dedo.

Al laboratorio IV por prestarme el fluorómetro, el PMSF, la autoclave y tantas cosas...

A Alfonso Leija por las fotografías del microscopio.

A todos mis amigos y compañeros de la facultad.

A mis maestras Judith Marquez y Margarita Collazo, quienes me enseñaron el maravilloso mundo de la botánica y a quienes les debo mi pasión por las plantas.

A mis maestros Julio Prieto, Andrés Keiman y Emilio Cordova, por creer en mi, apoyarme en mi formación y tenerlos ahora como amigos. De corazón muchas gracias.

A los doctores Jorge Nieto, Gabriel Iturriaga, Gladys Cassab, y Miguel Lara, quienes formaron el taller "Bases moleculares de la adaptación al estrés ambiental en plantas". Les agradezco por darme la oportunidad de acercarme de otra manera a la ciencia, definir mi profesión y el campo de estudio al que quiero dedicarme.

Un especial agradecimiento, a la Dra. Gladys Cassab por proporcionarme el anticuerpo, que permitió tener el resultado más importante de esta tesis.

También al Dr. Miguel Lara por creer y confiar tanto en mi, por aportar a esta tesis sus conocimientos en el campo y tenerme paciencia. Gracias "papa Miguel", por tus palabras, por tu escucha, y por tu hombro. Gracias por demostrarme que en la ciencia existe humanidad, afecto, sueños realizables, y sencillez.

A Maria Luisa, por ser mi amiga, mi "roomate", mi compañera de trabajo, mi hermana, y hasta mi madre durante los dos años que viví en Cuernavaca. Gracias por apoyarme y compartir conmigo los mejores momentos; además de hacer de "Suites Gusibela", un lugar agradable para vivir. Te quiero mucho.

A Carlitos por ser mi amigo y aportar a este trabajo tan buenas ideas.

A las dos super mujeres con quienes formé el "trío dinámico". Les agradezco por hacer de la carrera y el estudio un espacio lleno de risas y cariño. Por darme tanta energía y tan buenos momentos. Por aprender con ustedes el verdadero sentido de la amistad y estar siempre ahí cuando más las necesitaba. Las quiero con todo mi corazón.

Esta tesis representa el final de una etapa, el final de muchas cosas...

-INDICE-

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	6
Interacción <i>Rhizobium</i> -leguminosa.....	6
Exudados de raíz.....	7
Sitios de exudación.....	9
Mecanismos de exudación.....	10
Difusión.....	10
Secreción.....	11
Factores que afectan la exudación.....	12
El papel de los exudados en la rizósfera.....	14
Especificidad en la interacción <i>Rhizobium</i> -leguminosa.....	15
El papel de los exudados en el proceso simbiótico.....	15
Flavonoides y genes de nodulación.....	16
El factor de nodulación.....	19
Otros compuestos de especificidad en la interacción <i>Rhizobium</i> -leguminosa.....	21
Lectinas.....	24
Otras glicoproteínas.....	27
Antecedentes específicos del proyecto.....	31
El frijol.....	31
<i>Rhizobium tropici</i>	33
Los genes <i>teu</i>	36
OBJETIVOS	38

METODOLOGÍA	39
Material biológico utilizado.....	39
Esterilización de la semilla.....	39
Germinación de la semilla.....	39
Obtención del exudado de la raíz.....	40
Obtención de raíces.....	40
Obtención de un extracto de raíz enriquecido en glicoproteínas.....	41
Obtención de un extracto de semilla.....	42
Extracción de proteínas de pared celular.....	42
Tratamientos.....	43
Inmunoprecipitación.....	44
Ensayo de inducción β -glucuronidasa con 4-MUG.....	45
Análisis de proteínas.....	46
Experimento de agregación.....	46
Análisis del BLAST.....	47
RESULTADOS	48
Efecto inductor de los exudados y extractos de plantas.....	48
Efecto inductor con un extracto de raíz enriquecido en glicoproteínas.....	50
El papel del pH en la inducción de los genes <i>teu</i>	51
El compuesto inductor es una macromolécula.....	52
Tratamientos.....	53
Calentamiento a 95° C.....	53
Quimiotripsina.....	55
Lectinas de semilla de frijol.....	57
Extracto de pared celular.....	57
Inhibición de la inducción de los genes <i>teu</i>	58
Inmunoprecipitación.....	59
Análisis del BLAST.....	60
Experimento de agregación.....	60

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	62
CONSIDERACIONES FINALES.....	68
APÉNDICE A: Soluciones.....	69
APÉNDICE B: Abreviaturas.....	71
BIBLIOGRAFÍA.....	72

-INTRODUCCIÓN-

Uno de los elementos indispensables para la vida es el nitrógeno, ya que forma parte de biomoléculas existentes en todos los seres vivos, tales como ácidos nucleicos y proteínas. El nitrógeno además es el elemento más abundante en la atmósfera (cerca del 70%). Sin embargo, el nitrógeno molecular (N_2) es inaccesible para la mayoría de los seres vivos los cuales, requieren de nitrógeno combinado, como nitratos, amonio y/o compuestos orgánicos, para su asimilación y posterior utilización.

En los sistemas agrícolas se necesita un suministro continuo de nitrógeno. Por ello, con el afán de resolver uno de los problemas más graves que enfrenta la humanidad, que es la obtención de alimento en cantidades suficientes, se ha recurrido a la utilización de fertilizantes químicos para el aporte de este elemento al suelo.

La producción de fertilizantes sintéticos, requiere de alta presión y temperatura, que es proporcionada por combustibles fósiles. La producción y uso masivo de fertilizantes sintéticos trae consigo diversos problemas, principalmente ecológicos. El uso de un recurso natural no renovable como lo es el petróleo para su producción, y la contaminación de los suelos, mantos acuíferos y cuerpos de agua, que se generan a partir del uso de fertilizantes químicos, son problemas que no se pueden dejar de tomar en cuenta (Newton, 1999).

La búsqueda de otras alternativas que permitan el aporte de este preciado elemento en los sistemas agrícolas, sin que traigan consecuencias desfavorables para el medio ambiente y la economía, es una de las preocupaciones centrales en la investigación con intereses agrícolas.

Una de las alternativas más estudiadas, es la asociación existente entre un grupo de bacterias con leguminosas de diferentes géneros.

Las bacterias son los únicos organismos que hasta ahora se conocen que tienen la capacidad de transformar el nitrógeno atmosférico a nitrógeno combinado. A este proceso se le denomina "fijación biológica de nitrógeno". La fijación biológica de nitrógeno, es una característica exclusiva de procariontes y se encuentra distribuida en muchos géneros de bacterias (Young, 1992).

Las bacterias que pueden llevar a cabo este proceso se han dividido en dos grandes grupos: 1) bacterias fijadoras de nitrógeno en vida libre, que comprenden a microorganismos de los géneros *Klebsiella*, *Anabaena*, *Azospirillum*, *Acetobacter*, entre otros, los cuales, fijan nitrógeno cubriendo sólo sus requerimientos nutricionales; 2) y los fijadores simbióticos de nitrógeno, grupo (que se le conoce colectivamente como rizobios) representado por bacterias de los géneros *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, y *Rhizobium*, entre otros, capaces de establecer una relación simbiótica con ciertas plantas, principalmente leguminosas, y fijar nitrógeno durante esta asociación (Martínez y Hernández, 1999).

El proceso simbiótico inicia por una atracción quimiotáctica entre los rizobios y ciertos compuestos exudados por las raíces de las plantas que permiten la adherencia de las bacterias a la punta del pelo radicular.

En esta interacción temprana y específica entre ambos simbiontes participan los flavonoides de exudado radicular (Firmin, et al., 1986), un factor proteico de la raíz, las lectinas (Halverson et al., 1985), y los factores de nodulación producidos por los rizobios (Redmond, 1986).

La presencia de los rizobios causa que el pelo radicular se deforme y a medida que éste se desarrolla atrapa en su interior un grupo de bacterias. Esto genera que la planta construya (con material propio de su pared celular) una estructura tubular llamada hilo de infección. Los rizobios penetran en el hilo de infección y estimulan la división de células vegetales que producirán finalmente los nódulos. Los nódulos, son estructuras especializadas en donde las bacterias proliferan y se diferencian en bacteroides, los cuales son capaces de llevar a cabo la fijación de nitrógeno, es decir, la transformación de nitrógeno atmosférico a amonio. Luego de dicho proceso, el amonio proporcionado por la bacteria al fijar nitrógeno, es incorporado al metabolismo de la planta, la cual obtiene así un beneficio de la asociación.

Desde hace más de 100 años en campos agrícolas de diferentes países, los rizobios y otras bacterias de vida libre se utilizan como inoculantes en la agricultura para promover el crecimiento vegetal y sustituir la adición de fertilizantes químicos.

La identificación y descripción de la especie de *Rhizobium tropici* como cepa bacteriana altamente resistentes a acidez y a metales pesados, impulsó su uso como inoculante en Brasil (Hungria et al., 2000). En este país, el frijol se ha introducido en tierras bajas con suelos ácidos y altas temperaturas, en donde cepas seleccionadas de *Rhizobium tropici* se han usado exitosamente como inoculantes, reduciendo costos, además de permitir el aprovechamiento y uso de suelos aparentemente inservibles para la agricultura.

Sin embargo, todavía existe un desconocimiento de los mecanismos bioquímicos, genéticos y moleculares que ocurren durante el proceso simbiótico.

El aporte de nuevos conocimientos al respecto, promoverá aún más, que en los sistemas agrícolas de todo el mundo se sustituya por completo la adición de fertilizantes sintéticos por bacterias simbióticas muy buenas fijadoras de nitrógeno para ser utilizadas como inoculante. Además se podrían dar las pautas para ampliar el rango de simbiosis entre bacterias fijadoras de nitrógeno y plantas de interés agrícola que no pueden llevar a cabo dicho proceso.

El presente trabajo, pretende aportar un mayor entendimiento, al estudio de la fijación biológica de nitrógeno, en las etapas tempranas de la relación simbiótica existente entre plantas y bacterias, y más específicamente entre el frijol (*Phaseolus vulgaris*), leguminosa de gran importancia en México y *Rhizobium tropici*, bacteria con gran resistencia a diversas condiciones de estrés.

-ANTECEDENTES-

INTERACCIÓN RHIZOBIUM-LEGUMINOSA

La interacción simbiótica de *Rhizobium* con leguminosas se encuentra mediada por compuestos químicos.

Este tipo de asociación, se puede imaginar y entender mejor, en términos antropocéntricos. Biológicamente, esto no es lo ideal y tampoco esta muy bien visto, pero en este caso, es una herramienta útil para comprender mejor las etapas de esta interacción.

Cualquier interacción y/o comunicación entre organismos de cualquier nivel taxonómico, social o cultural, inicia con "señales de existencia", con un "hola aquí estoy", con un "cruce de miradas a la distancia...", para después acercarse un poco más, e iniciar un proceso de reconocimiento, y darse cuenta si se es compatible o no con ese otro ser vivo; para posteriormente, vivir en armonía en el mismo lecho, (en este caso llamémosle nódulo) y estar juntos "hasta que la muerte los separe... "

De alguna manera, creerlo o no, esto es lo que ocurre entre plantas y bacterias, y más específicamente en la interacción *Rhizobium*-leguminosa.

Es un proceso compuesto por varias etapas, que ocurren en una secuencia. Cada etapa se puede caracterizar por la acción de un grupo específico de genes tanto de la bacteria como de la planta, que actúan en concierto bajo la coordinación de señales moleculares que intercambian ambos organismos, para que con éxito se pueda llevar a cabo esta asociación.

Una de las etapas más importantes, y en la cual, se basa este trabajo, es la interacción temprana existente entre estos organismos. Es la etapa del reconocimiento; volviendo a términos antropocéntricos, la etapa del "hola, aquí estoy"; en donde intervienen diversos mecanismos que determinan la especificidad de la interacción *Rhizobium*-leguminosa.

EXUDADOS DE RAÍZ

Las plantas, para entrar en esa etapa de "reconocimiento" exudan por las raíces diferentes compuestos a la rizósfera, proceso llamado justamente, rizodeposición. Se asume que la rizósfera, se extiende a unos milímetros de la raíz, y se refiere a la "zona del suelo donde se liberan exudados de la raíz de plantas, que pueden estimular, inhibir, o no tener ningún efecto en la actividad de los microorganismos que habitan en el suelo" (Hiltner, 1904).

Entre los compuestos liberados por las raíces, se han identificado una gran cantidad de azúcares (glucosa y fructosa de los más abundantes) (Richard, 1987), diversos tipos de aminoácidos, alcoholes, compuestos fenólicos como los flavonoides (Phillips, et al. 1996), también algunas vitaminas, como la biotina y la tiamina (Rovira, 1969), y ciertas enzimas, entre otros (Tabla 1).

La mayoría de los exudados de las raíces son compuestos orgánicos. Sin embargo, también se liberan algunos iones inorgánicos, oxígeno, e incluso agua (Uren, 2001).

Además, hay otros materiales que se desprenden de la planta durante su crecimiento, y que no son considerados como parte de la exudación, pero de cualquier manera son importantes para la actividad microbiana de la rizósfera, tales como, células epidérmicas, pelos radiculares y ápices de raíz (Curl y Truelove, 1986; tomado de Rosenblueth et al., 2001).

Clases de compuestos	Ejemplos
Azúcares	arabinosa, glucosa, fructosa, maltosa, xilosa, sucrosa, ribosa, galactosa, ramnosa.
Aminoácidos y amidas	los 20 aminoácidos proteinogénicos, ácido aminobutírico, homoserina, cisratiionina, ácido mugineico, fitosideróforos.
Ácidos alifáticos	fórmico, acético, butírico, málico, cítrico, isocítrico, oxálico, pirúvico, maleico, tartárico, glucónico, valérico, oxaloacético.
Ácidos aromáticos	<i>p</i> -hydroxibenzoico, cafeico, <i>p</i> -cumárico, ferúlico, gálico, salicílico, siringico.
Compuestos fenólicos	flavonoides, isoflavonoides, flavanones antocianinas.
Ácidos grasos	linoleico, linolénico, oleico, palmítico, esteárico.
Esteroles	colesterol, campesterol, sitosterol, estigmasterol.
Enzimas	amilasa, peroxidasa, fenolasa, proteasa desoxiribonucleasa, ribonucleasa, fosfatasa.
Otros	vitaminas, reguladores de crecimiento vegetal (auxinas, citoquininas, giberelinas), etanol, H ⁺ , K ⁺ , nitrato, fosfatos, proteínas solubles no identificadas.

Tabla 1. Principales exudados de raíz identificados en plantas superiores. (Uren, 2001)

Sitios de exudación

Se han desarrollado diversas metodologías que permiten localizar con precisión los sitios de excreción o liberación de exudados solubles en agua. El marcaje radiactivo de las raíces, es una de las metodologías más utilizadas, la cual muestra, que la zona meristemática inmediatamente arriba de la cofia es el área principal de exudación, aunque también hay excreción a través de las raíces laterales (Curl y Truelove, 1986) (Figura 1).

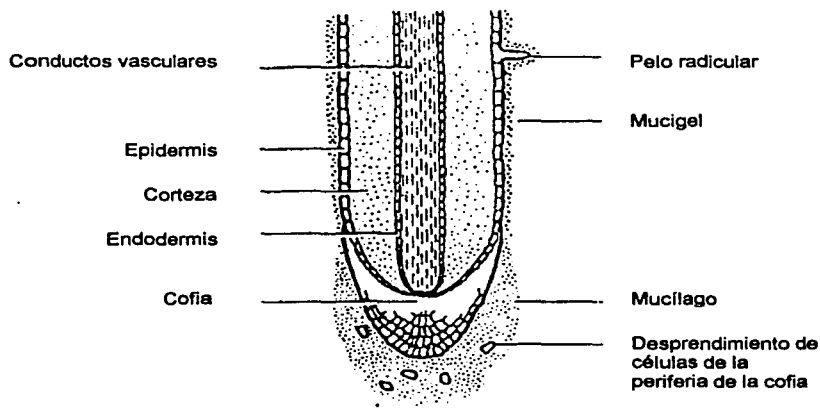


Fig. 1 Diagrama de la raíz (Lynch, 1983).

Mecanismos de exudación

Los mecanismos de exudación o rizodeposición se pueden dividir en dos grupos:

a) Los exudados de raíces liberados pasivamente (por difusión) y b) activamente (por secreción) de células intactas de la periferia de la cofia que son depositados en la rizósfera (Pinton, et al, 2001).

a) Difusión

La mayoría de los compuestos orgánicos de bajo peso molecular, (como azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, iones inorgánicos, oxígeno, entre otros) son liberados por las raíces de las plantas, por difusión, (Fig. 2) en donde no se requiere de energía metabólica, debido al alto gradiente de concentración que usualmente existe entre el citoplasma de las células intactas de la raíz y el exterior (el suelo). Esto además es determinado por la permeabilidad de la membrana, que depende del estado fisiológico de las células de la raíz, así como de la polaridad de los compuesto exudados (Guern, et al. 1987).

Los exudados de la raíz de bajo peso molecular, al ser más difusibles, y tener mayor movilidad en el suelo, pueden ser asimilados y utilizados más fácilmente por un amplio rango de microorganismos (Uren, 2001).

b) Secreción

Los compuestos de alto peso molecular (como polisacáridos y proteínas), que también son exudados por las raíces de las plantas, requieren, por su tamaño y complejidad, de energía metabólica para su deposición (Battey, et al. 1993). En este proceso intervienen transportadores vesiculares, (Fig. 2) que dependen fuertemente (desde la formación de las vesículas como su fusión con la membrana plasmática) de los niveles de calcio existentes tanto intracelulares como extracelulares (Marschner, 1995).

La vía de secreción (rizosecreción) de las raíces de las plantas por medio de las vesículas del retículo endoplásmico, se ha propuesto que puede ser utilizada en la producción y recuperación en grandes cantidades de proteínas de plantas transgénicas (Borisjuk, et al., 1999).

En general, los productos secretados por las raíces de las plantas de alto peso molecular, se consideran inefectivos para la asimilación y degradación de muchos microorganismos que habitan en la rizósfera. Sin embargo, los polisacáridos por ejemplo, representan una cantidad más importante de los exudados que los monosacáridos (Uren, 2001).

Dentro de los compuestos secretados naturalmente por las raíces de las plantas, también hay que considerar a los mucílagos, que tienen la finalidad de facilitar el paso de la raíz por el suelo.

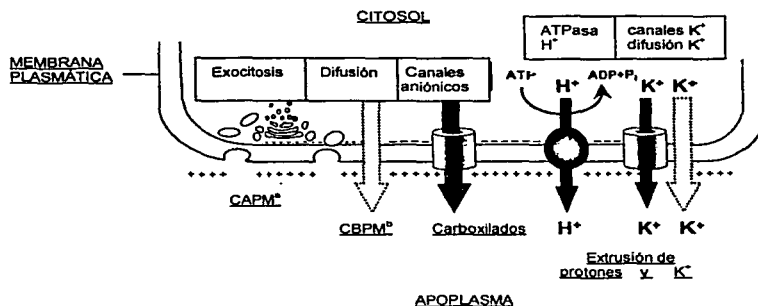


Fig. 2 Modelo de los mecanismos implicados en la liberación de los exudados de raíz (Neumann y Römheld, 2001).

^aCAPM: Compuestos de alto peso molecular como polisacáridos, proteínas y mucílago.

^bCBPM: Compuestos de bajo peso molecular como azúcares, aminoácidos, y compuestos fenólicos.

FACTORES QUE AFECTAN LA EXUDACIÓN

Los factores que pueden afectar la naturaleza y cantidad de los compuestos exudados depende de cada planta, del estadio de ésta, de diversos factores ambientales como son la cantidad de luz, agua, oxígeno, CO₂, nutrientes; entre otros, además de daños a la planta y microorganismos (Tomado de Rosenblueth, et al., 2001).

La liberación de exudados está estrechamente relacionada con el crecimiento y desarrollo de la planta (Prikryl y Vancura, 1980).

En general se ha observado que cuando la planta es joven, hay una mayor exudación de carbohidratos, aminoácidos y mucigel que cuando es madura (Bruehl, 1987 y Richard, 1987).

Además, la exudación es dependiente del estado fisiológico en el que se encuentren las células superficiales de la raíz. Es decir, si las células están activas, habrá una mayor liberación de compuestos a la rizósfera (Frenzl, 1960).

Por otro lado, Jones y colaboradores (1994) sugieren que la exudación (por difusión) de aminoácidos y azúcares puede aumentar por diversos factores de estrés, tales como, deficiencia de nutrientes, temperaturas extremas, estrés oxidativo, entre otros, debido a que éstos afectan la integridad de la membrana.

La presencia de microorganismos provoca también un aumento en la exudación de compuestos a la rizósfera. Esto ocurre debido a que los microorganismos, por un lado, pueden lisar directamente las células de la raíz, producen hormonas y antibióticos que afectan la permeabilidad de la membrana de las células de la periferia de la cofia estimulando la liberación de compuestos, y por último porque inducen la síntesis de diversos compuestos (Hale y Moore, 1979).

EL PAPEL DE LOS EXUDADOS EN LA RIZÓSFERA

Se han descrito varios efectos causados por los exudados de las plantas sobre las bacterias que habitan en la rizósfera.

En general, los exudados pueden ser utilizados por las bacterias como fuente de energía y servir como sustratos para su crecimiento. Las bacterias tienen la capacidad de degradar y catabolizar algunos de estos compuestos, para la obtención de carbono y nitrógeno. Esto genera sobrevivencia y competencia con otros microorganismos que habitan en la rizósfera (Rosenblueth, et al., 2001).

Los exudados pueden inducir quimiotaxis (Vande Broek y Vanderleyden, 1995) y contrarrestar o suprimir mecanismos de defensa de las plantas (Parniske, et al., 1991).

En general, los efectos que pudieran tener los exudados sobre las bacterias que habitan en la rizósfera son benéficos. Esto explicaría, que en el suelo de la rizósfera haya una densidad de bacterias de 10 a 200 veces mayor, que en el suelo adyacente (Whipps y Lynch, 1985, tomado de Rosenblueth, et al., 2001).

Por otro lado, ciertas especies de leguminosas exudan determinados compuestos a la rizósfera que, como se describirá más adelante, son utilizados de manera específica por algunas bacterias, proporcionándoles ventajas de competencia con otros microorganismos. De esta manera, resulta complicado describir de forma general, (por lo específico que llega a ser el tema) los efectos que pudieran provocar los compuestos liberados por las raíces a los microorganismos que habitan en la rizósfera, ya que dependiendo de la bacteria y/o planta en cuestión, los efectos son diversos.

ESPECIFICIDAD EN LA INTERACCIÓN RHIZOBIUM-LEGUMINOSA

El papel de los exudados en el proceso simbiótico

Para lograr la interacción simbiótica entre *Rhizobium* y leguminosas, se requiere de varios eventos en la rizósfera precursores del proceso simbiótico.

Uno de dichos eventos, es la liberación de ciertos compuestos de la planta que generan una atracción quimiotáctica de las bacterias. Esto permite a los rizobios adherirse a las puntas de los pelos radiculares de la raíz e iniciar el proceso de entrada a la planta.

El proceso simbiótico es el resultado de interacciones altamente específicas que existen entre ambos organismos; y el éxito de esta asociación depende del grado de compatibilidad que puede ocurrir en los distintos estadios de la simbiosis.

La especificidad empieza en las etapas tempranas de la interacción. Por lo que los mecanismos o estrategias específicas desarrolladas, (tanto por los rizobios como por las leguminosas), les confieren varias ventajas competitivas sobre otros organismos. Es decir, la exudación de la planta de algún compuesto particular que sólo ciertas bacterias puedan catabolizar, no es una acción caritativa de ninguna de las dos partes, es la especificidad que les aporta un beneficio a ambos organismos, es, en otros términos, "la sobrevivencia del más específicamente capacitado".

El hecho de que exista especificidad en esta relación, significa que una especie de leguminosa establece simbiosis con un número limitado de especies de rizobio (Long, 1989).

Phaseolus vulgaris, por ejemplo, es una planta que puede ser nodulada por varias especies de *Rhizobium*, (como *R. tropici*, *R. etli*, *R. gallicum*, *R. giardinii*, entre otros). Sin embargo, no puede establecer una relación simbiótica con especies de los géneros *Sinorhizobium spp* y *Mesorhizobium spp*, las cuales pueden nodular eficazmente a *Glycine max*, entre otras varias leguminosas (Martínez-Romero, et al., 1999).

Flavonoides y genes de nodulación

Dentro de los procesos que intervienen en la especificidad *Rhizobium*-leguminosa, uno de los más estudiados es la inducción de los genes de nodulación (*nod*), que inicia cuando las plantas exudan una variedad de metabolitos secundarios, en su mayoría flavonoides, (Firmin, et al. 1986) betaínas, (Phillips, et al.1992) entre otros, que son reconocidos por los rizobios.

Los flavonoides son un grupo de moléculas heterocíclicas (sintetizadas por la vía del fenilpropanoide), que están involucrados en el reconocimiento y especificidad en las primeras etapas del proceso simbiótico.

Diferentes plantas producen diferentes tipos de flavonoides (Tabla 2). Y lo que es más, el tipo de flavonoide varía también según provenga de semilla, raíz, o exudado. Esto explicaría la variabilidad de efectos que pueden provocar en las bacterias. Algunos pueden generar quimiotaxis, estimular o inhibir el crecimiento bacteriano, hacer más efectiva la colonización a la planta por los rizobios, y uno de los más importantes: la activación o inhibición de la transcripción de los genes de

nodulación involucrados en la producción de los factores de nodulación (Nod) (Redmond, et al. 1986).

Los flavonoides exudados por la planta son reconocidos mediante la proteína NodD (producto de la expresión constitutiva de los genes *nodD*) que posee diferente especificidad en los distintos grupos de rizobios. La proteína NodD una vez activada induce la transcripción de los genes de nodulación, (*nodM*, *nodH*, *nodC*, etc.) los cuales producen la síntesis y secreción de los factores de nodulación (Nod). Los factores Nod, constituyen la señal bacteriana requerida para la continuación del proceso simbiótico (Phillips, et al. 1994).

Se postula que la expresión de los genes de nodulación de las bacterias estaría modulada mediante un mecanismo de retroalimentación, que podría capacitar a la planta a regular la producción de los factores Nod en las diferentes etapas de la infección y nodulación, ya que éstas tendrían diferentes requerimientos con respecto a la cantidad y calidad de la señal (flavonoides, entre otras sustancias) provenientes de la planta (Spaink, 1995).

Planta	Flavonoides
Semilla y exudado de raíz de soya	genisteína genisteína-7-O-glucósido daidzeína isoliquiritigenina
Exudados de raíz de alfalfa	4,4'-dihidroxi-2'-metoxichalcona liquiritigenina 4,7-dihydroxiflavonoide formononetina-7-O-(6-O-malonilglucósido)
Semilla de alfalfa	luteolina chrysoeriol
Semilla de frijol común	delfinidina-3-O-glucósido petunidina-3-O-glucósido malvidina-3-O-glucósido miricetina-3-O-glucósido quercetina-3-O-glucósido caemferol-3-O-glucósido
Exudado de raíz de frijol común	genisteína genisteína-3-O-glucósido daidzeína eriodictiol naringerina coumestrol

Tabla 2. Algunos flavonoides que regulan los genes de rizobios encontrados en exudados de raíces y semilla (Phillips et al. 1996).

El factor de nodulación

Los factores Nod, son moléculas clave, ya que determinan la especificidad en el proceso simbiótico.

Todos los factores de nodulación hasta ahora caracterizados, consisten en una estructura básica común: un fragmento de quitina de 4 ó 5 residuos de N-acetilglucosamina (Figura 3) (Etzler, 1999).

Los factores de nodulación son diferentes en cada especie de rizobios. Estas variaciones se dan: 1) por la presencia de grupos adicionales, principalmente en los extremos del oligosacárido de quitina, 2) en el tipo de ácido graso y 3) en la longitud del fragmento de quitina (Figura 3, tabla 3) (Spaink, 2000). Las estructuras de los factores de nodulación son únicas en la biología y se consideran variaciones sobre un tema. A las diferentes modificaciones químicas de los factores Nod se les ha atribuido la capacidad de nodular ciertas plantas, pero en otros casos no es clara la relación entre sustituciones y especificidad.

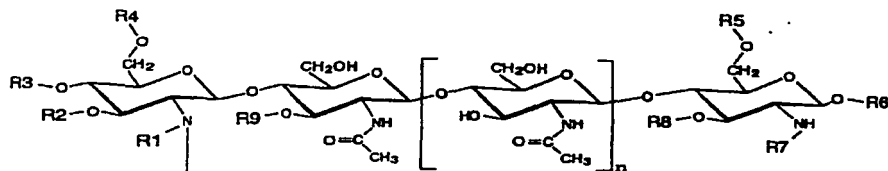


Figura 3. Estructura general de los factores Nod, producidos por los rizobios (Spaink, 2000). Las sustituciones R1-R9 son variables en las distintas cepas de rizobios. Para identificar estas sustituciones de las diferentes cepas ver Tabla 3. En ausencia de un sustituyente específico, los grupos R en la posición R1 son hidrógeno, hidroxil (R2, R3, R4, R5, R6, R8 y R9) y acetil (R7).

Tabla 3. Posibles sustituciones de los factores Nod (Spaink, 2000).

Cepa bacteriana	Residuos de GlcNAc (n) ^a	Sustituciones especiales ^b
<i>S. meliloti</i>	<u>3,4,5</u>	R4:Ac, R5:S, C16:2, C16:3, C26(ω-1)OH
<i>R. leguminosarum</i>		
<i>bv. viciae</i> RBL5560	<u>3,4,5</u>	R4:Ac, C18:4
<i>bv. viciae</i> TOM	<u>3,4,5</u>	R4:Ac, R5:Ac, C18:4
<i>bv. viciae</i> AI	<u>3,4,5</u>	R4:Ac, R5:Ac, C18:4, C18:3
<i>bv. trifolii</i> ANU843	<u>3,4,5</u>	R4:Ac, R5:Ac, R6:Et, C20:4, C20:3, C18:3
<i>R. galeae</i>	<u>4,5</u>	R4:Cb, R9:Ac, C18:2, C18:3, C20:2, C20:3
<i>M. huakuii</i>	<u>3,4,5</u>	R5:S, R7:G, C18:4
<i>M. loti</i>		
E1R, NZP2235, NZP2238	<u>4,5</u>	R1:Me, R3:Cb, R5:AcFuc
NZP2037	<u>4,5</u>	R1:Me, R2:Cb, R3:Cb, R5:AcFuc
NZP2213	<u>2,3,4,5</u>	R1:Me, R3:Cb, R5:AcFuc, R9:Fuc
<i>B. aspalati</i> <i>bv. camosa</i>	<u>3,4,5</u>	R1:Me, R3:Cb, R4:Cb
<i>B. japonicum</i>		
USDA110	<u>5</u>	R5:MeFuc
USDA135	<u>5</u>	R4:Ac, R5:MeFuc
<i>B. elkanii</i> USDA61	<u>4,5</u>	R1:Me, R4:Ac, R3:Cb, R5:MeFuc, R6:Gro
<i>R. etli</i>	<u>4,5</u>	R1:Me, R3:Cb, R5:AcFuc
<i>R. tropici</i>	<u>4,5</u>	R1:Me, R5:S, R6:Man
<i>S. fredii</i>		
USDA257	<u>3,4,5</u>	R5:MeFuC
NGR234	<u>4,5</u>	R1:Me, R3:Cb, R4:Cb, R5:MeFuc/AcMeFuc/SmeFuc
<i>Rhizobium</i> sp. GRH2	<u>4,5,6</u>	R1:Me, R5:S
<i>S. teranga</i> <i>bv. acaciae</i>	<u>5</u>	R1:Me, R3/4:Cb, R5:S
<i>Mesorhizobium</i> ORS1001	<u>5</u>	R1:Me, R3/4:Cb, R5:S
<i>A. caulinodans</i>	<u>4,5</u>	R1:Me, R4:Cb, R5:Fuc, R8:Ara
<i>S. saheli</i>	<u>4,5</u>	R1:Me, R3/4:Cb, R5:Fuc, R8:Ara
<i>S. teranga</i> <i>bv. sesbaniae</i>	<u>4,5</u>	R1:Me, R3/4:Cb, R5:Fuc, R8:Ara

^aLos números subrayados de los residuos de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) son los más abundantes de las especies.

^bAbreviaciones: Me, *N*-metil; Cb, *O*-carbamil; Ac, *O*-acetil; S, *O*-sulfil; Fuc, α -fucosil; MeFuc, 2-*O*-metilfucosil; AcMeFuc, 4-*O*-acetil-2-*O*-metilfucosil; SmeFuc, 3-*O*-sulfato-2-*O*-metilfucosil; Et, etil; Gro, gliceril; Man, manosil; G, *N*-glicolil; FA, acil graso.

Los factores Nod producidos por un número adecuado de bacterias adheridas a las raíces en los sitios susceptibles de infección, pueden generar diversos efectos sobre la planta huésped. Entre ellos se incluyen la deformación y el enroscamiento de los pelos radiculares, la despolarización de la membrana de las células de los pelos radiculares, así como la estimulación de la exudación de ciertos flavonoides de la raíz (Spaink, 1995).

Algunos de estos efectos que provocan los factores Nod, como los cambios en el desarrollo de la raíz, han sido la base para especular que los procesos de reconocimiento y transducción de señales en la respuesta mutualista y patógena de las plantas podrían ser similares. Sin embargo, existen diversos mecanismos que los rizobios han desarrollado para evadir o suprimir la respuesta de defensa de la planta, lo que les confiere una ventaja competitiva importante sobre los patógenos (Baron y Zambryski, 1995).

OTROS COMPUESTOS DE ESPECIFICIDAD EN LA INTERACCIÓN

RHIZOBIUM-LEGUMINOSA

Debido a la importancia de la especificidad al inicio de la relación simbiótica, desde hace varios años, se han realizado esfuerzos y estudios importantes para comprender estos aspectos.

La mimosina por ejemplo, es una toxina antimitótica que se encuentra en grandes cantidades en las hojas, raíces y semillas de *Leucaena*, y *Mimosa*.

Muchas especies de *Rhizobium nodulan Leucaena*, pero se ha observado que sólo algunas cepas pueden degradar y utilizar a la mimosa como fuente de carbono y nitrógeno. La incapacidad para usar la mimosa no es un impedimento para nodular efectivamente a la planta. Sin embargo, sí se ha visto una ventaja competitiva en las cepas que la degradan (Soedarjo y Brotakur, 1996; revisado por Rosenblueth, et al., 2001).

En el caso del aminoácido prolina, se ha determinado que una mutación en una enzima del metabolismo de prolina (*putA*) en *Sinorhizobium meliloti* reduce la colonización de raíces de alfalfa, ya que aparentemente es requerida para una óptima tasa de crecimiento en el proceso de infección (Jiménez- Zurdo, et al.1995). Estudios recientes al respecto, muestran que una cepa con múltiples copias del gen *putA* de *Sinorhizobium meliloti*, adquiere una mayor competitividad y eficiencia en la infección y nodulación de alfalfa, debido al incremento en la expresión de este gen clave para el metabolismo de prolina (van Dillewijn, et al., 2001).

La homoserina es un aminoácido que se secreta con abundancia en el chícharo. Se encontró que cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* que nodulan chícharo podían crecer en homoserina como única fuente de carbono y nitrógeno. (Van Egeraat, 1975; Hynes y O'Connell, 1990).

Las rizopinas son carbohidratos producidos y catabolizados por ciertas cepas de *S. meliloti* (10% de las cepas) y *R. leguminosarum bv viciae* (14% de las cepas) (Murphy, 1995). Estas cepas pueden crecer con este compuesto como única fuente de carbono y nitrógeno, lo que les otorga una ventaja competitiva sobre otras bacterias incapaces de utilizarlo. Los genes para la síntesis (*mos*) y catabolismo (*moc*) de las rizopinas se encuentran localizados en el plásmido simbiótico (*sym*). Los genes *mos* sólo se expresan en el bacteroide y son regulados por el mismo sistema *nifA-nifD* que regula los genes de fijación de nitrógeno. Los genes *moc*, por su parte, se expresan en vida libre, y permiten a las cepas crecer utilizando las rizopinas sintetizadas por los bacteroides (Murphy, 1988). El hecho de ser incapaces de catabolizar este compuesto, no es un impedimento para nodular a la planta. Sin embargo, en *R. meliloti*, se observó que las mutantes deficientes en catabolizar rizopinas son menos competitivas para la nodulación formando menos del 5% de los nódulos al competir 1:1 con la cepa silvestre (O'Connell et al. 1996).

Otras sustancias producidas por las raíces de algunas plantas y que pueden ser catabolizadas por bacterias específicas de la rizósfera son las calisteginas. Las calisteginas son metabolitos secundarios producidos por algunas plantas de la familia Solanaceae y Convolvulaceae. De 42 bacterias rizósfericas analizadas, sólo una, *S. meliloti* Rme41 fue capaz de utilizar este compuesto como fuente de carbono y nitrógeno.

La deficiencia en catabolizar calistegina no afecta la simbiosis, pero aparentemente, representa una forma para que las bacterias sobrevivan en la rizósfera de plantas no hospederas (Tepfer, 1988).

Otros ejemplos de compuestos específicos exudados por diversas plantas y que sirven como única fuente de carbono y/o nitrógeno para algunas bacterias de la rizósfera son las betaínas, (compuestos n-metilados derivados de aminoácidos como la trigonelina), (Tramontano, et al. 1986) y las opinas, (Dessaux, et al., 1992); entre otros.

Lectinas

Se ha propuesto, que las lectinas de la superficie de las raíces de varias leguminosas intervienen en la especificidad de la interacción simbiótica *Rhizobium*-leguminosa (Hamblin y Kent, 1973; Bohlool y Schimidt, 1974; Dazzo y Hubbel, 1975) (Figura 4). Varios estudios usando rizobios mutantes y plantas transgénicas, apoyan esta hipótesis (Halverson y Stacey, 1985, 1986; Díaz, et al., 1989; Kijne et al., 1997).

Las lectinas, son proteínas altamente glicosiladas, capaces de interaccionar específicamente con los carbohidratos de la superficie celular de las bacterias y actuar como mediadores en la adhesión de las bacterias a la superficie de la raíz (Halverson y Stacey, 1985; Van Rhijn et al., 1998).

Díaz y colaboradores (1989), apoyando el papel de las lectinas en la especificidad de la interacción *Rhizobium*-leguminosa, transformaron trébol con el gen que codifica para la lectina de la lenteja. De esta manera, lograron expresar en la superficie celular de las raíces del trébol ambas lectinas; lo que confirió al trébol la capacidad de ser nodulado tanto por su simbiote, como también por el simbiote de lenteja.

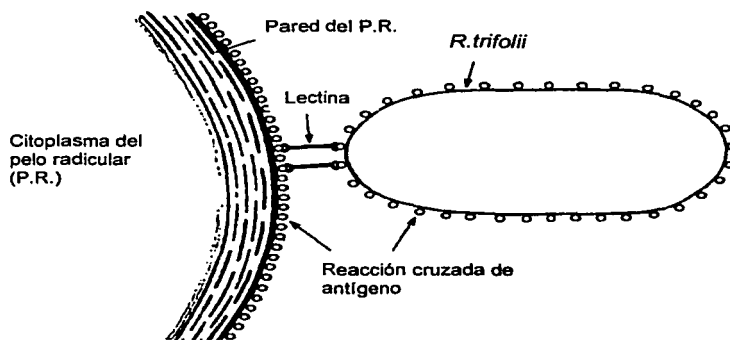


Fig. 4 Modelo propuesto por Dazzo y Hubbell, (1975) que muestra el papel de las lectinas de trébol en la especificidad de la interacción planta-bacteria.

Esto indicaría que las lectinas de la raíz participan en el mecanismo por el cual la planta permite selectivamente al rizobio adherirse a la célula del pelo radicular. Se encontraron resultados similares con una proteína de exudado de raíz y lectina en soya, en donde una mutante (HS111) de *B.japonicum* que mostraba un defecto en la iniciación y nodulación de la planta, fue revertido por un pretratamiento con exudado de raíz y lectina de semilla de soya, mostrando un fenotipo capaz de infectar y nodular a la planta exitosamente. La cepa tipo silvestre se expuso al mismo tratamiento, en donde se observó un aumento en el número de nódulos producidos por la bacteria (Halverson, et al., 1985). Se realizaron los mismos pretratamientos con exudado y lectinas de semillas de otras plantas, sin observar el mismo efecto, lo que sugiere que aparentemente la lectina y el exudado de raíz de soya, inducen la síntesis *de novo* de proteínas en *B.japonicum*, las cuales son necesarias para una eficiente iniciación del proceso de nodulación (Halverson, y Stacey, 1985, 1986).

Se obtuvieron resultados similares con la cepa L5-30 de *Rhizobium meliloti* y exudado de raíz de alfalfa, en donde nuevamente se observó que las bacterias expuestas previamente a un tratamiento con exudado de raíz de alfalfa tenían una mayor eficiencia por colonizar a la raíz que las bacterias sin el tratamiento (Wall, 1991).

También Mestrallet, et al, (1999) evaluaron el efecto de la adición de una lectina (PHA fitohemaglutinina) sobre la simbiosis *Rhizobium leguminosarum* y *Phaseolus vulgaris*, en dos tratamientos:

a) raíces de plántulas de *P.vulgaris* tratadas con lectinas e inoculadas con el rizobio y b) raíces de plántulas de *P.vulgaris* inoculadas con *R.leguminosarum*, incubados previamente con la lectina. En ambos tratamientos se observó que las lectinas favorecen una mejor y más rápida infección de *R.leguminosarum*, obteniendo una nodulación precoz y mejorando la funcionalidad de los mismos. Esto sugiere, que las lectinas funcionan como componentes de la matriz extracelular que cointeraccionan con receptores tanto de la raíz como del rizobio facilitando la infección y nodulación eficaz de *P.vulgaris* por *R.leguminosarum*.

Las lectinas, como toda glicoproteína, poseen composiciones variables de carbohidratos, ya que las enzimas que intervienen en el proceso de glicosidación, no se hallan en cantidades suficientes como para asegurar la síntesis de productos uniformes. Este fenómeno se conoce como microheterogeneidad (Voet, 1990). Además, las lectinas de las plantas tienen una propiedad en común: presentan cuando menos un dominio no catalítico que se puede unir reversiblemente a un carbohidrato específico (Peumans y Van Damme, 1995).

Puede existir una gran diversidad de este tipo de proteínas en la superficie de las raíces de diferentes plantas, necesaria para establecer la especificidad de la interacción planta-bacteria.

Otras glicoproteínas

Sin embargo, las lectinas no son las únicas glicoproteínas que pueden ser exudadas por las raíces de las plantas y que pudieran tener ciertos efectos en la interacción con los microorganismos que habitan en la rizósfera.

En exudados de raíces de *Lotus corniculatus*, se aisló una glicoproteína que, aún en concentraciones micromolares, confiere la capacidad de provocar quimiotaxis a seis cepas diferentes de *Rhizobium spp.* Esta glicoproteína llamada trifolina quimiotáctica, tiene un peso molecular de alrededor de 60 kD, y contiene aproximadamente una cantidad doble de proteínas con respecto a carbohidratos (Currier y Strobel, 1977).

Por otro lado, en plantas superiores se han encontrado cuando menos, tres clases de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGP's del inglés *Hydroxyproline-rich glycoproteins*): 1) ciertas lectinas encontradas en Solanaceae (Allen et al. 1978), 2) las extensinas (Lamport, 1965), y 3) los arabinogalactanos (AGP's del inglés *arabinogalactan-proteins*) (Fincher, 1983). Estas últimas son proteínas que se han encontrado en la mayoría de las secreciones de plantas superiores, así como en gran abundancia en exudados y resinas. (Clarke et al., 1979 y Fincher et al., 1983). Las AGP's se localizan en la matriz extracelular algunas veces asociadas a la membrana plasmática, (Samson, et al., 1983) o como proteínas solubles en los espacios de la pared celular (Serpe y Nothnagel, 1999). Los arabinogalactanos se caracterizan por tener una proporción alta de carbohidratos unidos covalentemente al polipéptido.

Los residuos de carbohidratos consisten comúnmente de galactosa y arabinosa, con otros monosacáridos y ácido urónico, como componentes menores.

Las AGP's, son consideradas como las macromoléculas estructuralmente más complejas en la naturaleza (Figura 5) (Majewska-Sawka, et al., 2000), por ello, se entiende lo complicado que puede llegar a ser su purificación y caracterización.

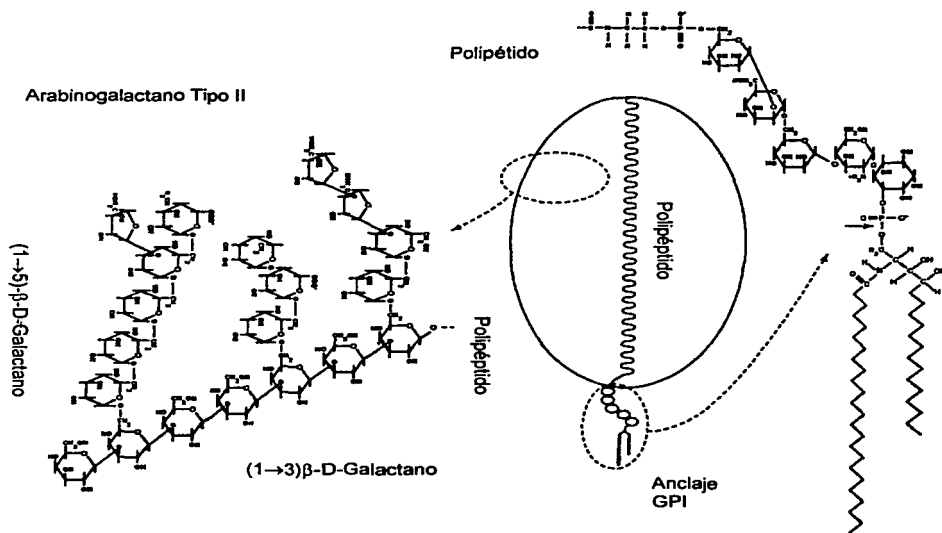


Fig. 5 Modelo hipotético estructural de una AGP clásica. Según la secuencia de cDNA, las AGP's clásicas contienen en el carboxilo terminal un dominio transmembranal hidrofóbico. Sin embargo, al madurar este dominio hidrofóbico está ausente y es reemplazado por un lípido anclado: glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Majewska-Sawka, et al., 2000)

Se conoce poco de la función o papel fisiológico de los arabinogalactanos, pero se propone que pudieran estar implicados en el reconocimiento célula-célula, en eventos de señalización celular (Schultz, et al, 1998) y/u otro tipo de interacciones, como por ejemplo, en la interacción planta-patógeno e interacción planta-simbionte (Clarke et al., 1979; Fincher et al., 1983; Cassab, 1986; Gollotte et al., 1995), así como, en la reparación de heridas (Whistler, 1993) y en la unión de flavonoides β -glucósidos endógenos (Jermyn, 1978).

El conocimiento sobre la función real de las AGP's sigue siendo confuso, sin embargo, no se descarta la posibilidad de que pudieran contribuir en las etapas tempranas de la interacción simbiótica *Rhizobium*-leguminosa, tema central de este trabajo.

Por otro lado, se han observado altos niveles de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina en la testa de la semilla de la soya, las cuales se incrementan drásticamente durante el desarrollo de la misma (Cassab, et al., 1985). La testa confiere a la semilla protección, además de cierta impermeabilidad al agua y a algunos gases, como el oxígeno (Murray, 1979). En nódulo se ha encontrado que Enod 2, una proteína rica en prolina, forma parte de la barrera al oxígeno.

Además, en los dos principales tejidos (corteza y médula) (Tu, 1975) de nódulos de plantas de soya, inoculadas con *Bradyrhizobium* spp, se encontraron dos tipos de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina. En la corteza del nódulo, probablemente HRGP's de tipo extensinas unidas a pared celular; y en la médula del nódulo, de tipo arabinogalactanos, los cuales, diferían a los arabinogalactanos de raíces no infectadas, así como de otros órganos de la planta (Cassab, 1986).

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS DEL PROYECTO

El frijol

El frijol, *Phaseolus vulgaris*, (Tabla 4), ha sido y continúa siendo, junto con el maíz, la base de la alimentación de nuestro país. En un estudio realizado por el INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias) en 1996, se encontró que el 74% de la población tiene el hábito de consumir esta leguminosa al menos cinco veces por semana (Guzmán-Maldonado, Paredes-López, 1998).

Desde el punto de vista nutricional, el frijol es una buena fuente de proteínas y de carbohidratos. Es rico en fibra y se le considera una buena fuente de vitaminas (tiamina, riboflavina, niacina, vitamina B6 y ácido fólico), así como de ciertos minerales (calcio, magnesio, hierro, fósforo, potasio y zinc) y de grasas no saturadas (Reyes-Moreno y Paredes-López, 1993).

- *División: Magnoliophyta*
- *Clase: Magnoliopsida*
- *Orden: Rosales*
- *Familia: Leguminosae (Fabaceae)*
- *Subfamilia: Papilionaceae*
- *Género: Phaseolus*
- *Especie: **Phaseolus vulgaris***

Tabla 4. Clasificación del frijol. (Cronquist, 1981)

La domesticación y especiación del género *Phaseolus* sigue siendo un tema de discusión. Algunos autores plantean tres centros de origen y domesticación: 1) sur de los Andes (que abarca desde el sur de Perú hasta San Luis, Argentina); 2) norte de los Andes (desde el oeste de Venezuela, hasta el norte de Perú) y 3) Mesoamérica (región limitada por los valles de los ríos Pánuco y Santiago en México, hasta el norte de Costa Rica) (Debouck, 1986) (Figura 6).

Sin embargo, generalmente se acepta que el principal centro de origen del género *Phaseolus* fue Mesoamérica, específicamente México y que de ahí se difundieron algunas especies hacia el sur del continente, por las siguientes razones:

En México se han identificado los ancestros silvestres de las cinco especies cultivadas de este género. Además, de las 52 especies, hasta ahora clasificadas de *Phaseolus*, se han encontrado 47 especies en este país (Sousa-Sanchez, et al, 1993 y Debouck, 1994). Por otro lado, se tienen datos, que marcan a los estados de Jalisco y Guanajuato, como los sitios precisos de la domesticación del frijol (Gepts, 1988) (Figura 6 ver recuadro).

El frijol al ser una planta originaria de México tiene una importancia además de económica, cultural y biológica.

El frijol es considerada como planta-modelo en el estudio de la fijación biológica de nitrógeno, por lo anteriormente citado, y porque además, muchas especies de rizobios nodulan eficazmente al frijol, permitiendo un campo amplio de estudio de los diversos mecanismos de interacción de diferentes cepas con la misma planta.

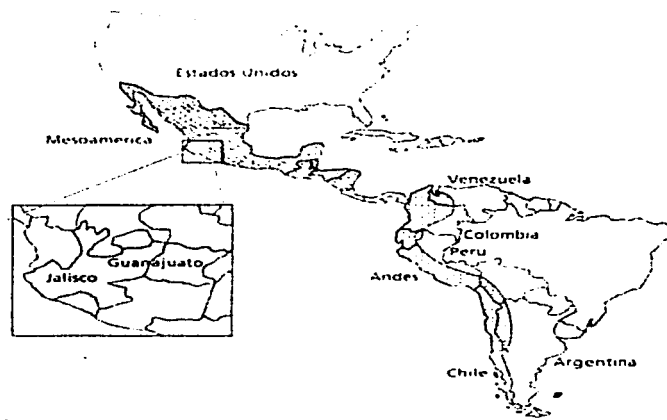


Fig. 6 Mapa de los principales centros de origen y domesticación de *Phaseolus spp.*
Recuadro: posible área de domesticación del frijol cultivado (Gepts, 1988).

Rhizobium tropici

Rhizobium tropici, es una bacteria que nodula con éxito al frijol y otras leguminosas como *Leucaena*, *Macroptilum*, entre otras (Hernández-Lucas, et al.1995 y Mavingui, et al.1997). Es una bacteria gram negativa, aeróbica, flagelada. Se encuentra clasificada en el grupo de las α -Proteobacterias (Figura7). Esta bacteria fue aislada originalmente de suelos tropicales ácidos de América del Sur, donde se usa con éxito como inoculante en cultivos de frijol.

A partir de bases genéticas y características fenotípicas, se han distinguido dos tipos de cepas de *Rhizobium tropici* designadas A y B. La cepa tipo A, denominada CFN 299 requiere de calcio para crecer en medio PY y no crece en medio LB, además es sensible a los siguientes antibióticos: carbenicilina, espectinomina y rifampicina. En cambio, la cepa tipo B, denominada CIAT899, es resistente a estos antibióticos, puede crecer en medio PY sin calcio y crece en medio LB. Ambas cepas son muy buenas fijadoras de nitrógeno.

Se considera que estas cepas difieren en un megaplásmido, pero comparten un plásmido simbiótico con características semejantes. El plásmido *a* (de alrededor de 185kb) también se encuentra conservado en los dos tipos de *Rhizobium tropici*. *Rhizobium tropici* es genéticamente más estable y resiste mejor a diferentes condiciones de estrés que *Rhizobium etli* (Martínez-Romero, 1991). De esta manera se consideró que era un modelo interesante para analizar sus mecanismos de interacción con el frijol.

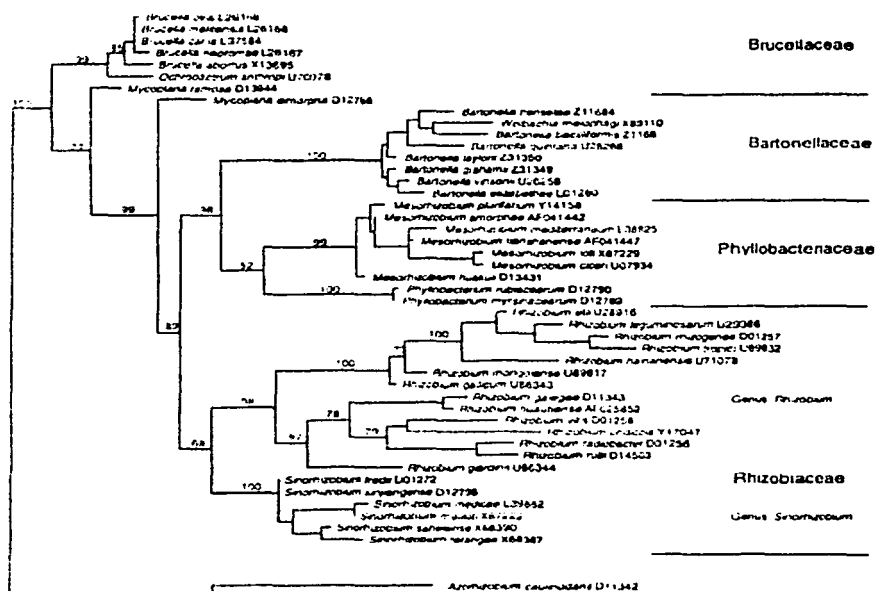


Figura 7. Relación taxonómica de *Rhizobium tropici* (Young, 2001).

Los genes *teu*

En *Rhizobium tropici* se encontró una región genética inducida por exudados de raíz de frijol y de *Macroptilum atropurpureum* pero no por exudados de otras plantas. (Rosenblueth, et al, 1998)

En la cepa CFN 299 de *R.tropici* se identificaron y caracterizaron los genes *teu* (*tropici exudate uptake*), localizados por una inserción de un transposon Tn5-*gusA1* sin promotor. Los genes *teu* están presentes dentro del plásmido *a*. Las proteínas codificadas por estos genes, muestran similitud con transportadores de tipo ABC (del inglés ATP-Binding Cassettes), y más específicamente a las proteínas de transporte de arabinosa y ribosa de *E.coli* (Rosenblueth, et al 1998).

En la cepa tipo A (CFN299) aparentemente hay dos copias de los genes *teu*, uno en el plásmido *a* y otro en el plásmido simbiótico ya que en dos mutantes diferentes no se observó ningún fenotipo (Rosenblueth, et al, 1998). Por otro lado, en la cepa tipo B (CIAT899) de *Rhizobium tropici*, sólo hay un sistemas de transporte para el exudado, ya que una mutante afectada en los genes *teu* no transporta el compuesto inductor del exudado, mostrando una disminución en la competitividad para nodular frijol (Rosenblueth, 1998).

Los estudios para identificar el compuesto que induce la expresión de los genes *teu*, fueron dirigidos inicialmente hacia compuestos de bajo peso molecular. M. Rosenblueth, (1998) probó con 100 sustancias (principalmente carbohidratos), y fracciones exudadas por la raíz del frijol obtenidas por HPLC.

Del primer análisis se obtuvo cierta inducción con una molécula de bajo peso molecular: la trigonelina (Figura 8); y del análisis del exudado por HPLC obtuvo únicamente inducción con una molécula del tamaño de un disacárido.

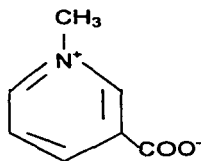


Figura 8. Estructura de la Trigonelina. Todas las betainas tienen una estructura cuaternaria N⁺.

-OBJETIVOS-

En este trabajo, en vista de los resultados iniciales, y la bibliografía consultada, la búsqueda del compuesto inductor se abordó principalmente hacia moléculas de alto peso molecular, como son las proteínas.

El identificar el compuesto principal exudado por la raíz del frijol que induce la expresión de los genes *teu* en *Rhizobium tropici* permitirá conocer con mayor precisión el papel que juegan estos genes en el inicio de la interacción entre *Rhizobium tropici* y *Phaseolus vulgaris*. Además de ser una aportación al conocimiento general sobre los mecanismos moleculares que determinan el inicio de la relación entre las plantas y las poblaciones bacterianas asociadas a la rizósfera.

-METODOLOGÍA-

Material biológico utilizado

- *Phaseolus vulgaris* (frijol) de las siguientes variedades: Peruano, Vaquita, Americano, y Negro Jamapa, así como, *Zea mays* (maíz criollo).
- Cepas utilizadas de *Rhizobium tropici*:

Cepa	Característica
CFN299	Tipo A, silvestre
CFN299-19	CFN299 <i>teuC1::Tn5-gusA1</i> , Km ^r
CIAT899	Tipo B, silvestre
CIAT899-191	CIAT899 <i>teuB::lacZ</i> , Km ^r

Rosenblueth M, et al., 1998

Esterilización de la semilla

La esterilización de la semilla es únicamente de la superficie de la misma. Se lavaron las semillas con etanol al 70%, durante 5 minutos, hipoclorito de sodio al 20%, durante 15 minutos y, posteriormente se realizaron varios lavados con agua destilada estéril.

Germinación de la semilla

En cajas de petri con agar al 0.75% se colocaron las semillas previamente estériles (aproximadamente 15 semillas por caja). Se incubaron a 30°C aproximadamente durante 2 días o hasta que las semillas germinaron.

Obtención del exudado de la raíz.

Se obtuvieron exudados de las variedades de frijol Negro Jamapa, Peruano, Americano, y Vaquita, así como de maíz criollo.

En vasos de vidrio de 1 litro, con una malla de plástico y 200 ml de solución Fahraeus (apéndice A), todo previamente estéril, se colocaron las semillas germinadas, cuidando que la raíz mas no la testa, este en contacto con la solución.

Las semillas tapadas se incubaron a 25° C durante 3 días.

El medio se centrifugó a 11,000 r.p.m. en una centrifuga eppendorf con rotor F34-6-38 de ángulo fijo, durante 10 minutos, a 4° C. Se recuperó el sobrenadante (exudado) y se guardó en alicuotas a -20° C, para su posterior uso.

En cajas con medio PY/Ca ó LB (apéndice A) se hicieron las respectivas pruebas de esterilidad.

Obtención de raíces

Para la obtención de raíces de frijol se utilizó la variedad Negro Jamapa, y maíz criollo.

Para ello, inicialmente se siguió el procedimiento de esterilización y germinación de la semilla. Posteriormente en matraces previamente estériles con agar/solución Fahraeus (3gr/200ml) se colocaron las semillas germinadas y se dejaron en la oscuridad para etiolar.

Luego, se taparon los matraces con tapones de hule espuma estériles y se incubaron a 25° C en el cuarto de plantas, que se encuentra programado con el fotoperíodo, el cual es de 12 hrs. luz, 12 hrs. oscuridad, con una humedad relativa de 80%.

Pasados 7 días, en condiciones de esterilidad, se sacaron las plantas de los matraces, se cortaron las raíces y se lavaron con agua destilada estéril. Posteriormente se congelaron las raíces con nitrógeno líquido y se colocaron en tubos de plástico de 50 ml para ser almacenadas a -70° C.

Obtención de un extracto de raíz enriquecido en glicoproteínas.

La raíz se maceró en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Se agregó PVPP y el buffer de extracción (apéndice A) en la proporción de 2 gr. de raíz por 3 ml de buffer. El extracto se centrifugó a 14,000 r.p.m., en una microcentrifuga eppendorf, durante 20 minutos a 4° C.

Se recuperó el sobrenadante, y se le añadió un volumen de TCA al 10%, (Lamport, 1970, Smith, et al. 1984 y Davies, et al. 1997). Se incubaron las muestras 10 minutos a 4° C, para luego centrifugarlas a 5000 r.p.m., en una microcentrifuga eppendorf, durante 10 minutos a 4° C. Se tomaron las glicoproteínas del sobrenadante y se colocaron en la parte exterior del "centricon 10,000" (para concentrar las muestras) y proseguir con la ultracentrifugación. Se centrifugó a 2000 r.p.m., con un rotor F-34-6-38 de ángulo fijo, durante 30 minutos a 4° C. Se añadió 4 ml de buffer Tris 50mM pH 7.0, y se centrifugó tres veces más a las mismas condiciones.

De esta manera se obtuvo el concentrado del extracto en cuestión.

Obtención de un extracto de semilla.

Para la obtención de un extracto de semilla se utilizó "harina de semilla de frijol", de la variedad Negro Jamapa. Se agregó buffer de extracción (apéndice A) en la proporción 4gr de harina de semilla por 3 ml de buffer. Posteriormente se centrifugó a 14,000 r.p.m en microcentrifuga eppendorf, durante 20 minutos a 4° C. Se recuperó el sobrenadante y se guardó en alícuotas a -20° C para su posterior uso.

Extracción de proteínas de pared celular (Cassab et al., 1985).

La raíz (en este caso de sólo 3 días después de la germinación) se maceró en un mortero con nitrógeno líquido y se añadió buffer de extracción (apéndice A) en la proporción 1gr de raíz por 3ml de buffer.

Se centrifugó a 10,000 r.p.m (en microcentrifuga eppendorf), 10 minutos a 4°C. Posteriormente se realizaron varios lavados de la pastilla con 0.5% Nonidet P40 y 2mM Na₂S₂O₅, para desechar los restos de membrana plasmática y 2mM Na₂S₂O₅ para eliminar el detergente.

La elución de proteínas se realizó aumentando la fuerza iónica con 0.2M CaCl₂ y 4mM Na₂S₂O₅ dejándolo en agitación suave toda la noche. Posteriormente se centrifugó a 10,000 r.p.m. en una centrifuga con un rotor F-34-6-38 de ángulo fijo, durante 10 minutos a 4° C. De esta manera se obtuvo en el sobrenadante las proteínas de pared celular.

Tratamiento a 95°C

Las muestras del exudado y del extracto de raíz enriquecido en glicoproteínas se calentaron a 95° C por intervalos de 10min, 20min, 30min, 60min, 1hr:30min, 2hrs, y 4 hrs.

Tratamiento con quimiotripsina

Las muestras del exudado y del extracto de raíz enriquecido en glicoproteínas se incubaron con quimiotripsina (10µg/ml) por intervalos de 30min, 60min, 1hr 30min, 2hrs y 4hrs a 37°C.

Lectinas de frijol

Las lectinas de semilla de frijol (PHA-P fitohemaglutinina; PHA-L leucoaglutinina; PHA-M fitohemaglutinina; y PHA-E eritroaglutinina) se adquirieron de Sigma.

Tratamientos con distintos amortiguadores y pH

Las muestras del extracto de raíz enriquecido en glicoproteínas fueron diluidas con distintos amortiguadores e igual pH, y con el mismo amortiguador con diferente pH.

Amortiguadores utilizados: 1) Tris 50mM 2) Na₂HPO₄ 50mM y 3) MES 0.5mM.

pH probados: 1) 5.5, 2) 7.0, 3) 7.5 y 4) 8.5

Tratamiento con anticuerpo contra hidroxiprolina de la testa de soya

(proporcionado por la Dra. Cassab, GI, IBT-UNAM).

Las muestras del exudado se incubaron a 37°C durante 30 minutos con diferentes cantidades del anticuerpo (10µl, 20µl, 40µl y 100µl) diluido este 1:300. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 14,000 r.p.m. en microcentrifuga eppendorf, durante 5 segundos a 4°C.

Inmunoprecipitación

1) Muestras con anticuerpo.

Se incubaron las muestras del exudado y de la fracción de raíz con el anticuerpo contra hidroxiprolina de la testa de soya, 1 hora a 4° C en agitación constante.

2) Pretratamiento de la proteína A-agarosa.

Se resuspendió la proteína A-agarosa, y se dejó en agitación durante 5 minutos a 4° C. Luego se centrifugó a 5,000 r.p.m (en microcentrifuga eppendorf) durante 2 minutos, a 4° C. Se realizó este mismo procedimiento 4 veces, resuspendiendo a la proteína en los primeros 3 tiempos con agua ultra pura, y en el último con Buffer1 (Apéndice A).

3) Inmunoprecipitación.

Se añadió a cada muestra con el anticuerpo, 50 µl de la proteína A-agarosa pretratada y se dejó en incubación durante 3 horas a 4° C.

Posteriormente se resuspendió la muestra con el Buffer1, y se dejó en agitación durante 20 minutos a 4° C. Luego se centrifugó durante 20 segundos a 14,000 r.p.m. en microcentrífuga eppendorf.

Este procedimiento se repitió nuevamente con el Buffer1, dos veces con el Buffer2 (apéndice A) y una vez con el Buffer 3 (apéndice A), para lavar y enjuagar muy bien la muestra.

Se incubó la muestra a 95° C durante 5 minutos.

Ensayo de inducción β -glucuronidasa con 4-MUG

Los ensayos con MUG se realizaron con la cepa CFN 299 como control y CFN 299-19 que tiene insertado el Tn5-*gusA1* en el gene *teuC1*. El ensayo se realizó de la siguiente manera (Jefferson, 1987):

Se crecieron las bacterias CFN 299 y CFN 299-19 en PY/Ca líquido y se dejaron en agitación toda la noche a 30° C.

El cultivo con una D.O. entre 0.2 – 0.6 a 600nm se incubó con el exudado (o lo que se iba a probar si inducía la expresión de los genes *teu*), en una proporción 1:1 (v/v), durante 3 horas a 30° C.

Posteriormente se tomaron 50 μ l del cultivo y se lisaron con 50 μ l del buffer de extracción GUS 2X (apéndice A).

Se precalentaron las muestras y el MUG (apéndice A) previamente disuelto a 37°C durante 15 minutos. Se añadieron 50 μ l de MUG a cada muestra y se dejó incubando a 37°C durante 30 minutos.

La reacción se detuvo con 1.35ml de Na_2CO_3 , 0.2M.

El fluorocromo 4-metilumbeliferona (MU) producto de la hidrólisis de 4-MUG por GUS se cuantificó usando un fluorómetro ($\lambda_{\text{ex}} = 365\text{nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 460\text{nm}$).

Para ajustarlo se siguieron las indicaciones de Gallagher (1992). Los datos se reportan en nM de MU/min/ 10^6 células. Para la obtención de datos significativos del ensayo de inducción, se realizaron de 10 a 15 repeticiones por muestra en cada experimento.

Análisis de proteínas

Se prepararon geles desnaturalizantes de acrilamida al 15% y al 10% (apéndice A), y se cargaron con muestras del exudado, de la fracción de la raíz, y del producto obtenido por la inmunoprecipitación. Las proteínas totales se tiñeron con azul de Coomasie (apéndice A). Las glicoproteínas se tiñeron con la tinción PAS (Sigma).

Experimento de agregación

Para realizar este experimento se utilizaron las cepas tipo B de *Rhizobium tropici*: CIAT899 (cepa silvestre) y CIAT899-191 (mutante afectada en los genes *feu*).

En tubos de ensayo se añadió 1ml del extracto de raíz enriquecido en glicoproteínas con una azada abundante de bacterias. Se midió la densidad óptica a 600nm y se dejaron incubando a 30° C durante 24 horas (3 horas con agitación continua y 21 horas sin agitación).

Las muestras se resuspendieron y se pasaron a tubos de 1.5ml. Se les midió la densidad óptica a 600nm y se centrifugaron a 14,000 r.p.m. en microcentrífuga eppendorf, durante 5 segundos.

Posteriormente, se tomaron 100 μ l del sobrenadante para medir nuevamente la densidad óptica. Con los valores de las densidades ópticas obtenidas, se calculó el coeficiente de agregación resultante.

Por otro lado, se observó en un microscopio estereoscópico el fenotipo de las cepas después de ser incubadas a 30°C durante 24 horas (3 horas en agitación continua y 21 horas sin agitación) con el extracto de raíz enriquecido en glicoproteínas.

Análisis del BLAST

Para el análisis del BLAST (del inglés: *Basic local alignment search tool*) se utilizó el programa "estándar nucleótido-nucleótido" del Centro Nacional de Información en Biotecnología (NCBI).

-RESULTADOS-

Efecto inductor de los exudados y extractos de plantas

Se obtuvo exudados de cuatro variedades cultivadas de *Phaseolus vulgaris* (Americano, Peruano, Negro Jamapa, y Vaquita), así como exudados y extractos de raíces de maíz Criollo.

El compuesto que induce la expresión de los genes *teu* se encuentra en todas las variedades de frijol probadas, pero no en maíz (Fig.9).

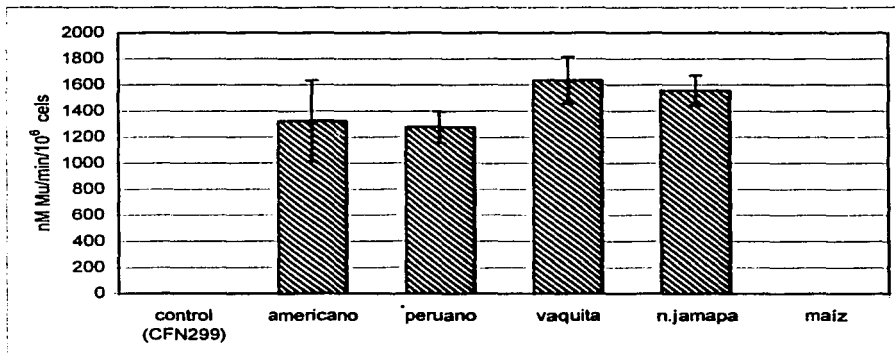


Fig. 9 Promedio de la actividad específica de β -glucuronidasa de la cepa CFN299-19 y la cepa CFN299 (control) después de ser incubadas con exudados de diferentes cultivares de frijol, y maíz criollo.

El compuesto inductor se encuentra en el extracto de la raíz, en el exudado de la raíz y en la semilla de frijol. Los resultados obtenidos, (Fig. 10) muestran diferencias significativas en la expresión de los genes *teu* según la zona o parte de la planta donde se obtuvo el compuesto.

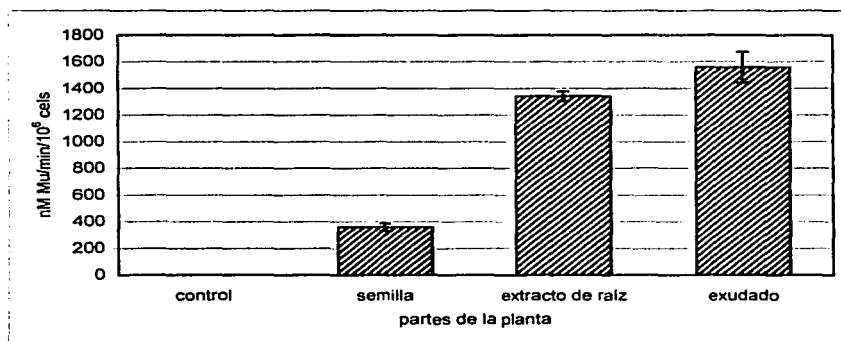


Fig. 10 Promedio de la actividad específica de β -glucuronidasa de la cepa CFN299-19 y de la cepa CFN299 (control) después de ser incubadas con diferentes partes de la planta de frijol.

Efecto inductor con un extracto de raíz enriquecido en glicoproteína

Los valores obtenidos de la actividad de β -glucuronidasa con un extracto de raíz enriquecido en glicoproteínas a diferentes diluciones, (Fig. 11) muestran que la dilución 1:40 corresponde al mismo nivel de actividad que la obtenida con el extracto de semilla.

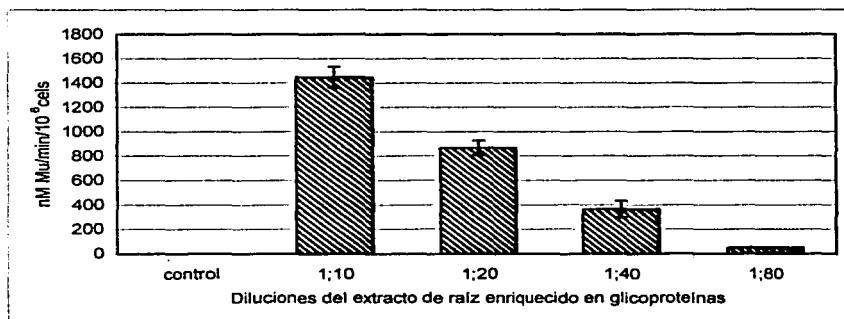


Fig. 11 Promedio de la actividad específica de β -glucuronidasa de la cepa CFN299-19 y la cepa CFN299 (control) después de ser incubadas con diferentes diluciones de un extracto de raíz enriquecido en glicoproteínas.

El papel del pH en la inducción de los genes *teu*

La inducción de los genes *teu* es dependiente del pH. Se realizaron varios ensayos de inducción de β -glucuronidasa con el compuesto inductor diluido en distintos amortiguadores con igual pH, y con los mismos amortiguadores con diferente pH. Se encontró que el pH (5.8), que es el más cercano al pH de la rizósfera, es el óptimo para obtener una buena inducción.

Además la utilización del amortiguador MES (ácido 2-(N-morfolino) etanolsulfónico) optimiza aún más el ensayo de inducción (datos no mostrados).

El compuesto inductor es una macromolécula

El compuesto principal no se ha identificado aún, pero los resultados obtenidos por centrifugación con "centricon 10,000" sugieren que el inductor es una macromolécula con peso molecular mayor a 10 kD.

La obtención de una fracción enriquecida en glicoproteínas del extracto de raíz, sugiere que el compuesto inductor es una proteína glicosilada.

El análisis de las proteínas del exudado en geles desnaturalizantes de acrilamida al 15% teñidos con PAS y azul de Coomasie muestran que hay dos proteínas glicosiladas de peso molecular de 22 y 36 kD, bastante abundantes; candidatas a ser el compuesto que induce la expresión de los genes *teu* (Fig. 12).

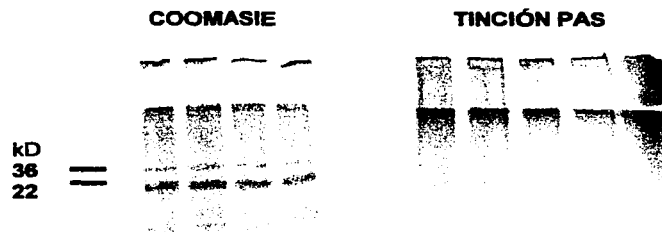


Figura 12. Geles desnaturalizantes de acrilamida al 15% con muestras de exudado, en donde se observa que las proteínas (de tamaño entre 22 y 36 kD) del gel teñido con coomasie, corresponden a proteínas glicosiladas en el gel teñido con la tinción PAS.

TRATAMIENTOS

a) Calentamiento a 95° C

Se probó la estabilidad del compuesto inductor del exudado y del extracto de raíz enriquecido en glicoproteína a 95° C en diversos intervalos.

Se observó que la actividad de β -glucuronidasa en respuesta al exudado tratado a 95° C, se incrementa en cada medición (9.5%) con respecto al anterior hasta los 30 minutos de incubación. Después disminuye un 12% en los tiempos siguientes (Fig.13).

Se observa el mismo comportamiento con el extracto de raíz enriquecido en glicoproteínas tratado a 95°C. Sin embargo, el decremento es más pronunciado después de 30 minutos de incubación. A los 30 minutos, la inducción disminuye un 12% con respecto a la medición anterior. En cambio, en los tiempos siguientes (1hr, 2hrs y 4hrs) el porcentaje de disminución de la inducción es de 38%, 56% y 73%, respectivamente con referencia a la medición anterior (Fig.14).

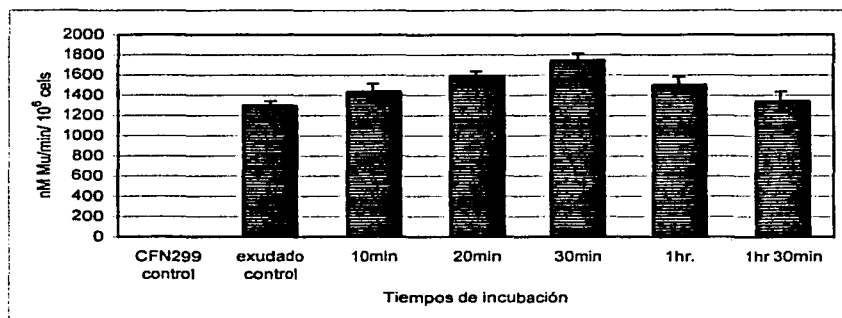


Fig. 13 Promedio de la actividad específica de β -glucuronidasa de las cepas CFN299-19 y CFN299 (control) obtenida con exudado tratado a 95° C durante diferentes tiempos. Exudado control, sin tratamiento.

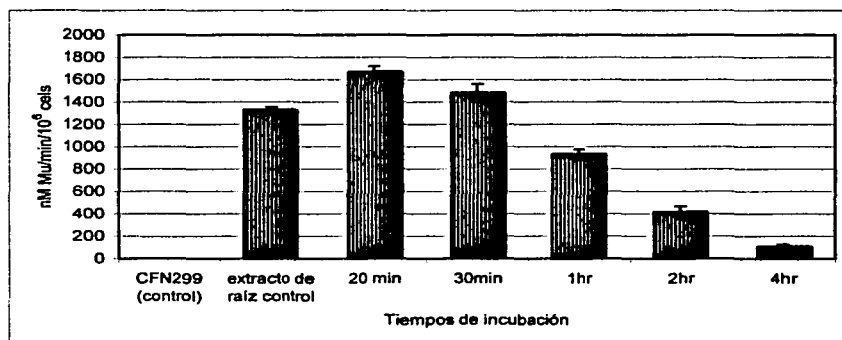


Fig. 14 Promedio de la actividad específica de β -glucuronidasa de las cepas CFN299-19 y CFN299 (control), obtenida con el extracto de raíz enriquecido en glicoproteína, tratado a 95° C durante diferentes tiempos. Control: extracto de raíz sin tratamiento

b) Quimiotripsina

Se probó el efecto de un tratamiento de quimiotripsina sobre el exudado y el extracto de raíz enriquecido en glicoproteínas a distintos tiempos.

La figura 15 muestra los resultados de la actividad de β -glucuronidasa obtenida con exudados de raíz tratados con quimiotripsina, en los que se observa un incremento de la inducción hasta una hora de incubación. Este aumento en la inducción no es lineal: hay un aumento de 2.6% del tiempo cero (control) al tiempo 1 (10min), de 7.5% del tiempo 1 al tiempo 2 (20min), de 12% del tiempo 2 al tiempo 3 (30min) y de 6.25% del tiempo 3 al tiempo 4 (1hr).

Sin embargo, la actividad disminuye 6.2% del tiempo 4 al tiempo 5 (1hr 30min), y se mantiene prácticamente constante del tiempo 5 al tiempo 6 (2hrs) con un decremento en la actividad de tan sólo 0.75%.

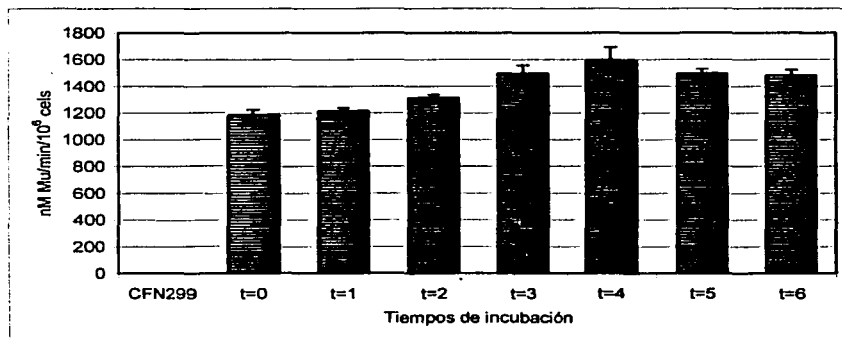


Fig. 15 Promedio de la actividad específica de β -glucuronidasa del gen *gus A* (reportero de la expresión de los genes *teu*) en presencia de exudado tratado con quimiotripsina a diferentes tiempos: t=0 (control sin tratamiento), t=1 (10min), t=2 (20min), t=3 (30min), t=4 (1hr), t=5 (1hr 30min) y t=6 (2hrs).

Con muestras de extracto de raíz enriquecido en glicoproteína se observa un incremento (12%) en la actividad de β -glucuronidasa a los 30 minutos (tiempo 1). Posteriormente la actividad decrece (2%) y se mantiene sin cambios considerables (Fig.16).

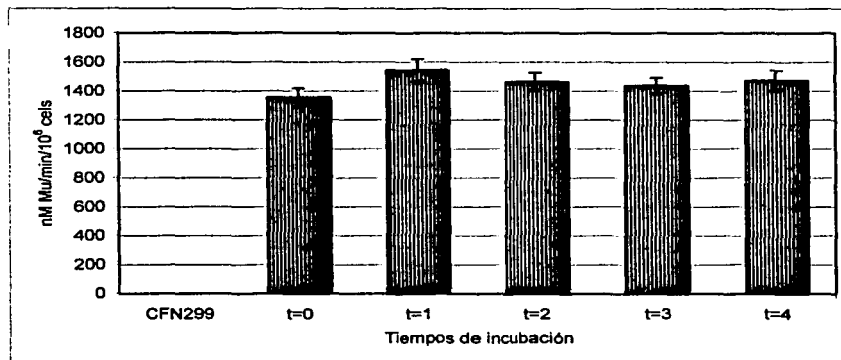


Fig. 16 Promedio de la actividad específica de β -glucuronidasa del gen *gus A* (reportero de la expresión de los genes *teu*) en presencia del extracto de raíz enriquecido en glicoproteína tratado con quimi tripsina a diferentes tiempos: t=0 control (sin tratamiento), t=1 (30min), t=2 (1hr), t=3 (2hrs.), t=4 (4hrs).

c) Lectinas de semilla de frijol

No se obtuvo inducción de los genes *feu* con las lectinas de semilla de frijol probadas PHA-P, PHA-L, PHA-M, y PHA-E (Sigma) a diferentes concentraciones (datos no mostrados).

d) Extracto de pared celular

Tampoco se obtuvo inducción con extracto de proteínas de pared celular de plantas de 3 días después de la germinación (datos no mostrados).

Inhibición de la inducción de los genes *teu*

Se obtuvo inhibición de la actividad de β -glucuronidasa con un anticuerpo policlonal dirigido contra glicoproteínas ricas en hidroxiprolina de la testa de soya en ensayos en los que se utilizó el exudado de frijol como inductor de los genes *teu* (Fig. 17).

La inhibición máxima obtenida fue de 94% con 40ul de anticuerpo.

El resultado con 100ul de anticuerpo se explica por la saturación de la reacción antígeno-anticuerpo, generada por un exceso en la cantidad añadida de anticuerpo.

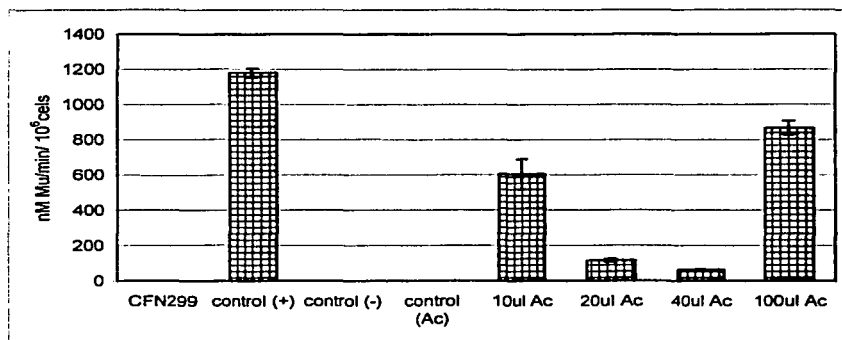


Gráfico 17. Promedio de la actividad de β -glucuronidasa del gen *gusA*, (reportero de la expresión de los genes *teu*) en presencia de exudado tratado con el anticuerpo contra hidroxiprolina (Ac) a las diferentes concentraciones que se indican. El control (+) es exudado sin tratamiento, el control (-) suero preinmune de conejo, y el control (Ac) es anticuerpo con buffer.

Inmunoprecipitación

En un gel desnaturalizante de acrilamida al 10% con el producto obtenido de la inmunoprecipitación, se observó una proteína con peso molecular de alrededor de 57 kD, además del anticuerpo utilizado (Fig. 18).

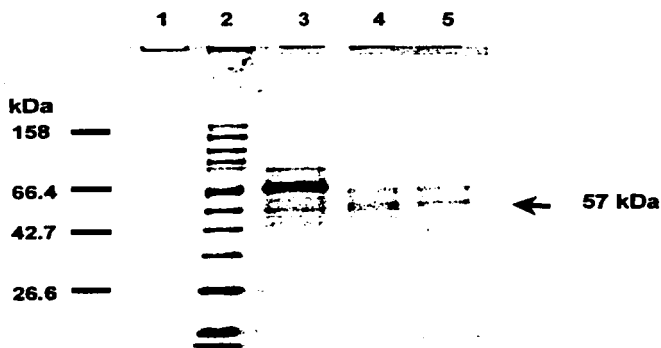


Fig. 18. Gel desnaturalizante de acrilamida al 10%, teñido con azul de Coomassie. (2=marcador de P.M., 3=control (Ac), 4= producto de la inmunoprecipitación con muestras de exudado; 5= producto de la inmunoprecipitación con muestras de fracción de raíz.

Análisis del BLAST

El análisis del BLAST (NCBI) realizado muestra que los genes *teu* tienen un 92% de similitud con diferentes regiones del gen *riof4* de *Agrobacterium rhizogenes*.

Experimento de agregación

Los datos obtenidos en el experimento de agregación, muestran que la cepa silvestre de *Rhizobium tropici* tipo B (CIAT899) en presencia de un extracto de raíz enriquecido en glicoproteínas a diferentes diluciones se agrega, mientras que una mutante en los genes *teu* (CIAT899-191) no presenta este fenómeno (Fig.19).

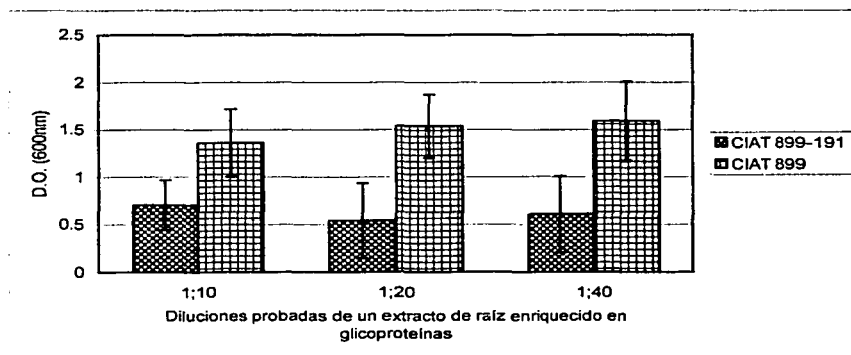
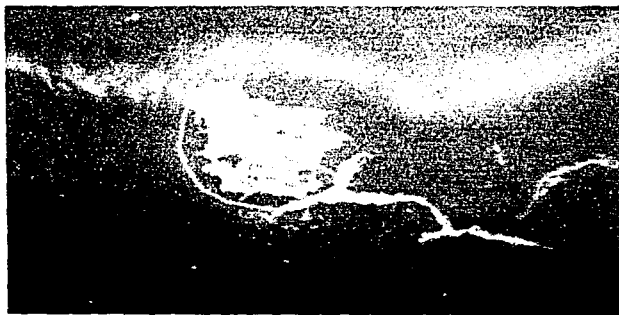


Fig.19 Promedio del coeficiente de agregación de las cepas tipo B de *Rhizobium tropici* (CIAT899 y CIAT899-191) en presencia de un extracto de raíz enriquecido en glicoproteínas.

Las fotografías obtenidas por un microscopio estereoscópico muestran el fenotipo de las cepas tipo B de *Rhizobium tropici*, después de ser tratadas con un extracto de raíz enriquecido en glicoproteína a una dilución 1:20 (Fig. 20).

En la cepa silvestre CIAT899 ocurre el fenómeno de agregación, mientras que en la mutante (CIAT899-191) es notorio que no ocurre este fenómeno.

CIAT899



CIAT899-191

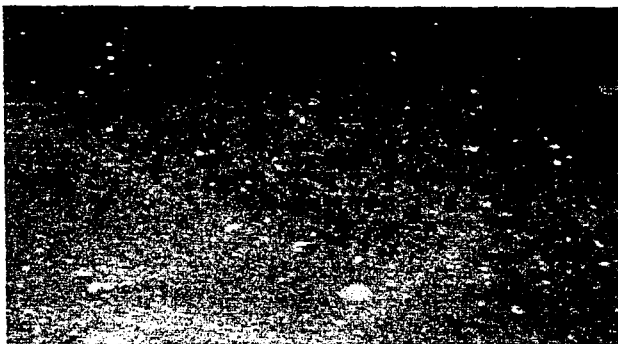


Fig.20. Fenotipo de las cepas silvestre y mutante en el experimento de agregación

-DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES-

El compuesto inductor de los genes *teu* es exudado aparentemente en forma específica por plantas de la subtribu Phaseolinae, subfamilia Papilionoidae a la que pertenecen *Phaseolus vulgaris* y *M. atropurpureum*, ya que exudados de otras plantas no indujeron la expresión de los genes *teu*. Es probable que el exudado de *Macroptilium* y *Phaseolus* sea diferente o que se encontrase en cantidades distintas, ya que el exudado de *Macroptilium* nunca dio una inducción mayor al 30% con respecto al de *Phaseolus* (Rosenblueth, et al. 1998).

El compuesto inductor de los genes *teu* está presente en distintas cantidades dependiendo de la parte de la planta en donde se extraiga, lo que supone que podría haber cierta relación en la producción del compuesto inductor y el desarrollo de la planta.

En la búsqueda y caracterización inicial del compuesto inductor de los genes *teu* M. Rosenblueth, (1998) encontró una fracción del exudado de la raíz de peso semejante a un disacárido que era el compuesto inductor de los genes *teu*. En esta tesis describo que además existe una macromolécula con tamaño superior a 10 kD capaz de inducir la expresión de los genes *teu*.

Los datos en conjunto (principalmente los de inhibición de la inducción por el anticuerpo y el gel de acrilamida al 10% producto de la inmunoprecipitación) apuntan a que el compuesto inductor de los genes *teu* pudiera tratarse de una glicoproteína rica en hidroxiprolina con peso molecular de alrededor de 57 kD.

El análisis de proteínas del exudado en geles desnaturalizantes de acrilamida al 15% teñido con PAS y azul de Coomasie, muestran dos proteínas glicosiladas, de 22 y 36 kD que pudieran ser productos derivados de la glicoproteína de 57 kD obtenida por la inmunoprecipitación.

Las proteínas altamente glicosiladas son resistentes a quimiotripsina y a tratamientos desnaturalizantes a 95° C hasta un período razonable de exposición. El fraccionamiento sucesivo de la proteína exudada, generado por ambos tratamientos, pueden producir péptidos aún inductores de los genes *teu*. Sin embargo, los productos obtenidos de ambos tratamientos son diferentes. La quimiotripsina digiere en sitios específicos y genera por tanto, un número limitado de péptidos aún inductores. En cambio, con un tratamiento a 95° C, depende del tiempo de exposición para que el compuesto sea todavía activo e induzca la expresión de los genes *teu*.

Se puede especular entonces, que los compuestos de bajo peso molecular que Rosenblueth describió, y que encontró que eran heterogéneos, sean productos derivados de una glicoproteína que es el hallazgo de esta tesis.

De esta manera, propongo un modelo para explicar lo que pudiera estar ocurriendo con el compuesto inductor en relación a la expresión de los genes *teu* de *Rhizobium tropici* (Figura 20).

La proteína inductora de los genes *teu*, que es exudada por la raíz del frijol, pudiera ser excretada de dos formas:

- 1) Completa, sin alguna modificación en su estructura, es decir, la proteína nativa.
- 2) Fraccionada, por proteasas para facilitar el transporte por la raíz hacia el exterior (la rizósfera).

Es factible que la proteína sea degradada previamente, ya que los compuestos de bajo peso molecular son más móviles y difusibles en el suelo, lo que favorecería, si llegara a distancias más largas la señal, a advertir a un número mayor de bacterias de la presencia de la planta.

El reconocimiento de las bacterias por el compuesto inductor, también pudiera ocurrir de dos maneras:

- a) Que el reconocimiento para la inducción de los genes *teu* sea en la superficie celular de la bacteria.
- b) Que el reconocimiento para la inducción de la expresión de los genes *teu* sea interno, una vez que el compuesto haya sido introducido por la bacteria.

Varios experimentos realizados por M, Rosenblueth (1998) muestran que cuando el compuesto se expone a diferentes bacterias, éste es internalizado por la bacteria y tal vez degradado casi en su totalidad.

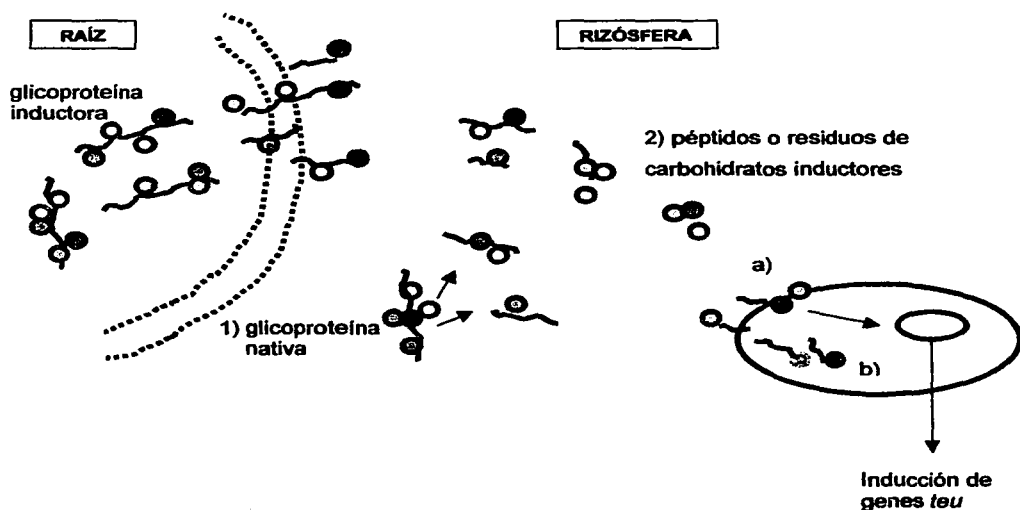


Figura 20. Modelo propuesto para explicar lo que ocurre con el compuesto inductor durante la expresión de los genes *feu*, los círculos en colores se refieren a las variantes de carbohidratos que pudiera tener la glicoproteína inductora, a y b son los posibles reconocimientos por la bacteria.

Por otro lado, y como se mencionó anteriormente, en plantas superiores se han descrito tres clases de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina: 1) las lectinas (Allen, 1978); 2) las extensinas (Lamport, 1965) y 3) los arabinogalactanos (Fincher, 1983).

Faltaría realizar varios experimentos para asegurar si la glicoproteína rica en hidroxiprolina (HRGP) que induce la expresión de los genes *teu*, es alguna de estas tres clases de glicoproteínas. Sin embargo, por la bibliografía consultada y los resultados obtenidos se puede plantear como hipótesis de trabajo, que la glicoproteína inductora pudiera ser un arabinogalactano.

Las lectinas son glicoproteínas con la propiedad de hemaglutinar, y su actividad puede ser inhibida por di, tri N-acetilglucosamina.

Las extensinas, son el mayor componente de la pared celular primaria, y su función es básicamente de tipo estructural.

En cambio, los arabinogalactanos (AGP's) son proteínas solubles y componentes mayoritarios de resinas y exudados (Fincher, 1983). Además, aunque todavía no está claro la función fisiológica de estas proteínas, varios autores sugieren que pudieran estar implicadas en distintas interacciones, como la interacción simbiótica existente entre plantas y bacterias (Clarke et al., 1979, Fincher et al., 1983).

Existen actualmente diversos protocolos muy específicos para dilucidar esta situación. Las AGP's, por ejemplo, se unen específicamente y son precipitadas por el reactivo β -glicosil Yariv (Jermyn y Yeow, 1975), por lo que sería interesante utilizarlo posteriormente para aclarar esta propuesta.

En conclusión, se encontró que una glicoproteína rica en hidroxiprolina con un peso molecular de alrededor de 57 kD, tiene la capacidad de inducir la expresión de los genes *teu* en *Rhizobium tropici*.

Por otro lado, sería importante explorar con más profundidad la relación y la función en los genes equivalentes de los genes *teu* de *Agrobacterium rhizogenes*. Sería interesante determinar si mutantes en los genes equivalentes, tienen un papel en tumorigenesis y si también son inducibles por el compuesto exudado del frijol que he encontrado. Esto permitiría esclarecer con mayor precisión el papel que juegan estos genes en la especificidad e interacción temprana existente entre *Phaseolus vulgaris* y *Rhizobium tropici*.

-CONSIDERACIONES FINALES-

Perspectivas sobre la investigación de la fijación de nitrógeno

La investigación sobre este tema debe continuar activamente, tanto por su interés en la agricultura, como por el simple hecho de comprender mayormente los maravillosos y complejos mecanismos que intervienen en la simbiosis entre plantas y bacterias.

La fijación biológica de nitrógeno es un proceso natural muy importante que debería expandirse y aprovechar en todos los sistemas agrícolas del mundo, reemplazando totalmente a los fertilizantes sintéticos tan desfavorables para el medio ambiente.

Además, algo importante que pocas veces se toma en cuenta, es informar a los agricultores y a la sociedad en general sobre las ventajas reales que tiene este proceso a gran escala y con mayor apoyo económico.

La fijación biológica del nitrógeno es un proceso con ventajas globales. Por ello, las aportaciones a este tema son de suma importancia para todos, no sólo para los que pretendemos seguir en esta área de investigación.

-APENDICE A-**Solución Fahraeus:**

MgSO₄; CaCl₂; FeC₆H₅O₇; Na₂HPO₄; KH₂PO₄; Trazas (H₃BO₃; MnSO₄ 4H₂O; ZnSO₄ 7H₂O; CuSO₄ 5H₂O; H₂MoO₄ H₂O).

Buffer de extracción de proteínas:

Buffer Hepes 50 mM pH 7.8, EDTA 100mM, glicerol 20%, etilenglicol 5%, DTT 5mM, PMSF 100mM

Buffer de extracción para proteínas de pared celular:

0.1% acetato de potasio pH 5.0; 4mM Na₂S₂O₅; 1%PVPP

Buffer de extracción GUS 2X:

NaPO₄ 50mM pH 7.0; β-mercaptoetanol 10mM; Na₂ EDTA 10mM; Sarcosyl 0.1%; Triton X-100 0.1%

MUG 3X:

Disolver 22mg en buffer GUS 1X.

Inmunoprecipitación:

Buffer 1, Tris 50mM pH 7.5, NaCl 150mM, EDTA 1mM, PMSF 1mM, Nonidet P40 1%.

Buffer 2, Tris 50mM pH 7.5, NaCl 500mM, Nonidet P40 0.1%.

Buffer 3, Tris 50mM pH 7.5, Nonidet P40 0.1%.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Medio PY:

Peptona de caseína 0.5%; extracto de levadura 0.3%

Para PY sólido se le añade además 1.5% de agar.

Medio LB:

Peptona de caseína 1%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 1%

Para LB sólido se le añade además 1.5% de agar.

GEL SDS-PAGE:

<i>Concentrador 5%</i>		<i>Separador 10%</i>	
Agua	3.4ml	Agua	4.0ml
Acril bis 30%	0.83ml	Acril bis 30%	3.3ml
Tris 1M pH 6.8	0.63ml	Tris 1.5M pH 8.8	2.5ml
SDS 10%	50 μ l	SDS 10%	100 μ l
APS 10%	50 μ l	APS 10%	100 μ l
TEMED	4 μ l	TEMED	6 μ l

Tinción PAS:

Kit de detección de glicoproteínas (SIGMA)

Tinción Azul de Coomasie:

Solución fijadora: Metanol 50%, 10% ácido acético.

Solución de tinción: Azul brillante G 0.025%, 10% ácido acético.

Solución para destefir: 10% ácido acético.

-APÉNDICE B-
ABREVIATURAS

Acrilbis: N,N-metileno-bis acrilamida

APS: Persulfato de amonio

DTT: DL-Ditiotreitol

EDTA: Etilendiaminotetra acético.

GUS: β -glucuronidasa

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.

Km^f: Resistente a canamicina.

MES: Ácido 2-(N-morfolino) etanolsulfónico

MU: 4-metilumbeliferona

MUG: 4-metilumbeliferil-b-D- glucurónido.

PAS: Reactivo de Schiff's

PMSF: Fenilmetilsulfonilfluorido.

PVPP: Polivinilpolipirrolidona

SDS: Sodio dodecil sulfato

SDS-PAGE: Gel desnaturalizante de poli(acrilamida

TCA: ácido tricloroacético

TEMED: N N N'N' tetrametiletilendiamina

Tris: Hidroximetil-aminometano

-BIBLIOGRAFÍA-

- Allen AK, Desai NN, Neuberger A, Creeth JM, 1978. Properties of potato lectin and the nature of its glycoprotein linkages. *Biochem. J.* 171: 665-674.
- Baron C, Zambryski PC, 1995. The plant response in pathogenesis, symbiosis and wounding: variations on a common theme?. *Annu. Rev. Genetics* 29:107-129.
- Batley NH, Blackbourn HD, 1993 The control of exocytosis in plant cells. *New Phytol.* 125:307
- Bohlool BB, Schmidt EL. 1974, Lectins a Possible Basis for Specificity in the Rhizobium-legume Root Nodule Symbiosis. *Science* 185: 269-271
- Borisjuk NV, Borisjuk LG, Logendra S, Petersen F, Gleba Y, Raskin I, 1999. Production of recombinant proteins in plant root exudates. *Nature Biotechnology* 17: 466-469.
- Bruehl GW, 1987. The rhizosphere. In soil borne plant pathogens. Mac Millan Publishing Company, New York, Capitulo 7, 105-116 pp.
- Cassab GI, 1986. Arabinogalactan-proteins during the development of soybean (*Glycine max*) root nodule. *Planta* 168:441-446.
- Cassab GI, Nieto-Sotelo J, Cooper JB, van Holst GJ, Varner JE, 1985. A developmentally regulated hydroxiprolin-rich glycoprotein from the cell walls of soybean seed coats. *Plant Physiol.* 77: 532-535.
- Clarke AE, Anderson RL, Stone BA, 1979. Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins. *Phytochemistry* 18:521-540.
- Cronquist A, 1981. An Integrated systema of classification of flowering plants. Columbia University Press New York pp 1262.
- Curl EA, y Truelove B. 1986. The Rhizosphere. Springer-Verlag (Berlin).
- Currier WW, Strobel GA, 1977. Chemotaxis of *Rhizobium spp.* to a glycoprotein produced by birdsfoot trefoil roots. *Science* 196:434-435.
- Davies HA, Findlay K, Daniels MJ, Dow JM, 1997. A novel proline-rich glycoprotein associated with the extracellular matrix of vascular bundles of *Brassica* petioles. *Planta* 202: 28-35.

Dazzo FB, Hubbell HD, 1975 Cross-reactive antigens and lectins as determinants of symbiotic specificity in the *Rhizobium*-clover association. Appl. Microbiol 30: 1017-1033

Debouck DG, 1986. Primary diversification of *Phaseolus* in the Americas: three centres?. Plant genetic resources newsletter. 67:2-8.

Debouck DG, 1994. Evolución de las especies cultivadas de frijol: la opinión de un herético, 11vo congreso Latinoamericano de genética (área vegetal) y XV congreso de fitogenética, del 25 al 30 de septiembre, Monterrey, Nuevo León, pp 30-65.

Dessaux Y, Petit A, Tempe J, 1992. Opines in *Agrobacterium* biology. En Verma DPS (eds). Molecular signals in plant-microbe communications. CRC Press Boca Ratón Fla pp 109-136.

Díaz CL, Melchers LS, Hooykaas, PJJ, Lugtenberg BJ, Kijne JW, 1989, Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium* legume symbiosis. Nature 338: 579-581.

Etzler M, Kalsi G, Ewing NN, Roberts N, Bradley R, Murphy J, 1999. A nod factor binding lectin with apyrase activity from legume roots. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96: 5856-5861.

Fincher GB, Stone BA, Clarke AE, 1983. Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis and function. Annu. Rev. Plant Physiol. 34:47-70.

Firmin JL, Wilson KE, Rossen L, Johnston AWB, 1986. Flavonoid activation of nodulation genes in *Rhizobium* reversed by other compounds present in plants. Nature 324:90-92.

Frenzl B, 1960. Zur Atiologie der Anreicherung von Animosarum und Amiden im Wurzelraum von *Helianthus annuus*. Planta 55:169.

Gallagher, SR, 1992. Quantitation of GUS activity by fluorometry. En: Gallagher SR, (ed.) GUS protocols. Using the GUS gene as a reporter of gene expression. Academic Press, San Diego 47-59 pp.

Gepts P, 1988. Phaseolin as an evolutionary marker. En Gepts P, (comp), Genetic resources of *Phaseolus* beans: their maintenance, domestication, evolution and utilization, Kluwer, Dordrecht, p 215-241.

Gollotte A, Gianiazzi-Pearson V, Gianiazzi S, 1995. Immunodetection of infection thread glycoprotein and arabinogalactan-protein in wild-type *Pisum sativum* (L.) or an isogenic mycorrhiza-resistant mutant interacting with *Glomus mosseae*. *Symbiosis* 18:69-85.

Guern J, Renaudin JP, Brown SC, 1987 The compartmentation of secondary metabolites in plant cell cultures. *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol.4 Academic Press, USA page 43.

Guzmán-Maldonado SH, Paredes-López O, 1998 Functional products of plant indigenous to Latin America: Amaranth, quinoa, common beans and botanicals, en G Mazza (comp), *Functional Foods-Biochemical and Processing Aspects*, Technomic, Lancaster, 293-328 pp.

Hale, MG; Moore, LD; 1979. Factor affecting root exudation II: 1970-1978. *Advances in Agronomy*. Academic Press, Inc. 31:93-124

Halverson LJ, Stacey G, 1985 Host Recognition in the *Rhizobium*-Soybean Symbiosis. *Plant Physiol.* 77:621-625.

Halverson LJ, Stacey G, 1986 Effect of Lectin on Nodulation by Wild-Type *Bradyrhizobium japonicum* and a Nodulation -Defective Mutant. *Appl and Environ Microbiol.* 753-760.

Hamblin J. Kent SP, 1973 Possible Role of Phytohemagglutinin in *Phaseolus vulgaris* L. *Nat. New Biol.* 245: 28-29.

Hernández-Lucas, I., M. A. Pardo, L. Segovia, J. Miranda, and E. Martínez-Romero. 1995. *Rhizobium tropici* chromosomal citrate synthase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3992-3997.

Hiltner L, 1904. Über neuerer Erfahrungen und Problem auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Grundungung und Brache. *Arb. Dtsch. Landwirt. Ges.* 98:59.

Hungria M, Pedrosa F, Yates G, Newton W, 2000 Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity. *Proceedings of the 12th international congress on nitrogen fixation Foz do Iguaçu, Paraná Brazil, September 12-17, 1999.*

Hynes MF, O'Connell MP, 1990. Host plant effect on competition among strains of *Rhizobium leguminosarum*. *Canadian journal of microbiology* 36: 864-869.

Jefferson RA, 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant molecular biology reporter* 5:(4) 387-405.

- Jermyn MA, 1978. Isolation from the flowers of *Dryandra praemorsa* of a flavonol glycoside that reacts with β -lectins. Aust. J. Plant Physiol. 5:697-705.
- Jermyn MA, Yeow YM, 1975. A class of lectins in the tissues of seed plants. Aust. J. Plant Physiol. 2:501-531.
- Jimenez-Zurdo JI, van Dillewijn P, Soto MJ, de Felipe MR, Olivares J, Toro N, 1995. Characterization of *Rhizobium meliloti* proline dehydrogenase mutant altered in nodulation efficiency and competitiveness on alfalfa rotos. Mol. Plant-Microbe Interact. 8:492-498.
- Jones DL, Edwards AC, Donachie K, Darrah PR, 1994. Role of proteinaceous amino acids released in root exudates in nutrient acquisition from the rhizosphere. Plant Soil 158:183.
- Kijne JW, Bauchrowitz MA, Díaz CL, 1997. Root lectins and Rhizobia. Plant Physiol. 115: 869-873.
- Lampert DTA, 1965. The protein component of primary cell walls. Adv. Bot. Res. 2:151-218.
- Lampert DTA, 1970. Cell wall metabolism. Annu. Rev. Plant Physiol. 21:235-270
- Long, S.R. 1989 Rhizobium-legume nodulation: life together in the underground. Cell 56, 203-214.
- Lynch J.M, 1983. Soil Biotechnology: "Microbiological Factors in Crop Productivity". Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 191.
- Majewska-Sawka A, Nothnagel EA, 2000. The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development. Plant Physiol. 122:3-9.
- Marschner H, 1995 Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd ed. Academic Press, London.
- Martínez E, Hernández G, 1999. Highlights of nitrogen fixation research. North American Conference on Symbiotic Nitrogen Fixation (16th 1998 Cancun, Mexico).
- Martínez-Romero E, Segovia L, Mercante F M, Franco A A, Graham P and Pardo M A 1991 *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. Int. J. Syst. Bacteriol. 41, 417-426.

- Mavingui P, Flores M, Romero D, Martínez-Romero E and Palacios R 1997 Generation of Rhizobium strains with improved symbiotic properties by random DNA amplification (RDA). *Nat. Biotechnol.* 15, 564-569.
- Mestrallet MG, Defilpo SS, Abril A, 1999. Efectos de la adición de lectina específica sobre la simbiosis *Rhizobium leguminosarum-Phaseolus vulgaris*. *Revista Argentina de Microbiología* 31:72-77.
- Murphy, et al. 1988 Synthesis of an opine-like compound, a rhizopine, in alfalfa nodules is symbiotically regulated. *Proceedures of the National Academy of Sciences U.S.A.* 85: 9133-9137
- Murphy, et al.1995 Rhizopines their role in simbiosis and competition. *Soil Biology and Biochemistry* 27:525-529.
- Murray DR, 1979. Nutritive role of the seed coats during embryo development in *Pisum sativum* L. *Plant Physiol.* 64:763-769.
- Neumann G, Römheld V, 2001. The release of root exudates as affected by plant's physiological status. En: *The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface*. Pinton R, Varanini Z, Nannipieri P (eds). New York Basel, USA.
- Newton WE, 1999. Nitrogen fixation in perspective. En: *Nitrogen Fixation from molecules to crop productivity, 12th International Congress on Nitrogen fixation*, Brazil, 1999.
- O'Connell, et al. 1996. Engineering the rhizosphere: expressing a bias. *Tibtechnology* 14:83-88
- Parniske M, Ahlborn B, Werner D, 1991. Isoflavonoid-inducible resistance to the phytoalexin glyceollin in soybean rhizobia. *Journal of bact.* 173: 3432-3439.
- Phillips DA, 1992. Flavonoids: Plant signals to soil microbes. *Recent Adv. Phytochem.* 26:201-231.
- Phillips DA, Streit WR, Volpin H, Palumbo JD, Joseph CM, Sande ES, Buijrn FJ, Kado CI, 1996. Plant regulation of bacterial root colonization En: *Stacey G, Mullin B, Gresshoff PM (eds) Biology of Plant Microbe Interactions. Int. Soc Mol Plant-Microbe Interac.* 1: 481-466.
- Pinton R, Varanini Z, Nannipieri P (comp) 2001. *The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface*. New York Basel, USA.

Prikryl Z, Vancura V, 1980. Root exudates of plants: VI. Wheat root exudation as dependent on growth, concentration gradient of exudates and the presence of bacteria. *Plant and Soil* 57:69.

Pseumans WJ, Van Damme EJM, 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.* 109: 347-352.

Redmond JW, Batley M, Djordjevic MA, Innes RW, Kuempel PL, and Rolfe G, 1986. Flavones induce expresion of nodulation genes in *Rhizobium*. *Nature* 323: 632-635.

Reyes-Moreno C, Paredes-López O, 1993. Hard-to-cook phenomenon in common beans. *Critical review in food science and nutrition.* 33:227-286.

Richard, 1987. The microbiology of terrestrial ecosystems. Longman scientific and technical (Essex). Capítulo 6 pp 222-254.

Rosenblueth M, Hynes MF, Martínez-Romero E 1998 *Rhizobium tropici* *teu* genes involved in specific uptake of *Phaseolus vulgaris* bean-exudate compounds. *Mol.Gen.Genet.* 258:587-598.

Rosenblueth M, Martínez J, Martínez-Romero E, 2001. Ecología química de la rizósfera y en las simbiosis de plantas. En: *Relaciones químicas entre organismos: aspectos básicos y perspectivas de su aplicación.* Anaya AL, Plaza y Valdez (coord.). UNAM. 99-137.

Rovira A D, 1969. Plant root exudates. *Bot. Rev.* 35:35.

Samson MR, Klis FM, Sigon CAM, Stegwee D, 1983. Localization of arabinogalactan-proteins in the membrane system of etiolated hypocotyls of *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 159:322-328.

Schultz C, Wilson P, Oxley D, Youl J, Bacic A, 1998. GPI-anchors on arabinogalactan-proteins: implications of signalling in plants. *Trends Plant Sci.* 3:426-431.

Serpe MD, Nothnagel EA, 1999. Arabinogalactan-proteins in the multiple domains of the plant cell surface. *Adv. Bot. Res.* 30: 207-289.

Smith JJ, Muldoon EP, Lampion DTA, 1984. Isolation of extensin precursors by direct elution of intact tomato cell suspension cultures. *Phytochemistry* 23: (6) 1233-1239.

Soedarjo, M y Borthakur, D. 1996. Mimosine produced by the tree-legume *Leucaena* provide growth advantages to some Rhizobium strains that utilize it as a source of carbon and nitrogen. *Plant and Soil*, 186:87-92.

Sousa-Sanchez M, Delgado-Salinas A, 1993. Mexican leguminosaeae: Phytogeographic endemism and origins. En: Ramamoorthy TP, Bye R, Lot A, Fa J, (comps), *Biological diversity in Mexico: origins and distribution*, Oxford University Press, Nueva York, pp 459-511.

Spaink HP, 1995. The molecular basis of infection and nodulation by rhizobia the ins and outs of symbiogenesis *Ann. Rev. Phytopath* 33:345-368.

Spaink HP, 2000. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:257-288.

Tepfer, et al. 1988 A plasmid of *Rhizobium meliloti* 41 encodes catabolism of two compounds from root exudate of *Calystegium sepium*. *Journal of Bacteriology* 170: 1153-1161.

Tramontano, et al. 1986 A survey of trigonelline concentrations in dry seeds of the Dicotyledoneae. *Environmental and Experimental Botany* 26: 197-205.

Tu JC, 1975. Rhizobial root nodules of soybean as revealed by scanning and transmission electron microscopy. *Phytopathol.* 65: 447-454.

Uren NC, 2001 Types, amounts and posible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. En: *The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface*. Pinton R, Varanini Z, Nannipieri P (eds). New York Basel, USA.

Van Dillewijn P, Soto MJ, Villadas PJ, Toro N, 2001. Construction and enviromental release of a *Sinorhizobium meliloti* strain genetically modified to be more competitive for alfalfa nodulation. *Applied and Enviromental Microbiology*. 67:(9) 3860-3865.

Van Egeraat, 1975. The posible role of homoserine in the development of *Rhizobium leguminosarum* in the rhizosphere of pea seedlings. *Plant Soil* 42:381-386.

Van Rhijn P, Goldberg RB, Hirsch AM, 1998. *Lotus corniculatus* nodulation specificity is change by the presence of a Soybean lectin gene. *Plant Cell*. 10: 1233-1249.

Vande Broek A, Vanderleyden J, 1995. The role of bacterial motility, chemotaxis and attachment in bacteria-plant interactions. *Molecular Plant-Microbe interactions* 6:800-810.

Voet D, Voet JG, 1992. *Bioquímica*. Omega, Barcelona.

Wall LG, Favelukes G, 1991. Early recognition in the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis: root exudate factor stimulates root adsorption of homologous rhizobia. *Journal of bacteriology*. 173:(11) 3492-3499.

Whipps JM, Lynch JM, 1985. Energy losses by the plant in rhizodeposition. *Annual Proceedings of the phytochemistry society, Europe* 26:59-71.

Young JM, 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms En: Stacey G, Burris RH, Evans HJ, eds. *Biological Nitrogen Fixation*, New York, Chapman and Hall 43-86.

Young JM, 2001, Implications of alternative classifications and horizontal gen transfer for bacterial taxonomy. *International Journal of systematic and evolutionary microbiology* 51:945-953