



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

“Análisis genético funcional del plásmido simbiótico
de *Rhizobium tropici* CFN299”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

PRESENTA

AURORA GAMEZ REYES

DIRECTOR DE TESIS: DR. ISMAEL HERNÁNDEZ LUCAS

MÉXICO, D.F.

Febrero, 2008



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.

La presente tesis se realizó en el Programa de Ecología Genómica del Centro de Ciencias Genómicas, y en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Ismael Hernández Lucas.

Esta tesis fue realizada gracias al apoyo de los proyectos DGAPA, PAPIIT IN206802 e IN206705. Responsable Dr. Ismael Hernández Lucas.

La alumna contó con la beca CONACYT No.182511, DEGEP, UNAM y DGAPA IN206705.

El trabajo fue evaluado por el siguiente comité tutorial:

Dr. Ismael Hernández Lucas

Dr. Juan Miranda Ríos

Dr. Miguel Ángel Ramírez Romero

Agradecimientos.

Al Dr. Ismael Hernández Lucas por la oportunidad y el apoyo para realizar esta tesis bajo su tutoría.

A Augusto Ramírez Trujillo y Noe Becerra Lobato, por los consejos, las porras y todo lo que pasamos durante la desarrollo de esta tesis, sin ustedes hubiera sido muy aburrido.

A Karla Guzmán Rabadán, por el soporte técnico que me brindo durante su estancia en el laboratorio.

Al Dr. Jesús Caballero Mellado, por otorgarme un espacio en su laboratorio para llevar acabo parte del trabajo experimental de esta tesis, así como la discusión y el análisis de los resultados.

A Antonio Rogel, por todo el apoyo que me brindo en el laboratorio.

A José Luís Fernández Vázquez por la coordinación en la construcción del banco de mutantes.

Al Dr. Miguel Ángel Ramírez Romero, por la ayuda en la realización de los ensayos de actividad específica del gen reportero, así como la discusión y el análisis de los resultados.

Al Dr. Alejandro García de los Santos, por todos los consejos y el espacio físico para la realización de los experimentos con plantas.

Al Dr. Edmundo Calva Mercado por el apoyo para realizar los experimentos de la última fase de esta tesis.

A la Dra. Esperanza Martínez Romero, responsable del laboratorio del Programa de Ecología Genómica, del Centro de Ciencias Genómicas.

A la Dra. Valerie Oke por proporcionarnos el plásmido pVO155.

A los miembros de la unidad de síntesis y secuenciación macromolecular del Instituto de Biotecnología UNAM. Dr. Ruben Paul Gaytan Colin, Quím. Jorge Arturo Yanez Ponce de Leon, Q.I. Santiago Becerra Ramírez y M.C. Eugenio Lopez Bustos.

Dedicatoria.

A mis Padres Beatriz y Eduardo, por todo lo que me han enseñado, consejos y sobre todo el apoyo incondicional que me han dado.

A mi hermano Fernando por su ternura, apoyo y enseñarme que todo es cuestión de actitud.

A Jerson por ser parte importante de mi vida y estar ahí cuando más lo he necesitado.

A mi familia en La Paz, DF y Edo. Méx. porque siempre han estado al pendiente de mí.

A Mónica, Esther, Francisco, Erika, Gerardo y Arantxa gracias por acompañarme en este proyecto.

A los que se me adelantaron: Prof. José Luís Reyes Martínez, Sra. Salud Valdés Cano; Sr. Javier Gamez Valdés; Biol. José Luís Jiménez; Lic. Mauricio Manzani.

A Noe y Augusto, por ser mis amigos, mi apoyo y mi club de laboratorito, sin ustedes este trabajo y mi estancia no hubiera sido tan divertida y llevadera.

A Maritza y Oswaldo por apoyarme, se que siempre contare con ustedes.

A Karla, James, Sara y Fernando por las estrategias, conversaciones y apoyo.

A Tere por su amistad y enseñarme que la biología son muchas cosas.

A Carolina, por sus palabras y amistad.

A los Doctores Armando Luís, Rodolfo López, Miguel Lara, Ricardo Oropeza y Alejandro García, sin su apoyo este trabajo no hubiera concluido.

A Guadalupe Andraca, Miriam Bojorge por su amistad incondicional.

A Carlos Rosas, Sergio Zavala, Maricarmen Betanzo, Iván Martínez y Tonatiuh Vargas compañeros de aventuras y desventuras.

A Luary, Lulu, Lupita, Tecilli, Janette, Lucia, Aline, Keilor, Miguel Angel, Tomas, Carmen gracias por todo.

A Eduardo, Gerardo, Sonia, Erwin, Carlitos, Alejandra, Odette, Marina, Gustavo, Lizette, Aura, Santiago, y todos los que participaron de alguna forma en esta aventura.

Se que fue largo el camino pero ya llegamos, gracias.

ÍNDICE

Introducción.	1
Importancia del Nitrógeno.	1
Interacción Rhizobium-Leguminosa.	2
Importancia agrícola de la fijación biológica de nitrógeno.	6
Rhizobium tropici.	7
Justificación.	8
Objetivo general.	10
Objetivos particulares.	10
Materiales y métodos.	11
Cepas y plásmidos.	11
Condiciones de crecimiento.	12
Construcción de una librería de mutantes y fusiones transcripcionales del pSym de Rhizobium tropici CFN299.	12
Nebulización de ADN.	12
Reparación de los extremos 5' y 3' de ADN.	14
Defosforilación del plásmido pVO155.	14
Ligación de ADN.	15
Limpieza de ADN.	15
Electroporación.	15
Perfil de plásmidos tipo Eckhardt.	16
Diseño de oligonucleótidos.	17
Determinación del tamaño de los fragmentos del pSym clonados en el vector pVO155.	17
Secuenciación de ADN.	18
Bioinformática.	18
Cruzas triparentales.	19
Ensayo tipo Southern blot.	19
Curvas de crecimiento.	20
Determinación de la actividad específica de la enzima β -glucoronidasa en Rhizobium, vida libre.	21
Ensayos experimentales con plantas leguminosas.	22
Germinación de semillas Leucaena leucocephala y Phaseolus vulgaris, Negro jamapa.	22
Obtención de exudados de raíz.	23
Ensayos de nodulación.	24
Aislamiento bacteriano de nódulo.	24
Prueba de reducción de acetileno.	24
Detección de la actividad de la enzima β -glucoronidasa en nódulos de 10, 15 y 21 dpi.	25
Resultados.	26
Generación de un banco de mutantes y fusiones transcripcionales del plásmido simbiótico de Rhizobium tropici CFN299.	26
Caracterización de clonas recombinantes Rhizobium tropici CFN299 en vida libre.	31
Actividad específica de la enzima β -glucoronidasa.	33
Expresión genética de Rhizobium tropici en presencia de exudados Leucaena leucocephala y Phaseolus vulgaris, Negro jamapa.	34
Cinéticas de nodulación.	35

Tabla II. A. Genes del pSym de <i>R. tropici</i> expresados en vida libre.	41
Tabla II. B. Genes del pSym de <i>R. tropici</i> expresados en simbiosis.	46
Discusión y conclusiones.	54
Bibliografía.	58

Introducción.

Importancia del Nitrógeno.

El nitrógeno es uno de los principales elementos en la atmósfera (80% por volumen de aire seco), esta concentración es el resultado del balance entre la fijación del nitrógeno atmosférico por acción bacteriana, eléctrica (relámpagos), química (industrial) y su liberación a través de la descomposición de materias orgánicas por bacterias o por combustión. Es un gas químicamente inerte que en estado combinado se presenta en diversas formas y constituyente de todas las proteínas (vegetales y animales) y ácidos nucleicos.

A pesar de su abundancia, los seres vivos con capacidad de fijar nitrógeno (de manera general este proceso consiste en la captación de nitrógeno atmosférico para convertirlo a amonio) es exclusiva de los procariontes. Este proceso se denomina fijación biológica de nitrógeno (Raymond *et al.*, 2004) y la responsabilidad de que esto se lleve a cabo radica en el complejo enzimático llamado nitrogenasa, que es el encargado de transformar el dinitrógeno (N_2) a amonio (NH_3), siendo ésta la única forma en que puede ser asimilado por los eucariontes.

La nitrogenasa es un complejo enzimático que se inactiva en presencia de oxígeno, por lo que a lo largo de la evolución, los procariontes encontraron alternativas para poder crear las condiciones de bajo oxígeno que se requieren para poder reducir el nitrógeno y así aprovecharlo. Algunas bacterias como *Klebsiella*, *Anabaena*, *Azotobacter* y *Azospirillum* lo fijan en vida libre en condiciones de anaerobiosis ó microaerobiosis para satisfacer sus requerimientos nitrogenados (Brewin *et al.*, 1991 y Mylona *et al.*, 1995). En cambio, organismos como las plantas y algas lo obtienen por un proceso llamado Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN) y se obtiene gracias a la asociación que establecen algunos organismos como las bacterias del género *Rhizobium* con plantas leguminosas.

Las bacterias designadas Rhizobia o Rizobios comprenden 12 géneros (*Azorhizobium*, *Methylobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Devosia*, *Herbaspirillum*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*)

con cerca de 50 especies (Broughton et al., 2000; Perret et al., 2000; <http://www.rhizobia.co.nz> al 26/08/07).

Los Rizobios o Rhizobias forman nódulos en muchas leguminosas, *Lupinus subcarnosus*, *Pisum sativum*, *Medicago sativa*, *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, *Vigna unguiculata* y excepcionalmente con una no leguminosa, *Parasponia* (Lewin et al., 1987; Hernández-Lucas et al., 1995, Michelis et al., 1998; Pueppke y Brouhton, 1999; Relic et al., 1993). De manera general la simbiosis se da gracias a que la planta como la bacteria siguen un proceso, de tal forma que si cualquiera de ellos incumple alguna de las condiciones establecidas, la formación del nódulo aborta. Ésto se puede resumir en: Intercambio de señales de naturaleza química entre la planta y el microorganismo. Activación del ciclo celular en células del córtex e iniciación del nuevo órgano en la planta. Infección por parte de la bacteria, formación del canal de infección e invasión de los tejidos recién formados. Diferenciación de la bacteria a bacteroide. Fijación de nitrógeno y senescencia del nódulo.

Interacción *Rhizobium*-Leguminosa.

Las plantas se comunican con el medio a partir de compuestos aromáticos, llamados flavonoides, las bacterias de la rizosfera detectan la presencia de estos compuestos y por quimiotaxis se movilizan hacia la planta. Los flavonoides son moléculas constituidas por 15 carbonos con dos anillos aromáticos y un anillo heterocíclico. Dependiendo del nivel de oxidación del anillo heterocíclico, se clasifican en chalconas, flavononas, flavonas, isoflavonas y antocianinas. En la actualidad se conocen más de 5000 compuestos identificados en la naturaleza, como por ejemplo: luteolina, apigenina, kamferol, naringenina, genisteína etc. (Yeh et al., 2002; Schultze et al., 1998; Bladergroen y Spaink 1998; Ibraim., 2001).

Cada especie de *Rhizobium* responde de manera diferente a un determinado flavonoide, dependiendo del tipo de flavonoide será la especie de rhizobia que sea atraída por la planta (Recourt et al., 1992; Schmidt et al., 1994).

Los flavonoides son detectados por un grupo de proteínas denominadas factores de transcripción de la familia LysR (Schell., 1993) conocidos como NodD, cuyo número y

regulación va a depender de la especie de *Rhizobia*, por ejemplo en *Sinorhizobium meliloti* hay tres copias de NodD, siendo dos de ellas, NodD1 y NodD2, activadas por flavonoides mientras que NodD3 es activada por SyrM (**S**ymbiotic **R**egulator) que además de regular NodD3 induce la síntesis de exopolisacárido (EPS) independientemente de la presencia de flavonoides (Swanson *et al.*, 1993). NodD interactúa con regiones de ADN de 49 pb conocidas como cajas nod (*nod* boxes), que se encuentran en las regiones promotoras de muchos genes implicados en la nodulación (Schultze y Kondorosi., 1998).

Entre los genes activados por NodD se encuentran los “genes *nod*”, que están codificados en plásmidos simbióticos en los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (Downie, 1998 y Sessitsch *et al.*, 2002) o en cromosoma, en el caso de *Bradyrhizobium* (Gottfert *et al.*, 2002 y Minamisawa *et al.*, 1998). Sin embargo, hay cepas de *Mesorhizobium* donde los genes simbióticos están codificados en plásmidos (Guo *et al.*, 1999) o en el cromosoma, dentro de una isla simbiótica (Sullivan y Ronson, 1998; Sullivan *et al.*, 2002, Nuswantara *et al.*, 1999).

Los genes *nod* al ser activados sintetizan moléculas de lipoquitooligosacáridos (cadenas de N-acetil-D-glucosamina) también llamados de manera general “factor Nod”, estas moléculas tienen un papel determinante en esta interacción simbiótica (Schultze *et al.*, 1998; Folch-Mallol *et al.*, 1998; Riely *et al.*, 2004; Saad *et al.*, 2005).

El factor Nod se compone de una estructura básica de N-acetil-D-glucosamina con modificaciones o decoraciones en los extremos de la molécula. Este factor es sintetizado por el producto de los genes *nodABC*, donde los productos de estos genes son la proteína NodC que es una quitooligosacárido sintasa que produce una molécula de N-acetil glucosamina a partir de UDP-N-acetil-D-glucosamina (UDP-GlcNac). La proteína NodB desacetila el residuo de la glucosamina dejando un grupo amino libre el cual será usado por NodA para integrarle un grupo acilo, dándole especificidad al factor Nod.

Las variantes en el esqueleto de N-acetil-D-glucosamina tales como su longitud o modificaciones químicas como el tipo de lípido, el sulfato, el carbamilo, la fucosa dependen de la especie de *Rhizobium* que a su vez le dan especificidad en la interacción con el hospedero (Broughton *et al.*, 1999). La planta hospedera tiene preferencia por un

determinado tipo de decoración en el factor, por ejemplo, a pesar de que la planta de frijol es capaz de reconocer un amplio rango de factores Nod (Martínez-Romero *et al.*, 1991), existe una jerarquía donde la acetil fucosa en el extremo reductor es preferida sobre otras modificaciones (Corvera *et al.*, 1999).

Yang (1994) y su grupo de investigación demostraron que los factores Nod inducen divisiones celulares en el cortex de la raíz y que en algunos casos se convierten en primordios o meristemos del nódulo; por su parte los grupos de Ehrhardt (1992) y Felle (1999), demostraron que los factores Nod son capaces de inducir la depolarización del potencial de membrana de los pelos radiculares, la deformación del pelo radicular implica una reorganización del citoesqueleto, donde posteriormente se dará la formación del tubo de infección, conducto por el cual las bacterias llegan al interior de la planta. Una vez dentro del cortex de la raíz, las bacterias se diferencian a bacteroides, los cuales están rodeados de una membrana peribacteroidal de naturaleza vegetal, esta forma celular es la responsable de realizar la fijación de nitrógeno (Schultze M y Kondorosi A 1998; Spaink 2000; Gage; 2004). En el proceso de fijación de nitrógeno una de las enzimas relevantes es la nitrogenasa, la cual es codificada por los genes *nifH*, *nifD* y *nifK* presentes en los plásmidos de los Rhizobia. El gen *nifH* codifica para una proteína dimérica (dinitroreductasa, componente II) que contiene un centro 4Fe-4S (Morett y Buck; 1989; Morett *et al.*, 1991). La FeMo proteína (dinitrogenasa, componente I) esta codificada por los genes *nifD* y *nifK*.

Las dos subunidades conforman la nitrogenasa de Rhizobia, este complejo posee características similares a la presente en las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, incluyendo la sensibilidad de O₂ y su capacidad de reducir N₂ atmosférico a amonio (Dowie, 2005).

Los bacteroides dependen totalmente de la planta para obtener la energía necesaria para la fijación de nitrógeno (Labes y Finan, 1993). Los principales compuestos orgánicos transportados al interior de los bacteroides a través de la membrana peribacteroidal son los intermediarios del ciclo de Krebs, en particular los ácidos de cuatro carbonos como lo son succinato, malato y fumarato (Waters *et al.*, 1998).

A su vez, los iones amonio pasan por un transportador específico de la membrana peribacteroidal al citoplasma de la célula vegetal en donde el sistema GS-GOGAT los

incorpora en forma de aminoácidos, amidas o ureidos, también se ha propuesto que el amonio es incorporado a la planta en forma de alanina (Waters *et al.*, 1998).

El equilibrio en el intercambio de metabolitos entre la planta y el microorganismo resulta vital para la simbiosis, de tal forma que una alteración producida por alguno de los dos miembros de la asociación, llevaría a una acidificación en el interior del simbiosoma (estructura que presenta una serie de características que son indispensables para realizar la actividad fijadora de nitrógeno y que incluye a la membrana peribacteroidea, al fluido peribacteroideo y al bacteroide) que conduciría a la activación de las hidrolasas y por lo tanto a la muerte del simbiosoma y a la senescencia del nódulo.

En la actualidad se conocen muchos aspectos de los Rhizobia incluso se han secuenciado los genomas completos de *S. meliloti* (Galibert *et al.*, 2001) *S. medicae* WSM419 (Project ID: 16304 por US DOE Joint Genome Institute), *M. loti* (Kaneko *et al.*, 2000), *M. sp* BNC1 (Project ID: 10690 por DOE Joint Genome Institute), *B. japonicum* (Kaneko *et al.*, 2002); *B. sp* BTAi1 (Project ID: 16137 por US DOE Joint Genome Institute), *B. sp* ORS278 (Project ID: 19575 de Genoscope); *Rhizobium etli* (González *et al.*, 2006), *A. caulinodans* ORS 571 (Project ID: 19267 por University of Tokio), *R. leguminosarum* *bv. viciae* 3841 (Project ID: 344) por Sanger Institute (todas las secuencias están publicadas en la pagina web de el Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI, National Center for Biotechnology Information por sus siglas en inglés (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), en la seccion de genomas). También se cuenta con la secuencia del plásmido simbiótico de la cepa NGR234 (Perret *et al.*, 1999).

La secuencia nucleotídica de estos genomas ha revelado características interesantes en cromosoma como en plásmidos, entre las que destacan la presencia de múltiples elementos de inserción; tRNA para la síntesis de arginina, así como proteínas MinCDE (Finan *et al.*, 2001) involucradas en el proceso de división celular. La presencia de estos genes sugiere que algunos plásmidos de *Rhizobium* son esenciales para la sobrevivencia de la bacteria.

Importancia agrícola de la fijación biológica de nitrógeno.

En los últimos años la interacción de bacterias fijadoras de nitrógeno y sus hospederos juega una parte importante para el desarrollo sustentable de la agricultura, ya que actualmente se requieren métodos de fertilización en los campos productores que no contaminen o empobrezcan los suelos, por lo que una alternativa es el uso de biofertilizantes, estos fertilizantes se basan en la utilización de bacterias u hongos que tienen la capacidad de establecer una relación simbiótica con las plantas de interés agrícola. Tal es el caso de frijol y las bacterias del genero *Rhizobium*.

En la actualidad en México se ha desarrollado una serie de biofertilizantes basados en esta interacción, un ejemplo de esto es la utilización de las cepas HP310, HP789, HP652 de *R. etli* que promueve la fijación de nitrógeno a niveles muy altos, casi del 200% con respecto a la cepa silvestre (Peralta *et al.*, 2004). Otro ejemplo en la utilización de biofertilizantes, como la aplicación de *Rhizobium tropici* PRF81 en suelos Brasileños (Hungria *et al.*, 2000; Mostasso *et al.*, 2002), esta cepa no tiene ninguna modificación genética, sin embargo es capaz de mejorar la productividad agrícola en suelos cuyo pH sea <5.0, presenten toxicidad por aluminio, bajo contenido de fósforo, insuficiente agua y altas temperaturas ambientales. Demostrando así que existe aplicación práctica en el uso de estos microorganismos, ya que como biofertilizantes de cultivos logran aumentar la producción y la calidad de la semilla (Hungria *et al.*, 2000; Mostasso *et al.*, 2002).

Rhizobium tropici.

Rhizobium tropici (tro'pi. ci. Gr. n. *tropikos*, trópicos; N. L. gen. n. *tropici* de los trópicos), es una bacteria edáfica que establece asociaciones simbióticas con un amplio rango de hospederos (22 especies) entre ellas se encuentran *Gliridicidia sepium*, *Leucaena leucocephala*, *Lotus corniculatus*, *Macroptilum atropurpureum* y *Phaseolus vulgaris* (Hernández-Lucas *et al.*, 1995; Acosta-Duran C *et al.*, 2002). Estas bacterias son aeróbicas, Gram-negativas, no forman esporas, tienen forma de barras flageladas que van de 0.5 a 0.7 µm por 1.5 a 2 µm. Las colonias son circulares, convexas, semitraslúcidas, usualmente crecen de 2 a 4 mm de diámetro por un periodo de incubación de 2-3 días en medio de cultivo PY. Crecen en YM y PY. El pH óptimo para su crecimiento está dentro de 5-7 y crecen a 30° C (Martínez-Romero *et al.*, 1991).

Poseen una gran variedad metabólica para utilizar diferentes fuentes de carbono en vida libre como en simbiosis (Martínez-Romero *et al.*, 1991). Existen dos cepas tipo de *R. tropici* denominadas CFN299 y CIAT899. La cepa CIAT899 es resistente a metales pesados como el níquel, plomo, cobre, cromo y mercurio; además de ser resistente a muchos antibióticos como: cloranfenicol, carbenicilina, espectinomicina y rifampicina (Martínez-Romero *et al.*, 1991). En cambio la cepa CFN299 es sensible a metales pesados y antibióticos, además de que requiere calcio en medio PY y no crece en medio LB (Geniaux E *et al.*, 1995).

La estructura genómica de *Rhizobium tropici* CFN299 está constituida por un cromosoma aproximado de 3 Mb y cuatro plásmidos: el megaplásmido de 1500 kb, contiene los genes *exoF* que participan en la formación de exopolisacáridos, el plásmido simbiótico (pSym) de 600 kb posee los genes para el reconocimiento de la planta y la fijación de nitrógeno (genes *nif*, *fix* y *nod*) (Geniaux *et al.*, 1995). El plásmido b (pb) de 240 kb que participa en la competitividad de la bacteria (Martínez-Romero *et al.*, 1990) y el plásmido a (pa) de 180 kb, que contiene genes implicados en el transporte de compuestos exudados por la raíz de frijol (Rosenblueth *et al.*, 1998).

Resumen.

“Análisis genético funcional del plásmido simbiótico de *Rhizobium tropici* CFN299”

Rhizobium tropici bacteria edáfica que establece asociaciones simbióticas con un amplio rango de leguminosas, posee una gran versatilidad metabólica para utilizar diferentes fuentes de carbono tanto en vida libre como en simbiosis. La estructura genómica de *Rhizobium tropici* CFN299 está constituida por un cromosoma y cuatro plásmidos; uno de estos replicones, el denominado plásmido simbiótico (pSym) tiene un papel determinante en la vida libre y simbiótica de esta bacteria fijadora de nitrógeno. En este trabajo se construyó un banco de mutantes y fusiones transcripcionales del plásmido simbiótico. Mediante el uso de un gen reportero, se identificaron nuevos elementos genéticos del pSym expresados en diferentes estadios del proceso simbiótico, demostrando que la simbiosis constituye un mosaico de expresiones genéticas a diferentes niveles. En este trabajo también se reportan diversas mutantes en el pSym incapaces de fijar nitrógeno. El presente estudio constituye el primer esfuerzo por analizar en su totalidad un elemento extracromosomal relevante en *Rhizobium*.

Justificación.

En estudios previos se ha analizado el papel de algunos genes del pSym de *R. tropici* CFN299, entre ellos genes que codifican para enzimas de rutas metabólicas tales como la citrato sintasa (Hernández-Lucas *et al.*, 1995) y la isocitrato liasa, enzima que participa en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y en el ciclo de glioxilato. Mutantes en el gen de citrato sintasa afectan el proceso simbiótico, sin embargo, mutantes en los genes del ciclo del glioxilato no afectan el desarrollo de la relación entre *Rhizobium* y la leguminosa (Rámirez-Trujillo *et al.*, 2007).

Se ha establecido que el pSym de *R. tropici* CFN299 al ser transferido a otras bacterias como *Agrobacterium tumefaciens* (que no cuenta con el plásmido Ti que le confiere la patogenicidad) adquiere la habilidad de nodular y fijar nitrógeno, sin embargo, la Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN) es muy baja, 10 al 25 % por planta comparado con la cepa donadora, *R. tropici* CFN299 (Martínez-Romero *et al.*, 1987). Otra bacteria a la cual se le transfirió este plásmido simbiótico es a *Ensifer adherens* (actualmente conocido como *Sinorhizobium adherens*) la cual adquirió las mismas características de simbionte mutualista con una fijación biológica de nitrógeno baja con respecto a *R. tropici* (Rogel *et al.*, 2001). Si el pSym es transferido a patógenos como *Brucella melitensis* esta bacteria es capaz de inducir esporádicamente pseudonódulos incapaces de fijar nitrógeno. Otra de las características del pSym es que no se ha podido curar, de las 600 kb que lo constituyen solo se ha podido deletar 300 kb las cuales comprende los genes para nodular y fijar nitrógeno. Mavingui y colaboradores (1997), señala que 30 kb del pSym de *R. tropici* CFN299 intervienen no solo en la capacidad de nodular *M. atropurpureum*, si no que le otorga a la bacteria una mayor competitividad en comparación a la cepa silvestre; cabe señalar que el aumento de número de copias de este fragmento es suficiente para hacer mas eficiente a la bacteria en nodulación. Por todo lo anterior, el plásmido simbiótico de *R. tropici* CFN299 no solo tiene un papel determinante en la relación simbiótica con las leguminosas, si no que tiene características únicas que otros plásmidos simbióticos no tienen.

El interés de este trabajo es identificar información genética novedosa involucrada en vida libre y simbiosis codificada en el pSym. Para abordar esta pregunta se

construyeron mutantes y fusiones transcripcionales al azar en el pSym. Las mutantes y fusiones transcripcionales obtenidas fueron evaluadas en simbiosis y vida libre.

Objetivo general.

Identificar nuevos elementos genéticos del pSym de *R. tropici* CFN299 involucrados en la vida simbiótica y saprofítica de esta bacteria fijadora de nitrógeno.

Objetivos particulares.

- Generar un banco de mutantes y fusiones transcripcionales del plásmido simbiótico de *R. tropici* CFN299.
- Análisis de mutantes y fusiones transcripcionales del pSym en vida libre y simbiosis.
- Identificación de los genes codificados en el pSym involucrados en vida libre y en el proceso simbiótico *R. tropici-Phaseolus vulgaris*.

Materiales y métodos.**Cepas y plásmidos.**

Las cepas y plásmidos utilizados en este trabajo se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este estudio.

Cepa	Características relevantes	Referencia
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	Φ 80d/lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (r $_{k}^{-}$ m $_{k}^{-}$) ⁺ phoA supE44 λ -thi-1 gyrA96 relA1 Nal ^r .	GibcoBRL Tm
HB101	SupE44hsdS20(r $_{b}^{-}$ m $_{b}^{-}$) recA13ara-14proA2lacY1galK2rpsL20xyl-5mtl-1St ^r .	GibcoBRL Tm
TOP10B	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG.	Invitrogene Tm
DH5 α (trfA)	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80d/lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (ara, leu)7697 galU galK λ^{-} rpsL nupG dhfr trfA278D Ap ^r .	Hernández-Lucas <i>et al.</i> , 2002
<i>Rhizobium tropici</i>		
CFN299	Nal ^r .	Martínez-Romero <i>et al.</i> , 1991
CFN299-10	Derivado de CFN299 Δ 200 Kb del pSym sin el pB. Nal ^r .	Martínez-Romero y Rosenblueth, 1990
Plásmidos		
pVO155	Replicón derivado de pUC19 con un terminador trpA Δ lac uidA gus aph. 382 pb del replicón pBSL237. Nm ^r Km ^r Ap ^r .	Oke, V., y S. R. Long. 1999
pRK2013	Replicón ColE1 con región de transferencia RK2. Nm ^r Km ^r .	Figurski <i>et al.</i> , 1979
pBACA317	550 Kb del pSym <i>Rhizobium tropici</i> CFN299 clonado en pBAC456 Cm ^r Sp ^r .	Hernández-Lucas <i>et al.</i> , 2002
pBACA303	390 Kb del pSym <i>R. tropici</i> CFN299 clonado en pBAC456 Cm ^r Sp ^r St ^r .	Hernández-Lucas <i>et al.</i> , 2002

Condiciones de crecimiento.

Las cepas de *Escherichia coli* se cultivaron en medio LB, las cepas de *Rhizobium tropici* CFN299 fueron crecidas en PY. Los antibióticos usados en este trabajo se muestran en la Tabla 2. Las cepas de *Escherichia coli* y *Rhizobium tropici* CFN299 fueron crecidas a 30°C.

Tabla 2. Antibióticos utilizados en este trabajo.

Nombre	Solvente	Solución concentrada (mg/ml)	Concentración para <i>E. coli</i> (µg/ml)	Concentración para <i>R. tropici</i> CFN299 (µg/ml)
Ácido Nalidixico (Nal)	NaOH 0.1 M	30	20	20
Neomicina (Nm)	H ₂ O	100	30	30
Cloranfenicol (Cm)	Etanol 95%	10	10	10

Construcción de una librería de mutantes y fusiones transcripcionales del pSym de *Rhizobium tropici* CFN299.

Los plásmidos de alto peso molecular (pBACA317 y pBACA303) fueron purificados por columnas utilizando el kit de QIAGEN Large-Construct kit (Num. Cat. 12462). Los plásmidos de bajo peso molecular (pVO155) fueron purificados según el protocolo de las columnas High Pure Plasmid Isolation Kit (Num. Cat. 1 754 785) de Roche. El ADN genómico bacteriano fue obtenido según el protocolo de GenomicPrep™ Cells and Tissue ADN Isolation Kit (Num Cat 27-5237-01) de Amersham Biosciences.

Nebulización de ADN.

En tubos eppendorfs se colocaron por separado 10 µg de ADN de los plásmidos pBACA317 y pBACA303. Se les agregó 852 µl TE 10:1, 100 µl de glicerol al 10% estéril para un volumen final de 1 ml, esta mezcla se transfirió al nebulizador (Num Cat. 9973 Omron).

Al tanque de nitrógeno gaseoso se le reguló la presión de salida a 19 psi. Con la presión constante, se conectó el nebulizador a la manguera del tanque durante 45 seg. Transcurrido

el tiempo, la muestra se concentró por centrifugación a 1000 rpm durante 15 segundos y se colocó en un tubo eppendorf, agregando un volumen de acetato de amonio 2.5 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto dejándolo dos días a -70°C .

Transcurrido el tiempo se centrifugó 30 min a 12,000 rpm, se tiró el sobrenadante y el paquete de ADN se lavó con 200 μl de etanol al 70%, se centrifugó 10 min a 12,000 rpm, repitiendo este procedimiento dos veces. Por último, se dejó secar durante 10 min a temperatura ambiente. Resuspendiendo en 25 μl de agua HPLC estéril. Estos 25 μl se visualizaron en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (No. Cat A3038 Sigma-Aldrich) al 0.8% TAE 1X, purificando la banda de 850-3000 pb según el protocolo de QIAquick Gel Extraction kit resuspendiendo en 25 μl (No. Cat. 28704 de QIAGEN).

Para cuantificar la cantidad de ADN se colocaron 995 μl de agua estéril en un tubo Eppendorf y 5 μl del ADN, se mezcla en el vortex. La muestra se coloca en la celda de cuarzo (No. Cat. C8425 Sigma) y se mide a 260 nm de absorbancia en el espectrofotómetro. Tomando en cuenta la absorbancia se hace una relación con la siguiente fórmula para saber la concentración de la muestra.

$$1 \text{ Densidad óptica (DO)} = 50 \mu\text{g de ADN}$$

$$(X \text{ DO}) (50 \mu\text{g}) / 5 \mu\text{l} = X \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

Reparación de los extremos 5' y 3' de ADN.

El ADN nebulizado y purificado del gel, junto con el vector pVO155 linearizado con enzimas de restricción, se les realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) modificada para reparar sus extremos 5' y 3'. Tabla 3.

Tabla 3. Reparación de los extremos 5' y 3' por PCR.

Reacción de PCR	
25 µl ADN Nebulizado (0.230µg/µl)	25 µl Vector linearizado (0.179µg/µl)
5 µl Amortiguador Polimerasa T ₄	5 µl Amortiguador Polimerasa T ₄
1 µl Polimerasa T ₄ (5 Uni/µl)	1 µl Polimerasa T ₄ (5 Uni/µl)
1 µl Polimerasa Klenow (5 Uni/µl)	1 µl Polimerasa Klenow (5 Uni/µl)
2.5 µl Nucleótidos (dNTPs) 10 mM	2.5 µl Nucleótidos (dNTPs) 10 mM
<u>15.5 µl</u> Agua	<u>15.5 µl</u> Agua
50 µl Total	50 µl Total

Programa de PCR	
30 min	12 °C
30 min	25 °C
10 min	70°C

Defosforilación del plásmido pVO155.

Al tubo que contenía los 50 µl del plásmido pVO155 reparado, se le agregaron 0.5 µL de fosfatasa alcalina (Invitrogen), dejando incubar media hora a 37°C. Transcurrido el tiempo la fosfatasa alcalina se inactivó a 55°C 30 min, posteriormente se agregaron 5.6 µl de EGTA 250 mM pH 8.0 dejándolo en reposo durante 20 min a 65°C y a -20°C toda la noche, después se limpió y resuspendió en 10 µl de agua grado HPLC.

Ligación de ADN.

El ADN nebulizado y reparado junto con el vector reparado y defosforilado fueron ligados entre si según la Tabla 4.

Tabla 4. Reacciones de ligación.

DNA nebulizado	1 μ l (215 ng/ μ l)	1 μ l (215 ng/ μ l)	0 μ l
Vector pVO155 linearizado y reparado	0.5 μ l (171 ng/ μ l)	0.75 μ l (147 ng/ μ l)	1 μ l (171 ng/ μ l)
Amortiguador 10X	1.5 μ l	1.5 μ l	1.5 μ l
Enzima Ligasa (10 unidades/ μ l)	0.5 μ l	0.5 μ l	0.5 μ l
Agua	11.5 μ l	11.25 μ l	12.0 μ l
Total	15 μ l	15 μ l	15 μ l
Los reactivos utilizados son de Invitrogen			

Las ligaciones se incuban a 16°C, 16 hrs en la máquina de PCR. Transcurrido el tiempo las reacciones fueron limpiadas y posteriormente concentradas por evaporación a 10 μ l finales.

Limpieza de ADN.

Los ADN's provenientes de una digestión, nebulización y ligación a limpiar se llevarón a 500 μ l de volumen final con Butanol grado HPLC en un tubo Eppendorf, mezclando en un vortex, hasta que la mezcla se tornara blancuzca. Centrifugando 10 min a 13,200 rpm a temperatura ambiente. A los tubos se les retiró el sobrenadante con una micropipeta teniendo cuidado de no llevarse la pastilla de ADN. Posteriormente, el paquete de ADN fue lavado con 1 ml de etanol 70%, repitiendo la centrifugación y lavado dos veces. Por último, los tubos se decantan y son secados en un SAVANT durante 5 min, resuspendiendo la pastilla en 10-20 μ l de agua HPLC estéril.

Electroporación.

En una celda de electroporación con 1 μ l de cada ligación se le agregó 100 μ l de células competentes TOP10B y a los duplicados se les agregó 100 μ l de HB101. Cada una de las celdas fue colocada en el electroporador BioRad GenePulser[®] II con 25 μ F de capacitancia, 200 Ω de resistencia y 2.5 kV de voltaje. Después de electroporar a cada una de las celdas de electroporación se les agregó 1 ml de medio líquido SOC (2% de Triptona, 0.5% de

Extracto de levadura, Cloruro de Sodio 10 mM, Cloruro de potasio 2.5 mM, Cloruro de magnesio 10 mM, Sulfato de magnesio 10 mM y Glucosa 20 mM). Se colocó el contenido de la celda en un tubo de ensayo estéril dejándolas 5 min a 37°C en agitación. Transcurrido el tiempo, los tubos se transfirieron a hielo. Plateando 100 µl de cada transformación en cajas de petri LB Nm30 esto se hizo por triplicado, incubando a 37°C 18 hrs.

Perfil de plásmidos tipo Eckhardt.

Las recombinantes obtenidas se analizaron (1000 clonas) por medio de la técnica de Eckhardt, para determinar si contenían fragmentos clonados. Cada una de las colonias obtenidas fue tomada con un palillo de madera, para ser sembrada en una caja de Petri con LB Nm30, lo que queda en el palillo fue colocado en un tubo Eppendorf con 0.5 ml de Sarcosyl (N-laurylsarcosine) 0.3%, TBE 1X frío (10.8 gr Trizma base, 0.93 gr EDTA., 5.5 gr Acido bórico, aforado a un litro con agua bidestilada), posteriormente se centrifugaron a 13,200 rpm durante 1 min. Los tubos se decantaron y al paquete celular se les agregaron 20 µl de la solución E1 (10% de sacarosa, grumitos de lisozima y 100 µl de RNAsa 8 mg/ml en TBE 1X) mezclando el contenido tres veces con la micropipeta. La muestra se cargó en un gel de agarosa-SDS (10%), TBE 1X (0.85%) previamente preparado y se dejó correr durante media hora a 5 Volts, transcurrido el tiempo el voltaje se aumentó a 80 Volts dejándolo tres horas más. Para visualizar los plásmidos, el gel se lavó con agua bidestilada y posteriormente se tiñó con bromuro de etidio en solución durante 10 min. El gel fue desteñido con agua durante media hora. Una vez desteñido se le tomó la foto en el Eagle light IBM. Las colonias positivas fueron purificadas en cajas de LB Nm30 tres veces, posteriormente, se hizo un cultivo de 18 hrs en 3 ml LB líquido con el antibiótico respectivo, de ese cultivo se tomaron 600 µl y se pusieron en un crióvial (Amersham) agregándole 600 µl de 14% DMSO-LB, para su almacenamiento a -70°C.

Diseño de oligonucleótidos.

Se utilizo el programa OLIGO 4.06 de Macintosh (tomando como base la secuencia del pVO155) Tabla 5; los oligonucleótidos diseñados son complementarios a la secuencia que flanquea el sitio múltiple de clonación del plásmido pVO155, con un alto contenido de G-C y cuya Tm (temperatura óptima de hibridación de los oligonucleótidos con el DNA blanco) es mayor a 65°C.

Tabla 5. Oligonucleotidos diseñados para secuenciación y amplificación del fragmento clonado en el plásmido pVO155.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Tm	Uso
pVO155-1	GGGTTGGGGTTTCTACAGGAC	66°C	PCR/Secuencia
pVO155-2	TCCCCAGCCCGCCTAATGAGC	70°C	Secuencia
pVO155-3	GATGCTCGTCAGGGGGGCGGA	66°C	PCR

Para la secuencia completa de cada fragmento de ADN clonado en el pVO155 se diseñaron oligos individuales.

Determinación del tamaño de los fragmentos del pSym clonados en el vector pVO155.

El tamaño de los fragmentos clonados fue determinado por la técnica de PCR. Los plásmidos fueron purificados y se les realizo un PCR. En un tubo Eppendorf de 0.2 ml se coloco la siguiente reacción:

Reacción de PCR	Programa de PCR
5 µl ADN Plasmídico	95 °C 2 min
5 µl Amortiguador PCR 10X*	95 °C 2 min
3 µl MgCl 50 mM*	55 °C 2 min
1 µl dNTPs 10 mM**	72 °C 2 min
1 µl Oligo pVO155-1 (10 pmol/µl)	72 °C 2 min
1 µl Oligo pVO155-3 (10 pmol/µl)	4 °C α
0.5 µl Taq Polimerasa*	} 34Ciclos
33.5 µl Agua	
<u>50 µl Total</u>	

* New England Biolabs

** Invitrogen

Transcurrido el tiempo de reacción, las muestras se visualizaron en un gel de agarosa 1% TAE 1X teñido con bromuro de etidio.

Secuenciación de ADN.

Los plásmidos de las clonas de *E. coli* fueron purificados (vide supra) y su integridad se analizó en un gel TAE 1X agarosa 0.8%. Posteriormente, en un volumen final de 16 µl, se colocaron 100 ng/µl de ADN y 10 pmol/µl de los oligonucleótidos pVO155-1 ó pVO155-2. La secuenciación se llevó a cabo por el sistema automatizado Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing, en la unidad de Secuencia del Instituto de Biotecnología, UNAM.

Bioinformática.

La identificación de los ORFs clonados en el vector pVO155 se llevó acabo en el programa BLASTX (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Cruzas triparéntales.

Para obtener una librería de mutantes y fusiones transcripcionales, mediante recombinación sencilla se realizó una cruce triparental entre las *E. coli* preseleccionadas que contienen regiones del pSym (cepa donadora), *Rhizobium tropici* CFN299 (cepa receptora), y una *E. coli* que cuenta con el plásmido ayudador pRK2013.

Previo a la transferencia, las cepas se crecen en 5 ml de medio de cultivo líquidos toda la noche a 30 °C. En PYCa cepa receptora, en LBNm30 cepa donadora y ayudadora. Transcurrido el tiempo se tomo 1.5 ml del cultivo de la cepa receptora, 0.75 ml de los cultivos de la cepa donadora y ayudadora. Se centrifugaron 1 min. a 14,000 rpm, retirando el sobrenadante, el paquete celular de cada tubo se resuspende en 0.15 ml de NaCl 0.85%. De estos tubos se tomaron 50 µl de la cepa donadora, 50 µ de la cepa ayudadora, 100 µl de la cepa receptora y se colocaron en un tubo eppendorf mezclándolo lentamente. Toda la mezcla en forma de gota, se colocó en una caja con medio PYCa sólido. Como control en una caja de PYCa dividida en tres, se colocaron 50 µl de la cepa donadora, 50 µl de la cepa ayudadora y 50 µl de la receptora. Todas las cajas se incubaron 24 hrs a 30°C.

Transcurrido el tiempo, se tomo toda la gota con un aplicador de madera y se coloco en un tubo eppendorf al cual se le agregan 1 ml de NaCl 0.85% para resuspender las bacterias. De esta mezcla se platan diluciones de 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} por triplicado en cajas de PYCa NaI20 Nm30. Como controles se platea también una caja de LB sin antibióticos.

Ensayo tipo Southern blot.

El ADN genómico de las clonas de interés de *R. tropici* CFN299 fue purificado y digerido con *Hind* III (No. Cat. R0104S New England BioLabs). Las digestiones se corrieron en un gel de agarosa 0.85% TAE 1X, y se tomó una fotografía. El gel se transfirió a una membrana de NylonTM. La membrana totalmente seca, se coloco en el Stratalinker durante 1 min para que el ADN termine de adherirse a la membrana de NylonTM. La sonda se marcó

según el protocolo del sistema Rediprime™ II (Amersham Biosciences No. Cat. RPN1633).y el Southern blot se llevó a cabo en condiciones de alta severidad.

Curvas de crecimiento.

En tubos de 3 ml de medio PYCaNm30 fueron inoculadas las cepas de interés, incubándose en agitación constante a 30°C, 20 hrs. Transcurrido el tiempo se midió la densidad óptica de los cultivos y se realizaron subcultivos de 50 ml a 0.02 OD, colocándolos en agitación a 30°C. Cada 3 horas se determinó la densidad óptica. Los resultados se graficaron con el programa EXCEL 3.0 de Microsoft.

El crecimiento de *R. tropici* en distintas fuentes de carbono fue determinado de la siguiente forma: se picaron colonias aisladas en medio mínimo Tully's sólido (Tabla 6) suplementado con distintas fuentes de carbono (glucosa, sacarosa, succinato, glioxilato y glicolato 10 mM).

Tabla 6. Medio mínimo Tully's suplementado con distintas fuentes de carbono.

Medio Mínimo Tully's	
Compuesto	Concentración por litro
NH ₄ SO ₄	15 Mm
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.7 mM
CaCl ₂	0.4 mM
NaCl	20 mM
Stock de Minerales	10 ml
MOPS	40 mM
K ₂ HPO ₄	2.5 mM
Stock de vitaminas	1 ml
Fuente de carbono	10 mM

Stock de Minerales	
EDTA	20 mg/l
FeSO ₄ ·7H ₂ O	12 mg/l
H ₃ BO ₃	5 mg/l
MnSO ₄ ·H ₂ O	1.6 mg/l
Na ₂ MoO ₄ ·H ₂ O	0.8 mg/l
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.24 mg/l
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.16 mg/l
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.1 mg/l
KI	1 mg/l

Stock de Vitaminas	
Biotina	10 mg
Ácido nicotínico	10 mg

Tiamina	10 mg
Pantotenato	20 mg
Pirodoxina	5 mg
Aforarlo a 10 ml con agua bidestilada	

Determinación de la actividad específica de la enzima β -glucoronidasa en *Rhizobium*, vida libre.

Una colonia aislada de la cepa de interés se inocula en 3 ml de medio PYCaNm30, posteriormente se incuban toda la noche a 30 °C en agitación. Al día siguiente se hizo un subcultivo en 100 ml de medio PYCaNm30 con una densidad óptica de 0.02, incubando en agitación a 30 °C. Se tomaron alícuotas de 1 ml por duplicado cuando los cultivos llegaron a una OD de 0.2, 0.5, y 1.0, las muestras se centrifugan y se les retira el sobrenadante.

Las células fueron resuspendidas en TCA saturado (1vol TCA : 1 vol agua) y almacenadas a -70°C, una muestra de 1 ml fue utilizada para medir la concentración de proteínas por el método de Lowry. Las células de la segunda muestra fueron resuspendidas en 1 ml de solución MM-salts (MgSO₄ 0.01 gr, K₂HPO₄ 0.022 gr en 100 ml de agua), posteriormente se adicionaron 30 μ l de SDS 0.1 % y 60 μ l de cloroformo, se agitó en vortex, dejando en reposo 5 min hasta que se obtuvieron dos fases. En tubos Eppendorf limpios se colocaron 400 μ l de una solución (50 mM KP Buffer pH 7.0; 5 mM DTT; 1 mM EDTA pH 7.5 y 12.5 μ l de 100 mM PNPG/ml) que contiene un sustrato cromogénico llamado 4-nitrofenil- β -D-glucorónico este sustrato sirve para la detección de la actividad enzimática de β -glucoronidasa dando una coloración amarilla. Los tubos se colocaron en un termomixer a 37 °C, posteriormente se agregaron 100 μ l de las células permeabilizadas teniendo cuidado de no llevarse el cloroformo, los tubos se incubaron, 0, 30, 60 y 90 minutos, transcurrido el tiempo se colectan 100 μ l y se transfieren a eppendorfs con 800 μ l de 0.4 M Na₂CO₃.

La actividad se calcula determinando la velocidad de reacción en nanomoles de producto por minuto por unidades OD₅₄₀ según la siguiente fórmula:

$$R=S/(O \times V \times O. D_{540})$$

O = Es el coeficiente de extinción molar de PNPG (0.02)

V = Volumen ensayado (0.1 ml)

S = Unidades O. D₄₀₅ por minuto

R=Resultado

La actividad de la enzima β -glucoronidasa se reportó como actividad específica, para esto se hizo una determinación de proteínas totales por el método de Lowry. El resultado se integró a la formula anterior:

$$R=S/(O \times V \times \text{mg proteína/ml})=\text{nmol/ O. D}_{405} \text{ min/mg proteína}$$

Ensayos experimentales con plantas leguminosas.

Germinación de semillas *Leucaena leucocephala* y *Phaseolus vulgaris*, Negro jamapa.

En un matraz de vidrio fueron colocadas 100 semillas de *Leucaena leucocephala*, posteriormente se agregaron 50 ml de ácido sulfúrico, durante 15 min se agita lentamente; transcurrido el tiempo el ácido se elimina, las semillas se lavan con agua corriente, exhaustivamente.

Las semillas escarificadas se traspasan a cajas de Petri y se cubren con hipoclorito de sodio comercial al 5% durante 15 min, posteriormente las semillas se lavan con agua estéril, hasta retirar el aroma a cloro, 19 a 20 semillas son colocadas en cajas de agua-agar 0.75% incubando a 29°C en obscuridad durante 72 hrs.

Las semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*, Negro Jamapa) fueron colocadas en una caja de petri para ser esterilizadas con etanol al 75% durante 5 min, hipoclorito de sodio comercial al 5% durante 15 min, finalmente se enjuagan con agua bidestilada estéril 5 veces. En cajas

de Petri que contienen agar-agua al 0.75% se colocan de 21-25 semillas. Posteriormente las cajas se incuban tres días a 28°C en obscuridad para que las semillas germinen.

Obtención de exudados de raíz.

En el interior de un vaso de precipitado de 500 ml se colocó un soporte de plástico para plántulas, 200 ml de solución Fahraeus (Fahraeus; 1975; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.4 mM, KH_2PO_4 , 0.7 mM, CaCl_2 6 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 mM, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{Fe} \cdot \text{NH}_3$ 20 μM , 1ml por litro del stock de trazas (2.86gr H_3BO_3 , 2.03 gr. $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 220 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 80 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 80 mg $\text{NaMoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ aforado a un litro de agua) el recipiente se cubrió con un tapón de gasa-algodón, envolviendo todo en aluminio, por último se esteriliza.

En el vaso de precipitado preparado anteriormente se colocaron por separado 30 plántulas de frijol y 30 plántulas de *Leucaena leucocephala*, el vaso se cubre con una bolsa de plástico negra. Para determinar si las plántulas que se introdujeron al vaso de precipitado estaban contaminadas, cada una de las raíces, fue colocada momentáneamente en una caja con medio LB y en otra con medio PY incubándose a 29°C toda la noche.

En uno de los experimentos se simuló una de las etapas tempranas del proceso simbiótico de *Rhizobium tropici* con sus hospederos según el siguiente protocolo: en uno de los vasos de precipitados preparado como se indica anteriormente, agregamos una concentración de *Rhizobium tropici* CFN299 1×10^{-5} , posteriormente plántulas y bacterias fueron incubadas en un cuarto de crecimiento de plantas con un fotoperiodo de 12 hrs luz por 12 hrs de oscuridad, durante 72 hrs a 26-29 °C.

Transcurrido el tiempo, se tomarón 25 ml de medio de cultivo de cada una de las condiciones (aquí se encuentran los exudados de raíz) y se adicionaron a 75 ml de medio sólido PYCa con 0.05 mg/ml de glucoronidasa, las placas contienen los antibióticos Nal20 y Nm30. Los exudados de raíz fueron plateados en medios ricos para determinar que no estuvieran contaminados

Ensayos de nodulación.

Las plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris*, Negro Jamapa) se colocan en matraces de 250 ml con 200 ml de medio Fahraeus (Fahraeus, 1957) sólido, posteriormente son inoculadas con *Rhizobium* a una concentración de 1×10^5 bacterias; incubándolas en el cuarto de crecimiento con fotoperíodo de 12 hr luz-12 hr oscuridad a 27-29°C durante 21 días. Las plántulas se revisan cada 5 días, para evaluar el proceso de nodulación.

Aislamiento bacteriano de nódulo.

Nódulos de 10, 15 y 21 días postinoculación (dpi) fueron colocados en cajas de Petri con etanol 70%, 1 min, posteriormente se agrega una solución de hipoclorito de sodio comercial al 5% durante 5 min, finalmente se lavan con agua estéril 5 veces. Para asegurar que la esterilización fue efectiva, los nódulos son tomados con una pinza estéril y rodados en cajas de Petri con PYCa. Los nódulos son colocados en un tubo eppendorf con 1 ml de NaCl 0.85%. El contenido de este tubo es homogenizado con un aplicador de madera estéril. Plateando 100 μ l del macerado en cajas de PYCa con sus respectivos antibióticos incubando 48 hrs a 30 °C.

Prueba de reducción de acetileno.

La fijación biológica de nitrógeno se analizó por una prueba indirecta utilizando la técnica de reducción de acetileno.

A las plantas de *Phaseolus vulgaris*, Negro Jamapa de 21 dpi, se les retiró la parte aérea (hojas y tallo), las raíces junto con los nódulos fueron introducidas en un vial de vidrio, el recipiente se cubre con un tapón de plástico. Con una jeringa se obtienen 600 μ l de aire, los cuales son substituidos por 600 μ l de carburo de calcio, incubando 1 hr a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, con una jeringa se tomaron 500 μ l de la mezcla de gases que hay en el vial y se inyectan en la columna del cromatógrafo de gases Varian 3300

(Burris, 1972). Para determinar la concentración de reducción de acetileno se tomó en cuenta la siguiente ecuación:

$$X = W / V$$

W = área bajo la curva obtenido en el reporte del cromatógrafo

V = volumen del vial de vidrio (39.06)

$$\mu\text{M} = ((X)(0.0093)(74.8)) / 1000$$

X=Resultado de la fórmula previa.

Los resultados se graficaron en el programa Microsoft Office Excel 2003.

Detección de la actividad de la enzima β -glucoronidasa en nódulos de 10, 15 y 21 dpi.

En un vial de vidrio con 5 ml de solución A (Tabla 7) se introdujo la raíz nodulada de *Phaseolus vulgaris*, Negro Jamapa de 10, 15 y 21 dpi; los viales fueron tapados con parafilm y cubiertos por completo con aluminio para impedir el paso de la luz. Los viales se incuban 24 hrs a 37°C. Transcurrido el tiempo, fue analizada visualmente la detección de la enzima β -glucoronidasa en nódulos.

Tabla 7. Solución A.

5 ml Amortiguador de fosfatos de sodio pH 7.0 1M
5 ml EDTA 10mM
5 μ l Tween 20
50 μ l Tritón x-100
2.5 mg de X-glu disuelto en 50 μ l DMSO
<u>39.9 ml</u> Agua estéril
50 ml Total

Resultados.**Generación de un banco de mutantes y fusiones transcripcionales del plásmido simbiótico de *Rhizobium tropici* CFN299.**

Con el objetivo de generar un banco de mutantes y fusiones transcripcionales del plásmido simbiótico de *Rhizobium tropici* CFN299, el ADN plasmídico de las clonas pBACA303 y pBACA317 fueron purificados y nebulizados, posteriormente se visualizaron en un gel de agarosa seleccionando la región de 850 a 3000 pb, esta región fue cortada y purificada.

Los extremos del ADN nebulizado y el vector pVO155 linearizado fueron reparados y solo el pVO155 fue defosforilado (ver materiales y métodos). La integridad de los ADN purificados y utilizados en las reacciones de ligación se muestra en la Figura 1.

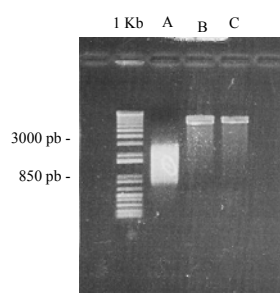


Fig. 1. ADN utilizado para la generación de un banco de mutantes. 1 Kb) Marcador de peso Molecular 1 Kb Plus Ladder (Invitrogen). A) Fragmento de ADN nebulizado pBACA317. B y C) ADN plasmídico (pVO155) linearizado.

Estos ADN se ligaron y transformaron en células DH5 α , HB101 y TOP10B, seleccionando las transformantes con neomicina. El resultado de la transformación fue la obtención de 5000 clonas transformantes. Sin embargo, el plásmido pVO155 no presenta una selección positiva por lo que fue necesario verificar la integración del fragmento del pSym al vector por medio de un análisis de perfil de plásmidos (Figura 2).

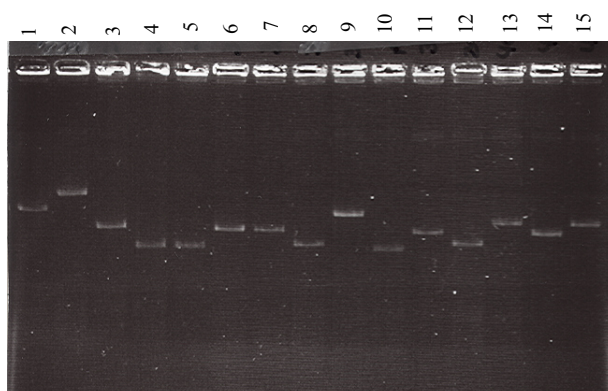


Fig 2. Perfil de plásmidos tipo Eckhardt. Análisis de *E. coli* transformadas con el plásmido pVO155 conteniendo fragmentos clonados del pSym, carriles 1-9, 11-14. Carril 10, *E. coli* con el plásmido pVO155. Gel de agarosa TBE 1X (0.85%) teñido con bromuro de etidio.

Las clonas que presentaban una banda mayor al pVO155 (carril 10) fueron seleccionadas como positivas, obteniendo 618 clonas positivas de 1000 clonas que se analizaron. Para verificar el tamaño del fragmento clonado se utilizaron oligonucleótidos (ver materiales y métodos) para realizar PCR, los resultados de estos experimentos muestran que la mayoría de las clonas contienen, fragmentos clonados entre los 850 y 3000 pb como era de esperarse (Figura 3). Como control de amplificación se utilizó el plásmido pVO155 sin inserto, cualquier fragmento superior al generado por la amplificación del pVO155 es una clona con un fragmento del pSym.

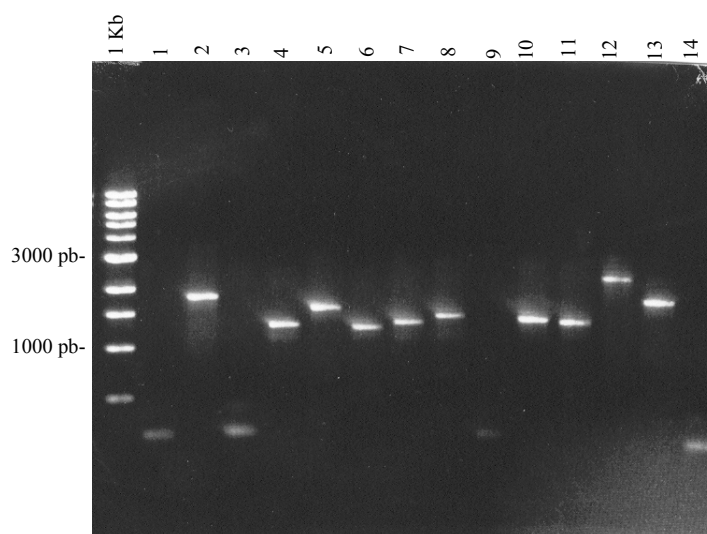
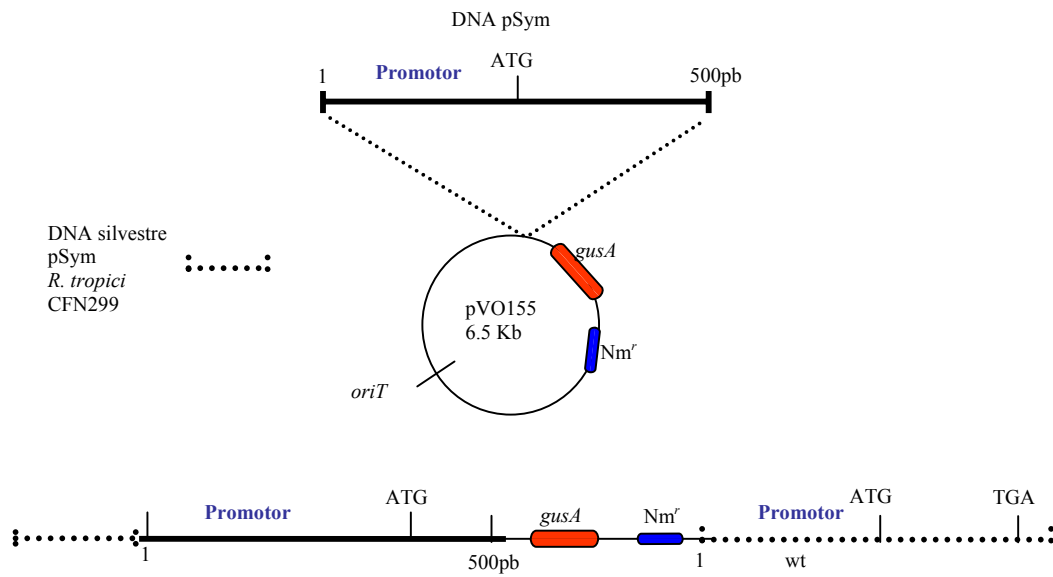


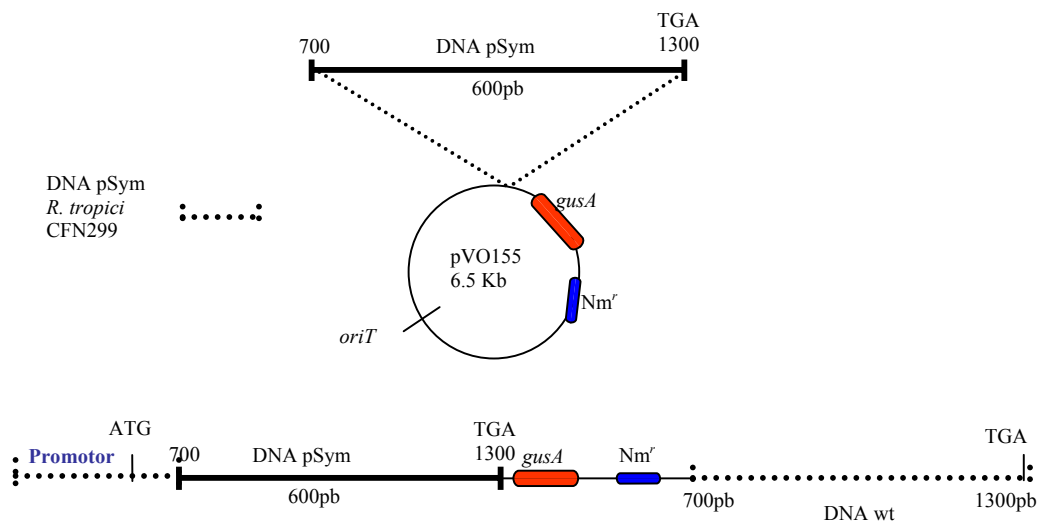
Fig 3. Amplificación de ADN por el método de PCR de clonas preseleccionadas por perfil de plásmido (1Kb) Marcador de peso molecular 1Kb Ladder (New England, Biolabs). 1-13, Clonas positivas. 14, Plásmido pVO155 sin inserto. Gel de TAE 1X agarosa 1 % teñido con bromuro de etidio.

La biblioteca de mutantes y fusiones transcripcionales de *Rhizobium tropici* CFN299 fue generada a partir de la biblioteca de *E. coli* que contenía el plásmido pVO155 conteniendo fragmentos al azar del pSym. Estas construcciones fueron transferidas por conjugación (triparental) a la cepa CFN299 (materiales y métodos). El plásmido pVO155 no se replica en *Rhizobium tropici*, por lo que al contener un segmento del pSym, éste se integra a su homólogo silvestre por recombinación sencilla. Dando como resultado fusiones transcripcionales (A, B), fusiones transcripcionales-mutaciones (C), como se muestra en la Figura. 4.

Fusión A



Fusión B



Fusión C

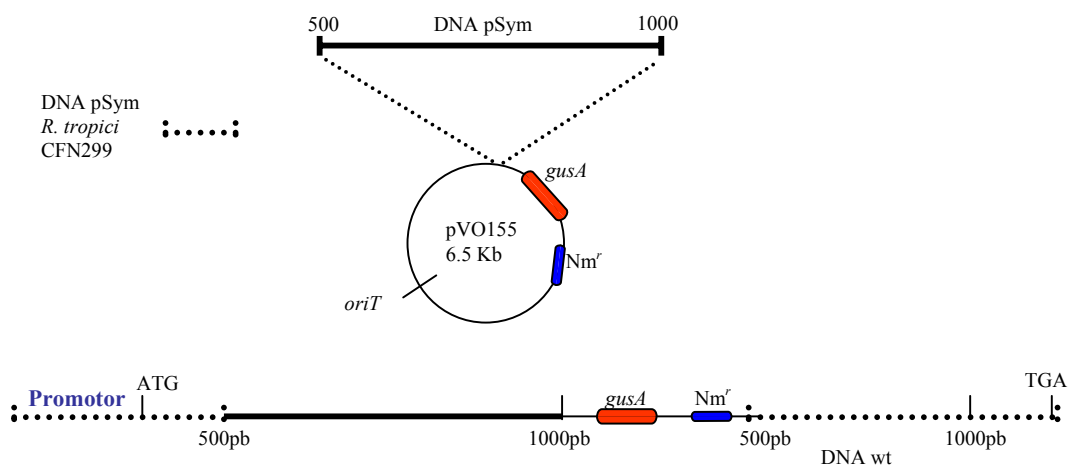


Fig 4. Eventos de recombinación. Fusión A; fragmento que cuenta con un promotor y el ATG de un gen clonado en el vector pVO155. Fusión B; clonación en pVO155 de un segmento interno conteniendo el TGA. Fusión C, Fusión transcripcional-mutación; el vector posee un fragmento interno dando origen a una proteína truncada.

Estos ejemplos ilustran lo que se puede esperar genéticamente con esta metodología. Mediante esta estrategia se construyó una librería de mutantes y fusiones de *Rhizobium tropici* CFN299.

Se realizaron 210 cruzas triparentales obteniendo 136 transconjugantes de *Rhizobium tropici* CFN299 capaces de crecer en medio selectivo PYCa NaI20 Nm30. Después de la purificación de las clonas en medio selectivo se les realizó un ensayo tipo Eckhardt a las 136 clonas, para visualizar los patrones de los plásmidos de *R. tropici* CFN299 y verificar que estas clonas no presentaran ninguna delección o rearrreglo en algún plásmido (Figura 5). Todas las clonas presentan un patrón de corrimiento muy similar al de la silvestre.

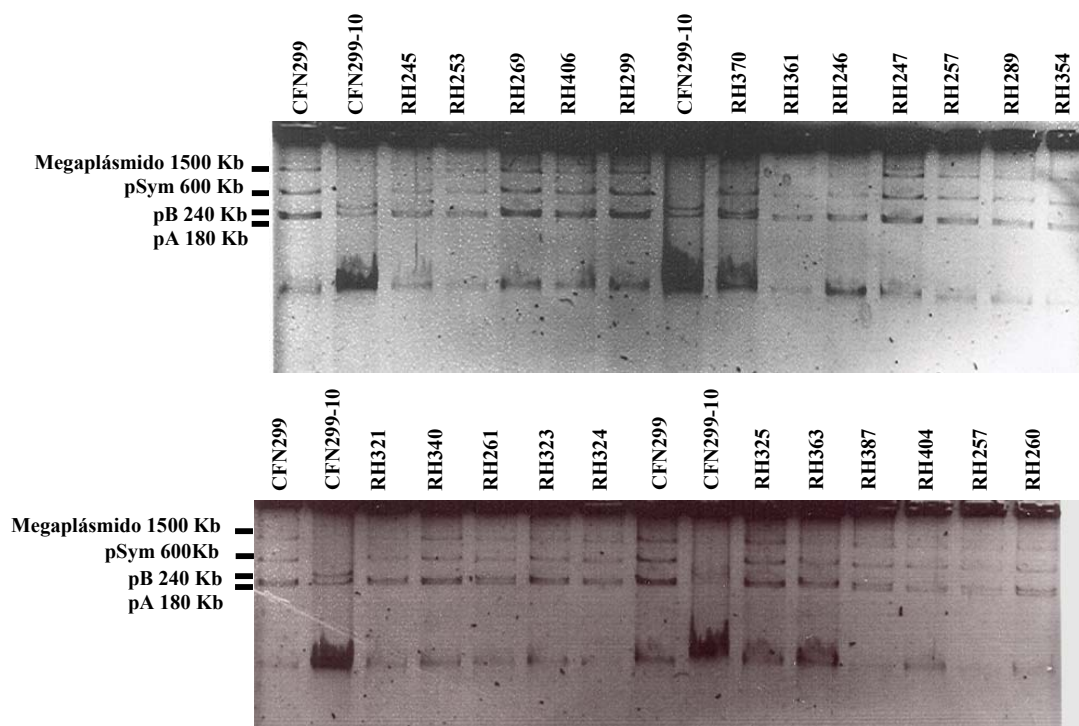


Figura 5. Perfil plásmidico tipo Eckhardt de 22 clonas recombinantes de *Rhizobium tropici* CFN299. CFN299, cepa silvestre *R. tropici*; CFN299-10, *R. tropici* Δ 200 Kb del pSym sin el pB. Gel de agarosa TBE 1X (0.85%) teñido con bromuro de etidio.

Para verificar que no hay dos copias del vector pVO155 se realizó un Southern blot a 22 clonas (RH245, RH246, RH247, RH253, RH256, RH257, RH260, RH261, RH269, RH289, RH321, RH323, RH324, RH325, RH340, RH354, RH361, RH363, RH370, RH387, RH404, RH406) que presentaron fenotipo de interés en vida libre y en simbiosis. Sólo la clona RH289 presenta dos copias del plásmido pVO155 (Imagen no mostrada).

Caracterización de clonas recombinantes *Rhizobium tropici* CFN299 en vida libre.

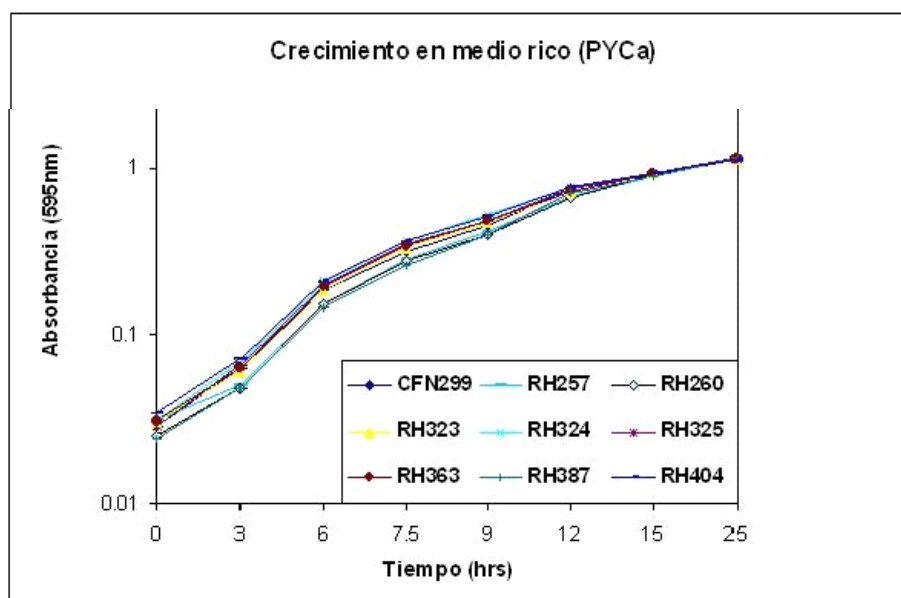
Para cumplir con otro de los objetivos del trabajo, a 136 clonas del banco de *Rhizobium tropici* CFN299 se les realizó un análisis funcional en vida libre y en simbiosis.

Para determinar la expresión genética en vida libre, se utilizaron cajas suplementadas con distintas fuentes de carbono (glucosa, sacarosa, succinato, glioxilato y glicolato 10 mM) y X-glu.

En esta serie de experimentos los análisis determinaron que el crecimiento de las clonas en placa con respecto a la silvestre es el mismo, sin embargo 8 clonas (RH257, RH260, RH323, RH324, RH325, RH363, RH387 y RH404) presentan actividad de la enzima β -glucoronidasa en cada una de las distintas fuentes de carbono incluyendo el medio PYCa (Figura no mostrada).

A estas clonas se les realizó una curva de crecimiento en condiciones de agitación a 29°C; esto se llevó a cabo por triplicado en ensayos independientes comparando los resultados con la cepa silvestre.

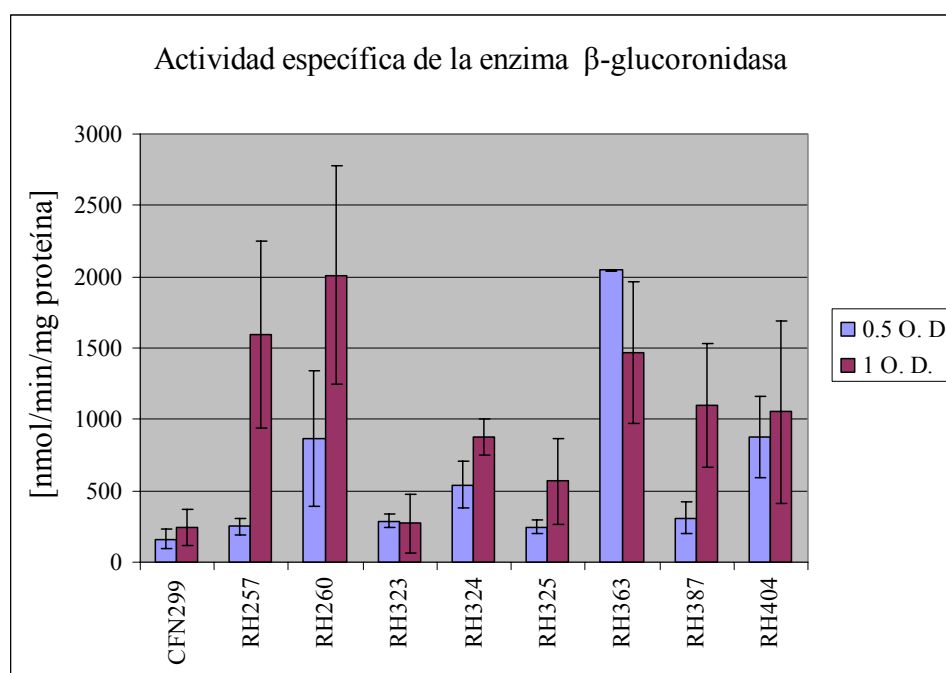
Los experimentos demuestran que todas las cepas presentan el mismo comportamiento como se observa en la Gráfica 1.



Gráfica 1. Curva de crecimiento de las transconjugantes de *Rhizobium tropici* CFN299 en medio PYCa en agitación.

Actividad específica de la enzima β -glucuronidasa.

La actividad específica de la enzima β -glucuronidasa se determinó en las clonas RH257, RH260, RH323, RH324, RH325, RH363, RH387 y RH404, (ver materiales y métodos) esto se realizó en ensayos independientes por triplicado. Gráfica 2.



Gráfica 2. Actividad específica de la enzima β -glucuronidasa.

Los resultados de detección de la actividad específica de la enzima β -glucuronidasa de RH257, RH260, RH323, RH324, RH325, RH363, RH387 y RH404 fueron comparadas con los resultados de las cepas CFN299 silvestre. Se encontró que la cepa RH363 presenta mayor actividad transcripcional de la enzima β -glucuronidasa en fase logarítmica con respecto a la cepa silvestre. Las cepas RH257, RH260, RH387, RH404 presentan actividad en la fase estacionaria con respecto a la cepa silvestre.

Tabla 8. Actividad específica de la enzima β -glucoronidasa en vida libre (PYCa).

Nombre de la clona de <i>R. tropici</i>	Tamaño fragmento (pb)	Expresión en fase logarítmica (0.5 O.D.) [nmol/min/mg proteína]	Expresión en fase estacionaria (1 O.D.)
CFN299	-	159.683	245.240
RH257	3117	251.355	1594.459
RH260	3821	865.943	2009.289
RH323	1006	289.344	270.607
RH324	807	543.918	873.989
RH325	1105	248.221	566.303
RH363	1732	2048.374	1469.589
RH387	1419	308.891	1099.069
RH404	1908	880.820	1052.181

Estas clonas se secuenciaron por completo para determinar el gen o genes que se expresan en estas condiciones.

Expresión genética de *Rhizobium tropici* en presencia de exudados *Leucaena leucocephala* y *Phaseolus vulgaris*, Negro jamapa.

Se evaluó la expresión genética de las clonas mediante el gene reportero *gusA* en presencia de exudados de leguminosas (frijol y *Leucaena*) en presencia y ausencia de *Rhizobium tropici* CFN299, los exudados fueron incluidos en el medio sólido PYCa (Ver materiales y métodos).

De las 136 clonas evaluadas con exudados de raíz junto con el sustrato de la enzima β -glucoronidasa, solo 8 clonas presentan expresión del gen reportero (Tabla 9), estas bacterias son las mismas que en los experimentos de vida libre (Tabla 8).

Tabla 9. Clonas de *R. tropici* CFN299 que se expresan en presencia y ausencia de exudados de planta.

Nombre de la clona de <i>R. tropici</i> CFN299	Tamaño fragmento (pb)
RH257	3117
RH260	3821
RH323	1006
RH324	807
RH325	1105
RH363	1732
RH387	1419
RH404	1908

Cinéticas de nodulación.

Se inocularon plantas de frijol independientemente con 136 construcciones y monitoreadas constantemente a lo largo del proceso de nodulación. Para representar cada una de las etapas del desarrollo del nódulo se escogieron los días 10 (nódulos jóvenes), 15 (nódulos maduros) y 21 (nódulos con el punto máximo de fijación de nitrógeno) después de su inoculación; en cada uno de estos tiempos los nódulos de una planta fueron recolectados; estos nódulos se utilizaron para determinar la expresión genética analizando la actividad de la enzima β -glucoronidasa (Figura 7.A, 7.B. y 7.C). Los resultados muestran que de 136 clonas que se inocularon sólo 14 clonas presentan expresión genética en diferentes días de la cinética de nodulación. Ver Tabla 10.

Tabla 10. Clonas que presentaron actividad de la enzima β -glucoronidasa en nodulación.

Cepa	Días después de su inoculación (dpi)			Tamaño fragmento (pb)
	10 dpi	15 dpi	21 dpi	
RH245	Azul	Azul	Azul	336
RH253	Azul	Azul	Azul	3871
RH246	-	Azul	Azul	3015
RH247	-	Azul	Azul	3111
RH256	-	Azul	Azul	1279
RH261	-	Azul	Azul	2193
RH269	-	Azul	Azul	5000
RH340	-	Azul	Azul	3500
RH361	-	Azul	Azul	1606
RH370	-	Azul	Azul	1994
RH406	-	Azul	Azul	540
RH289	-	-	Azul	969
RH321	-	-	Azul	1333
RH354	-	-	Azul	1192

Nódulos de *Phaseolus vulgaris* inoculados con cepas derivadas de *R. tropici* CFN299.

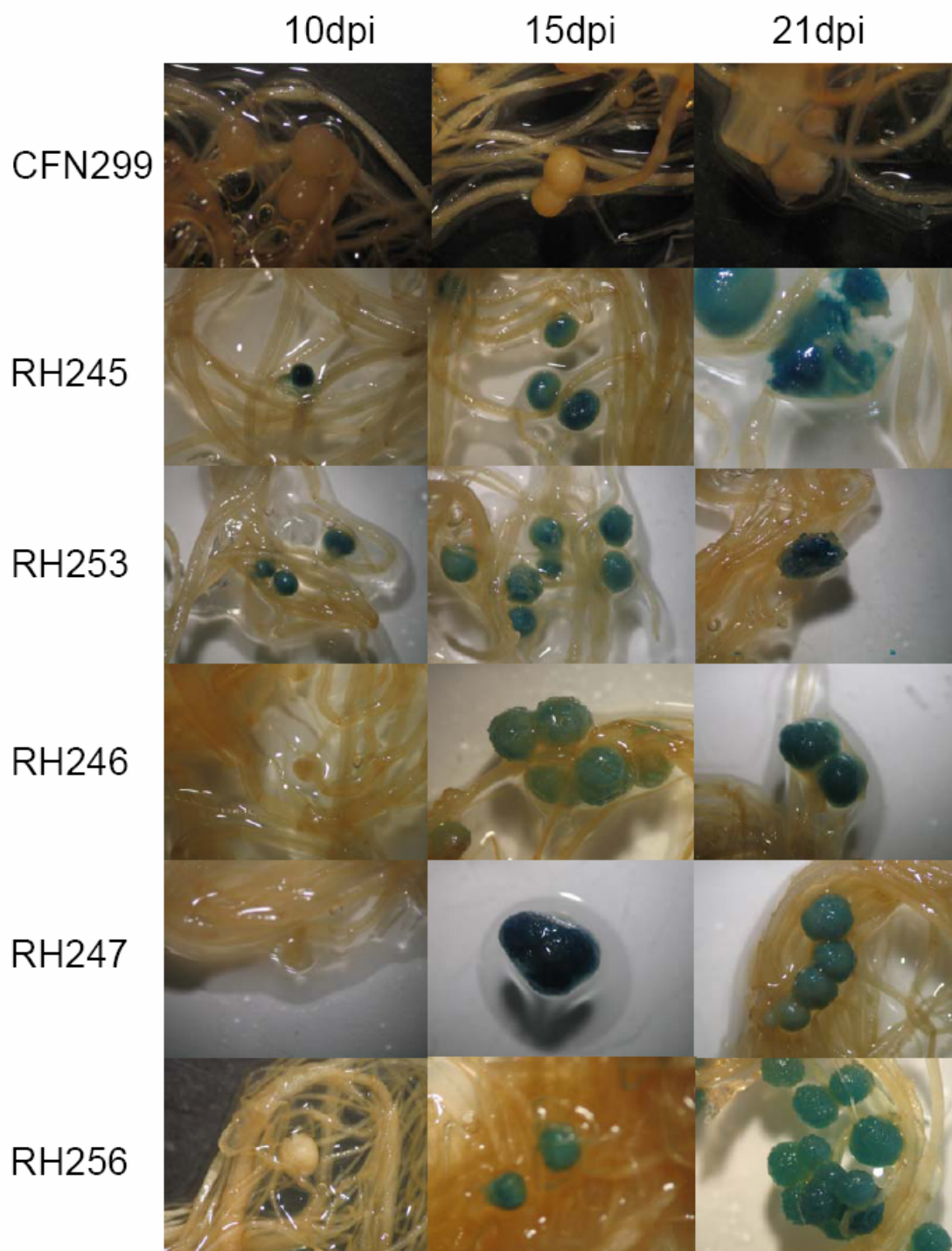


Figura 7.A. Actividad de la enzima β -glucoronidasa en nódulos de plantas de frijol de 10, 15 y 21 días después de su inoculación con las clonas CFN299, RH245, RH253, RH246, RH247, RH256 de *Rhizobium tropici* CFN299.

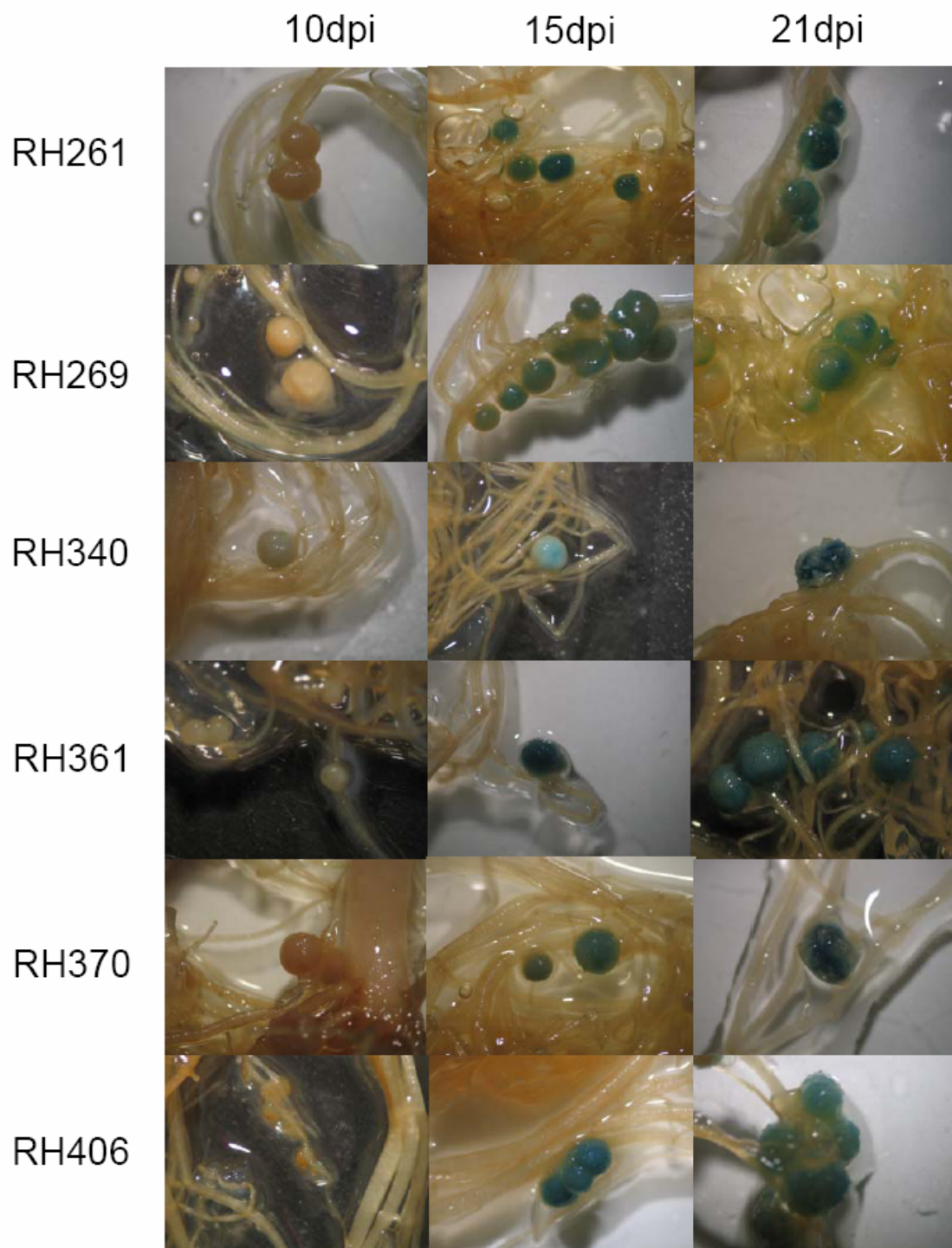


Figura 7.B. Actividad de la enzima β -glucuronidasa en nódulos de plantas de frijol de 10, 15 y 21 días después de su inoculación con las clonas RH261, RH269, RH340, RH361, RH370, RH406 de *Rhizobium tropici* CFN299.

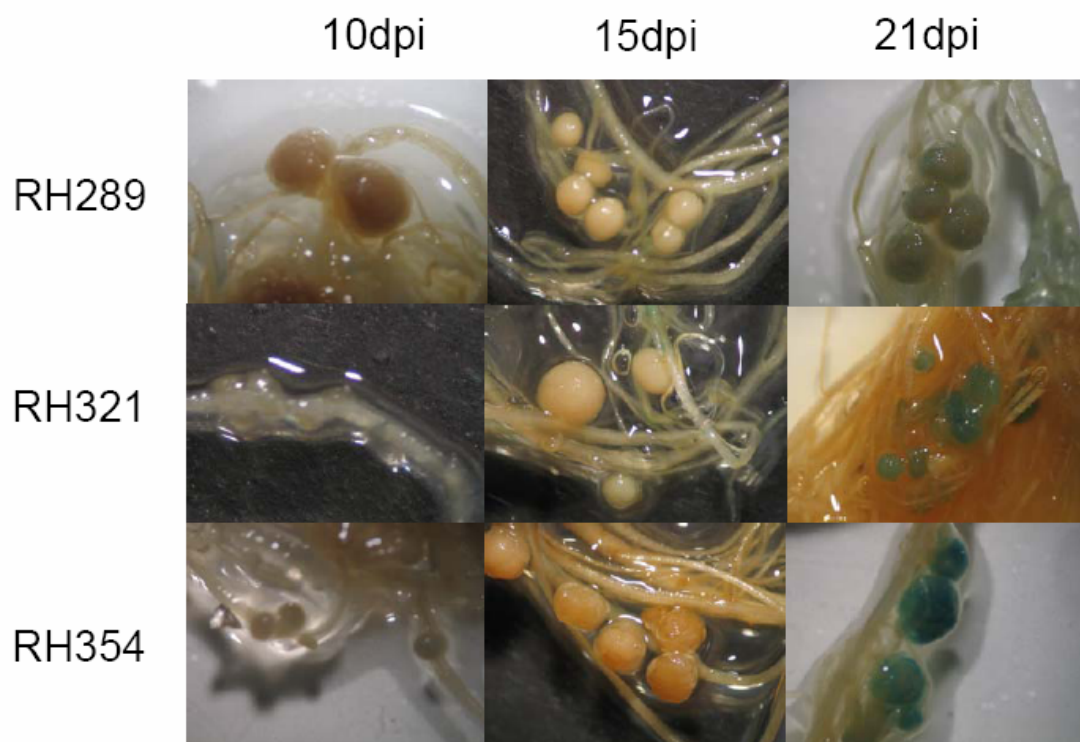
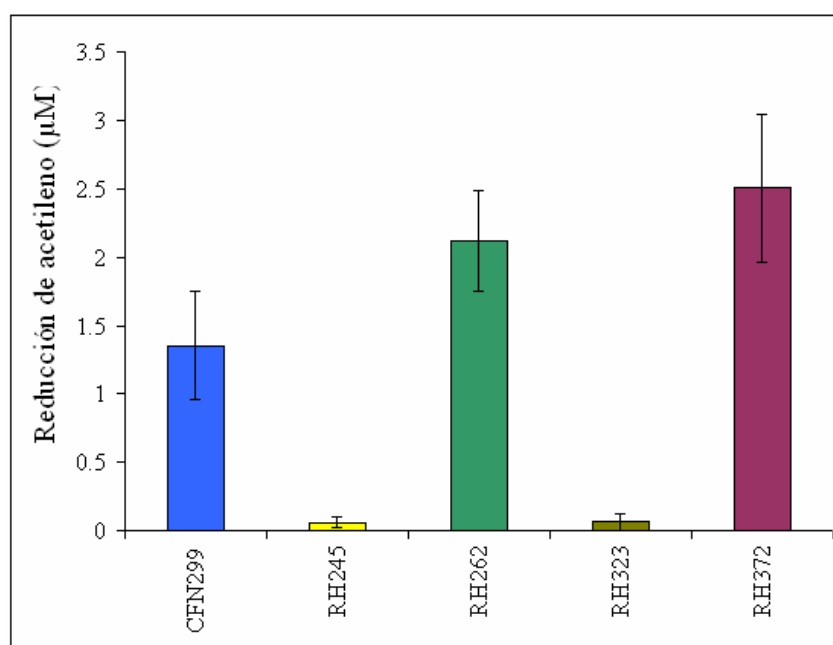


Figura 7.C. Actividad de la enzima β -glucoronidasa en nódulos de plantas de frijol de 10, 15 y 21 días después de su inoculación con las clonas RH289, RH321, RH354, de *Rhizobium tropici* CFN299.

Ensayos de reducción de acetileno.

Se determinó la capacidad para reducir acetileno en plantas de *Phaseolus vulgaris*, Negro Jamapa, inoculadas con las mutantes de *R. tropici* CFN299. Se analizaron 136 clonas de *R. tropici* CFN299 en dos ensayos independientes, cada clona fue inoculada en 8 plantas de frijol. Las cepas RH245 y RH323 muestran una disminución en la fijación de nitrógeno, a su vez las mutantes RH262 y RH372 tienen un ligero aumento en la fijación de nitrógeno comparado con la cepa silvestre. Ver Gráfica 3.



Gráfica 3. Reducción de acetileno en nódulos *Phaseolus vulgaris*, Negro Jamapa (21 dpi) inoculados con derivadas de *Rhizobium tropici* CFN299.

Las clonas con fenotipos de interés se mandaron secuenciar, para esto se regresó al banco de *E. coli* y se realizó una extracción de los plásmidos correspondientes. Las secuencias obtenidas fueron comparadas en las bases de datos GenBank. Tabla II. A y B.

Tabla II. A. Genes del pSym de *R. tropici* expresados en vida libre.

Nombre de la clona de <i>R. tropici</i> CFN299	Proteínas homólogas % identidad; marco de lectura, tamaño de la proteína en aminoácidos aa	Función de la proteína	Número de acceso en el GenBank Database	Estructura genética hipotética
RH257 3137 pb	<p>Probable proteína de conjugación y transferencia TrbB <i>Rhizobium etli</i> CFN 42 (96%, 97%; +2,+3) (325 aa)</p> <p>Probable proteína de conjugación y transferencia TrbC <i>Rhizobium etli</i> CFN 42 (92%; +1) (127 aa)</p>	<p>Conjugación</p> <p>Conjugación</p>	<p>GENE ID: 3894883 trbB</p> <p>GENE ID: 3894882 trbC</p>	<p>Diagrama de la estructura genética hipotética de los genes trbB y trbC. Se muestra una línea horizontal con marcadores de inicio (ATG) y fin (TGA) de los genes. El gen trbB está representado por una barra azul que comienza en la posición 1 y termina en la posición 325. El gen trbC está representado por una barra morada que comienza en la posición 35 y termina en la posición 124. Entre las posiciones 1049 y 1144 hay un espacio. Se indican también los números de aminoácidos: 95 para trbB y 3 para trbC. Hay tres pequeños cuadrados negros a la izquierda del inicio del gen trbB.</p>

<p>Proteína de conjugación y transferencia TrbD <i>Rhizobium etli</i> CFN 42] (100%; +3) (99 aa)</p>	<p>Conjugación</p>	<p>GENE ID: 3894881 trbD</p>	
<p>Proteína de conjugación y transferencia TrbE <i>Rhizobium etli</i> CFN 42 (96%, 77%; +1,+2) (818 aa)</p>	<p>Conjugación</p>	<p>GENE ID: 3894880 trbE</p>	
<p>Proteína de conjugación y transferencia TrbJ <i>Rhizobium etli</i> CFN 42 (92%, 69%, 94%; +2, +3,+1) (267 aa)</p>	<p>Conjugación</p>	<p>GENE ID: 3894879 trbJ</p>	
<p>Proteína de conjugación y transferencia TrbL <i>Rhizobium etli</i> CFN 42 (87%; +3,) (472 aa)</p>	<p>Conjugación</p>	<p>GENE ID: 3894803 trbL</p>	

<p>RH260 3821 pb</p>	<p>Proteína de conjugación y transferencia TraA <i>Rhizobium etli</i> (93%; +1, +2) (1103 aa) Proteína de conjugación y transferencia TraF <i>Rhizobium etli</i> (85%; +1) (188 aa) Proteína de conjugación y transferencia TraB <i>Rhizobium etli</i> (87%; +1, +2) (387 aa)</p> <p>Conjugación y transferencia de plásmidos GENE ID: 3894789 traAa</p> <p>Conjugación y transferencia de plásmidos GENE ID: 3894790 traF</p> <p>Conjugación y transferencia de plásmidos GENE ID: 3894791 traB</p>	<p>Genetic map of the RH260 plasmid. The TraA gene (purple) starts at position 1 and ends at 2237. The TraF gene (green) starts at 2247 and ends at 2807. The TraB gene (pink) starts at 2800 and ends at 348. A beta-glucuronidase gene (orange) and an Nm^r gene (blue) are also present. The map includes ATG and TGA start/stop codons and a 10 bp region between TraA and TraF.</p>
<p>RH323 1006 pb</p> <p>Fix⁻</p>	<p>Hidropéroxido reductasa putativa CFN42 <i>Rhizobium etli</i> (87%; +1) (537 aa)</p> <p>Transducción de señales GENE ID: 1005060 RHE_PD00217</p> <p>RNA polimerasa factor sigma (sigma-54) <i>Rhizobium etli</i> CFN42 (76%; +2) (483 aa)</p> <p>Modula la transcripción GENE ID: 1005059 RHE_PD00218</p>	<p>Genetic map of the RH323 plasmid. The Hidropéroxido reductasa putativa gene (purple) starts at position 1 and ends at 206. The RNA polimerasa factor sigma gene (pink) starts at 1006 and ends at 139. A beta-glucuronidase gene (orange) and an Nm^r gene (blue) are also present. The map includes ATG and TGA start/stop codons and an 89 bp region between the Hidropéroxido reductasa putativa and RNA polimerasa factor sigma genes.</p>

<p>RH324 807 pb</p>	<p>Proteína hipotética en SYRB región 5' (ORF4) <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021 (68%; +2) (197 aa)</p> <p>Proteína hipotética SMa1697 <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021 (47%; +3) (199 aa)</p> <p>Sin caracteriza</p> <p>GENE ID: 1235972 SMa1702</p> <p>Sin caracteriza</p> <p>GENE ID: 1235968 SMa1697</p>	
<p>RH325 1105 pb</p>	<p>Proteína H NodH <i>Rhizobium tropici</i> (96%; +2) (249 aa)</p> <p>Proteína P NodP <i>Rhizobium tropici</i> (98%; +2) (299 aa)</p> <p>Sulfonotransferasa, proteína de nodulación</p> <p>spiP52994/NODH_RHITR</p> <p>Proteína de nodulación</p> <p>emb/CAA60913.1</p>	
<p>RH363 1732 pb</p>	<p>Proteína externa de secreción putativa <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021 (85%; +2) (1112 aa)</p> <p>Transporte sin caracterizar</p> <p>GENE ID: 1237315 SMb21543</p>	

RH387 1419 pb	Proteína de conjugación G <i>Rhizobium etli</i> CFN42 (97%; +1) (270 aa)	Conjugación	GENE ID: 3894801 trbG	
	Proteína de conjugación H <i>Rhizobium etli</i> CFN42 (96%; +3) (145 aa)	Conjugación	GENE ID: 3894800 trbH	
	Proteína de conjugación I <i>Rhizobium etli</i> CFN42 (95%; +1) (435 aa)	Conjugación	GENE ID: 3894799 trbI	
RH404 1908 pb	ATPasa para la segregación del cromosoma <i>Roseobacter</i> sp. AzwK-3b (65%; -2) (453 aa)	Segregación del cromosoma	ref ZP_01904937.1 	
	DNA helicasa, putativa <i>Roseovarius</i> sp. TM1035 (71%; +3) (1051aa)	DNA helicasa sin caracterizar	ref ZP_01881062.1 	

Estructura hipotética de fusiones transcripcionales del pSym de *R. tropici*. Las líneas sólidas de colores representan los genes que conforman la fusión. Las líneas punteadas corresponden al gen silvestre donde ocurrió el evento de recombinación.

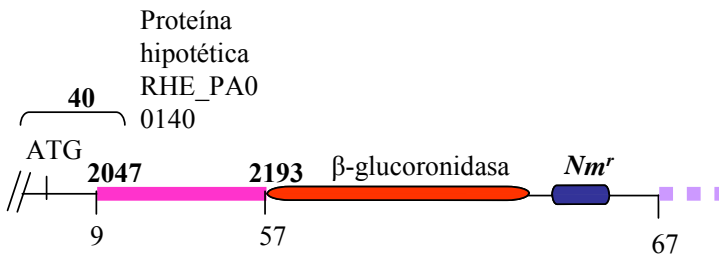
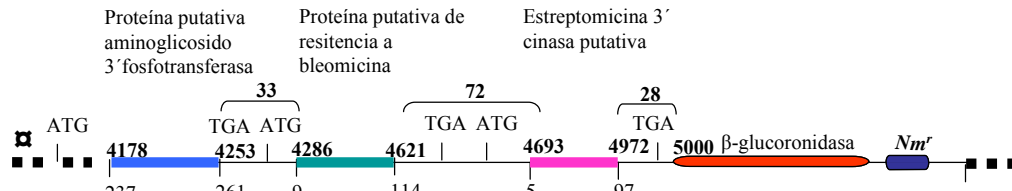
Los números en negrilla representan la secuencia en ADN integrado. Los números debajo de la línea corresponden a aminoácidos de la proteína homóloga. ATG y TGA codones de inicio y de término.

Tabla II. B. Genes del pSym de *R. tropici* expresados en simbiosis.

Nombre de la clona de <i>R. tropici</i> CFN299	Proteínas homólogas (% identidad; marco de lectura) (tamaño de la proteína en aminoácidos aa)	Función de la proteína	Número de acceso en el GenBank Database	Estructura genética hipotética
RH245 336pb Fix⁻	RNA polimerasa factor sigma (sigma-54) <i>Rhizobium etli</i> (75%; +3) (483 aa)	Regulación de la transcripción	GENE ID: 1005059 RHE_PD00218	
RH246 3015 pb	Proteína hipotética RPC_0119 <i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisB18 (57%; +3) (145 aa) Proteína hipotética Smed_3542 <i>Sinorhizobium medicae</i> WSM419 (75%; -3, -2) (200 aa) Proteína hipotética Bpse1_03002515 <i>Burkholderia mallei</i> 1655 (66%; +1, +3) (341 aa) Poly(3-hidroxibutirato) depolimerasa	Sin caracterizar	GENE ID: 3971300 RPC_0119 GENE ID: 5324430 Smed_3542 ref ZP_01318170.1 	

<p>RH247 3111 pb</p>	<p>Proteína hipotética RPC_0119 <i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisB18 (66%; +1, +2) (145aa)</p> <p>Proteína hipotética Smed_3542 <i>Sinorhizobium medicae</i> WSM419 (77%; -3, -2) (200 aa)</p> <p>COG3509: Poli(3-hidroxi- butirato) depolimerasa <i>Burkholderia mallei</i> GB8 horse 4 (53%; +3), (341aa)</p>	<p>Sin caracterizar</p> <p>Sin caracterizar</p> <p>Metabolismo secundario</p>	<p>GENE ID: 3971300 RPC_0119</p> <p>GENE ID: 5324430 Smed_3542</p> <p>ref ZP_00441471.1 </p>	<p>Proteína hipotética RPC_0119</p> <p>Proteína hipotética Smed_3542</p> <p>COG3509: Poli(3-hidroxi- butirato) depolimerasa</p> <p>88</p> <p>769</p> <p>300</p> <p>ATG</p> <p>1</p> <p>259</p> <p>347</p> <p>854</p> <p>1623</p> <p>2768</p> <p>58</p> <p>145</p> <p>TGA</p> <p>199</p> <p>31</p> <p>ATG</p> <p>9</p> <p>334</p> <p>43</p> <p>3111</p> <p>β-glucuronidasa</p> <p><i>Nmr</i></p> <p>58</p>
<p>RH253 2871 pb</p>	<p>Proteína FixI <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. viciae 3841 (88%; +2) (761 aa)</p> <p>Proteína FixS <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. viciae 3841 (87%; +3, +1) (52 aa)</p> <p>Proteína externa putativa <i>Mesorhizobium loti</i> (72%; +1, +2, +3 +2) (230 aa)</p> <p>Probable proteína tiamina biosíntesis oxidoreductasa ThiO <i>Mesorhizobium loti</i> (73%; +2) (333 aa)</p>	<p>Proteína del proceso de fijación de nitrógeno</p> <p>Proteína del proceso de fijación de nitrógeno</p> <p>Proteína estructural de membrana sin caracterizar</p> <p>Metabolismo de pequeñas moléculas</p>	<p>GENE ID: 4403970 fixI</p> <p>GENE ID: 4398959 fixS</p> <p>GENE ID: 1229336 mll6127</p> <p>GENE ID: 1229051 mll5793</p>	<p>Fix I</p> <p>Fix S</p> <p>Proteína externa putativa</p> <p>ThiO</p> <p>182</p> <p>ATG</p> <p>1</p> <p>408</p> <p>75</p> <p>TGA</p> <p>ATG</p> <p>483</p> <p>601</p> <p>340</p> <p>TGA</p> <p>ATG</p> <p>941</p> <p>2163</p> <p>616</p> <p>751</p> <p>1</p> <p>46</p> <p>8</p> <p>230</p> <p>182</p> <p>ATG</p> <p>2527</p> <p>2871</p> <p>β-glucuronidasa</p> <p><i>Nmr</i></p> <p>1</p> <p>115</p> <p>616</p>

<p>RH256 1279 pb</p>	<p>HipA-like <i>Caulobacter</i> sp. K31 (73%; +2) (455 aa)</p>	<p>Proteína sin caracterizar</p>	<p>ref ZP_01417619.1 </p>	
<p>RH261 2193 pb</p>	<p>Proteína hipotética tiorf86 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (74%; -2) (154 aa)</p>	<p>Sin caracterizar</p>	<p>GENE ID: 1224079 tiorf86</p>	
	<p>Proteína hipotética pRL80101 <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. viciae 3841 (69%; +3) (58 aa)</p>	<p>Sin caracterizar</p>	<p>GENE ID: 4404540 pRL80101</p>	
	<p>Proteína hipotética RHE_PA00139 <i>Rhizobium etli</i> CFN 42 (75%; +2) (343 aa)</p>	<p>Sin caracterizar</p>	<p>GENE ID: 3894839 RHE_PA00139</p>	

	<p>Proteína hipotética RHE_PA00140 <i>Rhizobium etli</i> CFN 42 (85%; +2) (201aa)</p>	<p>Sin caracterizar</p>	<p>GENE ID: 3894840 RHE_PA00140</p>	
<p>RH269 5000 pb La secuencia no esta terminada, contamos con 822 pb</p>	<p>Proteína putativa aminoglicosido 3' fosfotransferasa <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021 (88%, +2); (261 aa)</p>	<p>Sin caracterizar</p>	<p>GENE ID: 1234683 SMc03094</p>	
	<p>Proteína putativa de resistencia a bleomicina <i>Rhizobium etli</i> CFN 42 (49, +1); (123 aa)</p>	<p>Sin caracterizar</p>	<p>GENE ID: 3891463 RHE_CH03261</p>	
	<p>Estreptomicina 3' cinasa putativa <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 3841 (67%, +3); (266 aa)</p>	<p>Sin caracterizar</p>	<p>GENE ID: 4400054 str</p>	

<p>RH289 969 pb</p>	<p>Proteína NodH <i>Rhizobium tropici</i> (69%; +1) (249 aa)</p>	<p>Factor de nodulación</p>	<p>emb CAA60912.1</p>	
<p>RH321 1333 pb</p>	<p>Proteína de recombinación putativa, trasposasa putativa. <i>Clostridium difficile</i> 630 (55%; -3) (540 aa)</p>	<p>Sin caracterizar</p>	<p>GENE ID: 4914901 CD1865</p>	
<p>RH340 3500 pb La secuencia no esta terminada, contamos con 866 pb</p>	<p>Proteína que intervienen en la biosíntesis de sulfolípidos <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021 (46%, +2); (308 aa)</p>	<p>Síntesis de sulfolípidos</p>	<p>GENE ID: 1234423 sqdC</p>	
	<p>Trasposasa putativa <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021 (75%; -2) (333 aa)</p>	<p>Elemento de transposición sin caracterizar</p>	<p>GENE ID: 1233252 SMc01195</p>	

<p>RH354 1192 pb</p>	<p>Tansposasa familia IS116/IS110/IS902 <i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1 (79%; -3) (344 aa)</p> <p>Elemento de transposición</p> <p>GENE ID: 5156088 BBta_5311</p>	
<p>RH361 1606 pb</p>	<p>Alcanosulfato monooxigenasa putativa <i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58 (83%; +3) (392 aa)</p> <p>Actividad oxidoreductasa sin caracterizar</p> <p>GENE ID: 1135300 Atu3426</p> <p>Proteína hipotética conservada Atu5518 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58 (67%; +3) (502 aa)</p> <p>Sin caracterizar</p> <p>GENE ID: 1137291 Atu5518</p>	
<p>RH370 1994 pb</p>	<p>Proteína putativa (AF322013) ID483 <i>Bradyrhizobium japonicum</i>, <i>Rhodobacter sphaeroides</i> ATCC 17029 (91%; -1) (251 aa)</p> <p>Sin caracterizar</p> <p>GENE ID: 4898490 Rsph17029_3384</p>	

	DEAD/DEAH box dominio helicasa <i>Rhodobacter sphaeroides</i> ATCC 17029 (96%; -1) (868 aa)	Replicación, reparación y recombinación del ADN	GENE ID: 4899176 Rsph17029_3383	
RH406 540 pb	Citócromo monooxigenasa P450 <i>Rhizobium etli</i> CFN 42 (71%; +1) (496 aa)	Biosíntesis de metabolitos secundarios, transporte y catabolismo	GENE ID: 1005095 RHE_PD00215	
	Proteína ferredoxina putativa <i>Rhizobium etli</i> CFN 42 (83; +2) (84 aa)	Sin caracterizar	GENE ID: 1005061 RHE_PD00214	
	Proteína hipotética msl0124 <i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099 (51%; +2)(67 aa)	Sin caracterizar	GENE ID: 1224652 msl0124	

Estructura hipotética de fusiones transcripcionales del pSym de *R. tropici*. Las líneas sólidas de colores representan los genes que conforman la fusión. Las líneas punteadas corresponden al gen silvestre donde ocurrió el evento de recombinación. Los números en negrilla representan la secuencia del ADN integrado. Los números debajo de la línea corresponden a aminoácidos de la proteína homóloga. ATG y TGA codones de inicio y de fin. □ Secuencia no terminada.

Resultados

Tabla 12. Genes de <i>R. tropici</i> que presentan expresión transcripcional en vida libre o en simbiosis.									
<i>Rhizobium tropici</i>	Expresión en fase logarítmica	Expresión en fase estacionaria	Expresión en vida libre	Expresión en simbiosis	Capacidad para fijar nitrógeno	Expresión del reportero en nodulación			Gen expresado
						10 dpi	15 dpi	21 dpi	
RH245	-	-	-	+	-	+	+	+	RNA polimerasa factor sigma (sigma-54)
RH246	-	-	-	+	+	-	+	+	Sin homología significativa
RH247	-	-	-	+	+	-	+	+	Sin homología significativa
RH253	-	-	-	+	+	+	+	+	Probable proteína ThiO oxidoreductasa
RH256	-	-	-	+	+	-	+	+	Sin homología significativa
RH257	-	+	+	-	+	-	-	-	Proteína de conjugación y transferencia TrbL
RH260	-	+	+	-	+	-	-	-	Proteína de conjugación y transferencia TraB
RH261	-	-	-	+	+	-	+	+	Proteína hipotética RHE_PA00140
RH269	-	-	-	+	+	-	+	+	Estreptomicina 3' cinasa putativa <i>Rhizobium nodHP</i>
RH289	-	-	-	+	+	-	-	+	Proteína de recombinación
RH321	-	-	-	+	+	-	-	+	RNA polimerasa
RH323	-	-	+	-	-	-	-	-	factor sigma
RH324	+	-	+	-	+	-	-	-	Proteína hipotética
RH325	-	-	+	-	+	-	-	-	<i>nodHP</i>
RH340	-	-	-	+	+	-	+	+	Transposasa
RH354	-	-	-	+	+	-	-	+	Transposasa
RH361	-	-	-	+	+	-	+	+	Proteína hipotética Atu5518
RH363	+	-	+	-	+	-	-	-	Proteína de secreción
RH370	-	-	-	+	+	-	+	+	Sin homología significativa
RH387	-	+	+	-	+	-	-	-	Proteína de conjugación I
RH404	-	+	+	-	+	-	-	-	DNA helicasa, putativa
RH406	-	-	-	+	+	-	+	+	Proteína hipotética msl0124

“-” Ausencia de la actividad de la enzima β -glucoronidasa. “+” Detección de la actividad del gen reportero.

Discusión y conclusiones.

El pSym de *R. tropici* contiene genes involucrados en rutas metabólicas tales como el ciclo de Krebs (Hernández-Lucas *et al.*, 1995). Este plásmido no se ha podido curar y pareciera ser un paquete genético indispensable para vida libre y simbiosis. En este trabajo se buscó identificar información genética novedosa involucrada en vida libre y simbiosis codificada en este replicón. Para abordar esto se construyó un banco de mutantes y fusiones transcripcionales al azar, las cuales fueron evaluadas en simbiosis y vida libre.

El uso de los plásmidos pBACA317 y pBACA303 permitió tener representado en su totalidad el plásmido simbiótico en nuestro banco de *E. coli* y a su vez la obtención de 136 transconjugantes de *Rhizobium tropici* CFN299 capaces de crecer en medio selectivo que representan ± 550 kb de las 600 kb que lo constituyen.

El análisis en vida libre reveló que la fusión RH363 (1732 pb) posee un gen que codifica para una proteína de secreción externa putativa cuya identidad es del 85%, presentando actividad transcripcional significativa en fase logarítmica. Durante el crecimiento bacteriano la expresión de proteínas de secreción tienen un papel importante, tal es el caso de los sistemas de transporte que mantienen las condiciones omeostáticas óptimas en la bacteria. O los sistemas de transporte tipo I y/o III que intervienen en la secreción de los factores de nodulación.

En el caso de las fusiones RH257 (3117 pb), RH260 (3821 pb), RH387 (1419 pb) presentan genes de conjugación y transferencia. En ambientes naturales, la transferencia de información genética no solo se da entre microorganismos de la misma especie o género si no también entre familias e incluso reinos, tal es el caso entre *A. tumefaciens* y su hospedero en donde la bacteria transmite el plásmido Ti a la planta (Gelvin, 2000). Sullivan *et al.*, (1995) demostraron la transferencia lateral de una isla simbiótica de 105 kb de *M. loti* hacia bacterias no simbióticas del suelo, estos hallazgos sugieren que la diversidad que se da en las poblaciones de cepas nodulantes de *M. loti* surge por transferencia lateral de genes simbióticos del cromosoma a partir de bacterias rhizobia simbióticas hacia bacterias de rhizobia no simbióticas en el campo. En el caso de la transferencia del pSym de *R. tropici* a *Ensifer adherens* (actualmente conocido como

Sinorhizobium adherens) esta bacteria adquirió las mismas características de simbionte mutualista con una fijación biológica de nitrógeno baja con respecto a *R. tropici* (Rogel *et al.*, 2001) además de que si el pSym es transferido a patógenos como *Brucella melitensis* esta bacteria es capaz de inducir esporádicamente pseudonódulos incapaces de fijar nitrógeno. En el caso de la fusión RH404 (1908 pb) presenta homología con una helicasa, estas construcciones se expresan preferencialmente en fase estacionaria.

El análisis en simbiosis reveló que de 136 clonas evaluadas solo 14 presentan actividad de la enzima β -glucoronidasa en nódulos, los elementos genéticos que se expresan en la interacción con la planta a los 10, 15 y 21 dpi corresponden a factor sigma⁵⁴ (RH245 de 336 pb) que es un factor de regulación y un *thiO* (RH253 de 3871 pb) que interviene en el metabolismo de aminoácidos.

En nódulos de 15 y 21 dpi se detectó la expresión de promotores putativos (RH246 de 3015 pb; RH247 de 3111 pb; RH256 de 1279; RH340 de 3500 pb). En la clona RH261 (2193 pb) se reconoció la presencia de una proteína hipotética; en el caso de la clona RH269 (5000) se identificó una estreptomicina 3' cinasa putativa, que en *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae* 3841 tiene un papel de mecanismo de defensa al medio.

La clona RH361 (1606 pb) presenta transcripción de una proteína hipotética conservada en *Agrobacterium tumefaciens* Atu5518, En la clona RH370 (1994 pb) se detectó expresión de un gen con un dominio de una helicasa de *Rhodobacter* que participa en los procesos de replicación, transcripción, recombinación y reparación del ADN, y de biogénesis de ribosomas. Por último en la clona RH406 (540 pb) se identificó la transcripción de una proteína hipotética msl0124.

En nódulos de 21 dpi se detectó la expresión de NodP (RH289 de 969 pb) proteína que interviene en la sulfatación del factor de nodulación dándole entre otras cosas la especificidad para su hospedero. En las clonas RH321 y RH354 (de 1333 pb y 1192 pb respectivamente) se determinó la presencia de promotores hipotéticos, identificados por la detección de la transcripción del gen reportero.

Las regiones colindantes al reportero en las clonas RH246 (3015 pb), RH247 (3111 pb) y RH256 (1279 pb) corresponden a regiones intergénicas indicando la presencia de

posibles promotores. En el caso de RH321, RH340, RH354 las regiones aledañas al reportero no codifican para algún gen conocido en la hebra líder, sin embargo en la hebra complementaria encontramos que las 3 clonas presentan homología significativa con transposasas. En bacterias del género *Rhizobium* poco se conoce sobre promotores y regulación en general de elementos móviles. Sin embargo, existen reportes los cuales demuestran que algunos elementos móviles poseen en ambas hebras genes involucrados en la regulación de las IS (Deng *et al.*, 1995). Queda por demostrar mediante experimentos de inicio de transcripción la presencia de los promotores expresados en vida libre y simbiosis reportados en este trabajo. Nuestros resultados muestran que dos clonas RH245, y RH323 presenta un fenotipo Fix⁻, en ambos casos nosotros detectamos que los genes involucrados corresponden a un factor sigma⁵⁴, esto correlaciona perfectamente con previos datos (Kullik *et al.*, 1991; Michiels *et al.*, 1998) los cuales se reporta que mutantes en estos genes son incapaces de fijar nitrógeno, sin embargo otros loci involucrados en nodulación y fijación de nitrógeno no fueron detectados en nuestro estudio, tampoco logramos identificar genes regulados en presencia de exudados de frijol y leucaena.

En este trabajo se identificaron nuevos genes que se expresan en diferentes estadios del proceso simbiótico, la expresión de estos elementos es transitoria, expresándose en tiempos específicos, lo cual demuestra que la simbiosis constituye un mosaico de expresiones genéticas a diferentes niveles, este es el primer resultado experimental de un posible papel biológico de la información genética del pSym de *R. tropici*.

Un aspecto relevante de esta investigación es que con las clonas obtenidas se puede evaluar el efecto en diferentes leguminosas con las cuales establece relación simbiótica *R. tropici*. En ese sentido con el banco generado en pVO155 se puede secuenciar completamente el pSym. En relación a este punto cabe señalar que las clonas de 550 kb y 390 kb fueron secuenciadas parcialmente, los datos obtenidos revelan que el pSym posee genes involucrados en metabolismo primario, fijación de nitrógeno, transporte, transcripción, recombinación, replicación, quimiotaxis, nodulación y secreción así como genes que codifican para genes putativos y desconocidas.

Consideramos que la metodología empleada en el presente estudio puede ser utilizada para identificar genes esenciales en *Rhizobium* u otras bacterias. El uso de otras

estrategias como mutagénesis con transposones, deleciones nos pueden ayudar a obtener más información sobre el papel de la información genética del pSym. El esforzarse por conocer la información de los plásmidos de *Rhizobium* nos ayudará a entender los mecanismos generales de expresión de los plásmidos en bacterias, así como identificar genes que actúan de acuerdo a la planta hospedera, en competitividad, en el desarrollo del bacteroide, así como genes involucrados en sustentar los diferentes requerimientos nutricionales a lo largo del proceso simbiótico. El estudiar el pSym de *R. tropici* también puede ayudarnos a elucidar porque *R. tropici* nodula un gran número de leguminosas. En general el trabajo de *R. tropici* ayudará a entender los mecanismos que utiliza esta bacteria para poder establecer relaciones simbióticas exitosas en suelos cuyo pH sea <5.0 , presenten toxicidad por aluminio, bajo contenido de fósforo, insuficiente agua y altas temperaturas. Finalmente todo esto contribuirá a entender de una forma mas completa la simbiosis, por lo tanto este proceso se podría modificar de una forma más certera y contribuir en la agricultura sostenible.

Discusión y conclusiones.

El pSym de *R. tropici* contiene genes involucrados en rutas metabólicas tales como el ciclo de Krebs (Hernández-Lucas *et al.*, 1995). Este plásmido no se ha podido curar y pareciera ser un paquete genético indispensable para vida libre y simbiosis. En este trabajo se buscó identificar información genética novedosa involucrada en vida libre y simbiosis codificada en este replicón. Para abordar esto se construyó un banco de mutantes y fusiones transcripcionales al azar, las cuales fueron evaluadas en simbiosis y vida libre.

El uso de los plásmidos pBACA317 y pBACA303 permitió tener representado en su totalidad el plásmido simbiótico en nuestro banco de *E. coli* y a su vez la obtención de 136 transconjugantes de *Rhizobium tropici* CFN299 capaces de crecer en medio selectivo que representan ± 550 kb de las 600 kb que lo constituyen.

El análisis en vida libre reveló que la fusión RH363 (1732 pb) posee un gen que codifica para una proteína de secreción externa putativa cuya identidad es del 85%, presentando actividad transcripcional significativa en fase logarítmica. Durante el crecimiento bacteriano la expresión de proteínas de secreción tienen un papel importante, tal es el caso de los sistemas de transporte que mantienen las condiciones omeostáticas óptimas en la bacteria. O los sistemas de transporte tipo I y/o III que intervienen en la secreción de los factores de nodulación.

En el caso de las fusiones RH257 (3117 pb), RH260 (3821 pb), RH387 (1419 pb) presentan genes de conjugación y transferencia. En ambientes naturales, la transferencia de información genética no solo se da entre microorganismos de la misma especie o género si no también entre familias e incluso reinos, tal es el caso entre *A. tumefaciens* y su hospedero en donde la bacteria transmite el plásmido Ti a la planta (Gelvin, 2000). Sullivan *et al.*, (1995) demostraron la transferencia lateral de una isla simbiótica de 105 kb de *M. loti* hacia bacterias no simbióticas del suelo, estos hallazgos sugieren que la diversidad que se da en las poblaciones de cepas nodulantes de *M. loti* surge por transferencia lateral de genes simbióticos del cromosoma a partir de bacterias rhizobia simbióticas hacia bacterias de rhizobia no simbióticas en el campo. En el caso de la transferencia del pSym de *R. tropici* a *Ensifer adherens* (actualmente conocido como

Sinorhizobium adherens) esta bacteria adquirió las mismas características de simbionte mutualista con una fijación biológica de nitrógeno baja con respecto a *R. tropici* (Rogel *et al.*, 2001) además de que si el pSym es transferido a patógenos como *Brucella melitensis* esta bacteria es capaz de inducir esporádicamente pseudonódulos incapaces de fijar nitrógeno. En el caso de la fusión RH404 (1908 pb) presenta homología con una helicasa, estas construcciones se expresan preferencialmente en fase estacionaria.

El análisis en simbiosis reveló que de 136 clonas evaluadas solo 14 presentan actividad de la enzima β -glucoronidasa en nódulos, los elementos genéticos que se expresan en la interacción con la planta a los 10, 15 y 21 dpi corresponden a factor sigma⁵⁴ (RH245 de 336 pb) que es un factor de regulación y un *thiO* (RH253 de 3871 pb) que interviene en el metabolismo de aminoácidos.

En nódulos de 15 y 21 dpi se detectó la expresión de promotores putativos (RH246 de 3015 pb; RH247 de 3111 pb; RH256 de 1279; RH340 de 3500 pb). En la clona RH261 (2193 pb) se reconoció la presencia de una proteína hipotética; en el caso de la clona RH269 (5000) se identificó una estreptomicina 3' cinasa putativa, que en *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae* 3841 tiene un papel de mecanismo de defensa al medio.

La clona RH361 (1606 pb) presenta transcripción de una proteína hipotética conservada en *Agrobacterium tumefaciens* Atu5518, En la clona RH370 (1994 pb) se detectó expresión de un gen con un dominio de una helicasa de *Rhodobacter* que participa en los procesos de replicación, transcripción, recombinación y reparación del ADN, y de biogénesis de ribosomas. Por último en la clona RH406 (540 pb) se identificó la transcripción de una proteína hipotética msl0124.

En nódulos de 21 dpi se detectó la expresión de NodP (RH289 de 969 pb) proteína que interviene en la sulfatación del factor de nodulación dándole entre otras cosas la especificidad para su hospedero. En las clonas RH321 y RH354 (de 1333 pb y 1192 pb respectivamente) se determinó la presencia de promotores hipotéticos, identificados por la detección de la transcripción del gen reportero.

Las regiones colindantes al reportero en las clonas RH246 (3015 pb), RH247 (3111 pb) y RH256 (1279 pb) corresponden a regiones intergénicas indicando la presencia de

posibles promotores. En el caso de RH321, RH340, RH354 las regiones aledañas al reportero no codifican para algún gen conocido en la hebra líder, sin embargo en la hebra complementaria encontramos que las 3 clonas presentan homología significativa con transposasas. En bacterias del género *Rhizobium* poco se conoce sobre promotores y regulación en general de elementos móviles. Sin embargo, existen reportes los cuales demuestran que algunos elementos móviles poseen en ambas hebras genes involucrados en la regulación de las IS (Deng *et al.*, 1995). Queda por demostrar mediante experimentos de inicio de transcripción la presencia de los promotores expresados en vida libre y simbiosis reportados en este trabajo. Nuestros resultados muestran que dos clonas RH245, y RH323 presenta un fenotipo Fix⁻, en ambos casos nosotros detectamos que los genes involucrados corresponden a un factor sigma⁵⁴, esto correlaciona perfectamente con previos datos (Kullik *et al.*, 1991; Michiels *et al.*, 1998) los cuales se reporta que mutantes en estos genes son incapaces de fijar nitrógeno, sin embargo otros loci involucrados en nodulación y fijación de nitrógeno no fueron detectados en nuestro estudio, tampoco logramos identificar genes regulados en presencia de exudados de frijol y leucaena.

En este trabajo se identificaron nuevos genes que se expresan en diferentes estadios del proceso simbiótico, la expresión de estos elementos es transitoria, expresándose en tiempos específicos, lo cual demuestra que la simbiosis constituye un mosaico de expresiones genéticas a diferentes niveles, este es el primer resultado experimental de un posible papel biológico de la información genética del pSym de *R. tropici*.

Un aspecto relevante de esta investigación es que con las clonas obtenidas se puede evaluar el efecto en diferentes leguminosas con las cuales establece relación simbiótica *R. tropici*. En ese sentido con el banco generado en pVO155 se puede secuenciar completamente el pSym. En relación a este punto cabe señalar que las clonas de 550 kb y 390 kb fueron secuenciadas parcialmente, los datos obtenidos revelan que el pSym posee genes involucrados en metabolismo primario, fijación de nitrógeno, transporte, transcripción, recombinación, replicación, quimiotaxis, nodulación y secreción así como genes que codifican para genes putativos y desconocidas.

Consideramos que la metodología empleada en el presente estudio puede ser utilizada para identificar genes esenciales en *Rhizobium* u otras bacterias. El uso de otras

estrategias como mutagénesis con transposones, deleciones nos pueden ayudar a obtener más información sobre el papel de la información genética del pSym. El esforzarse por conocer la información de los plásmidos de *Rhizobium* nos ayudará a entender los mecanismos generales de expresión de los plásmidos en bacterias, así como identificar genes que actúan de acuerdo a la planta hospedera, en competitividad, en el desarrollo del bacteroide, así como genes involucrados en sustentar los diferentes requerimientos nutricionales a lo largo del proceso simbiótico. El estudiar el pSym de *R. tropici* también puede ayudarnos a elucidar porque *R. tropici* nodula un gran número de leguminosas. En general el trabajo de *R. tropici* ayudará a entender los mecanismos que utiliza esta bacteria para poder establecer relaciones simbióticas exitosas en suelos cuyo pH sea <5.0 , presenten toxicidad por aluminio, bajo contenido de fósforo, insuficiente agua y altas temperaturas. Finalmente todo esto contribuirá a entender de una forma mas completa la simbiosis, por lo tanto este proceso se podría modificar de una forma más certera y contribuir en la agricultura sostenible.

Bibliografía.

- Acosta-Duran C and Martínez-Romero E. 2002. Diversity of rhizobia from nodules of the leguminous tree *Gliricidia sepium*, a natural host of *Rhizobium tropici*. *Arch Microbiol.* 178, 161-164.
- Ashraf S I, Kelly M T, Wang Y and Hoover T. 1997. Genetic Analysis of the *Rhizobium meliloti nifH* Promoter Using the P22 Challenge Phage System. *J Bac.* 179,2356–2362.
- Bladergro M R and Spaink H P. 1998. Genes and signal molecules involved in the rhizobia-leguminosae symbiosis. *Curr Opin Plant Biol.* 1, 353-9.
- Brewin J N. 1991 Development of legume root nodule. *Annu Rev Cell Biology.* 7, 191-226.
- Broughton W J and Perret X. 1999. Genealogy of legume-*Rhizobium* symbioses. *Curr Opin Plant Biol.* 2, 305-311.
- Broughton W J, Jabboury S and Perret X. 2000. Keys to symbiotic harmony. *J Bac.* 182, 5641-5652.
- Burris R H. 1972. Nitrogen fixation assay-methods and techniques. *Methods Enzymol.* 24, 415–431.
- Cardenas L, Feijo J A, Kunkel J G, Sanchez F, Holdaway-Clarke T, Hepler P K, and Quinto C. 1999. *Rhizobium* nod factors induce increases in intracellular free calcium and extracellular calcium influxes in bean root hairs. *Plant physiol.* 19, 347-52.
- Cevallos M, Encarnación S, Leija A, Mora Y and Mora J. 1996. Genetic and physiological characterization of a *Rhizobium etli* mutant strain unable to synthesize Poly- β -Hydroxybutyrate. *J Bac.* 178, 1646–1654.
- Corvera A, Prome D, Prome J C, Martínez-Romero E and Romero D. 1999. The *nolL* gene from *Rhizobium etli* determines nodulation efficiency by mediating the acetylation of the fucosyl residue in the nodulation factor. *Mol Plant Microbe Interact.* 12, 236-246.
- Deng W, Gordon M and Nester E. 1995. Sequence and distribution of IS1312: evidence for horizontal DNA transfer from *Rhizobium meliloti* to *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bac.* 177, 2554-2559.
- Dowie J A. 2005. Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. *Curr Biol.* 15, 196-198.
- Downie J A. 1998 Functions of Rhizobial nodulation genes, pp. 387-399. In Spaink H P, Kondorosi A and Hooykaas P J J (Eds). *The Rhizobiaceae*, Kluwer Academic Publishers.
- Eckhardt T. 1978. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid.* 1, 584-588.
- Ehrhardt D W, Atkinson E M and Long S R. 1992 Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science.* 256, 998-1000.
- Fahraeus, G. 1957. The infection of clover root by nodule bacteria studied by a single glass slide technique. *J Gen Micro.* 16, 374-338.

- Felle H H, Kondorosi E, Kondorosi A and Schultze M. 1999 Elevation of the cytosolic free $[Ca^{2+}]$ is indispensable for the transduction of the Nod factor signal in alfalfa. *Plant Physiol.* 121, 273-280.
- Finan T M, Weidner S, Wong K, Buhrmester J, Chain P, Vorholter F J, Hernandez-Lucas I, Becker A, Cowie A, Gouzy J, Golding B and Puhler A. 2001. The complete sequence of the 1,683-kb pSymb megaplasmid from the N₂-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 9889-9894.
- Folch-Mallol J L, Manyani H, Marroqui S, Sousa C, Vargas C, Nava N, Colmenero-Flores J M, Quinto C and Megias M. 1998. Sulfation of nod factors via *nodHPQ* is *nodD* independent in *Rhizobium tropici* CIAT899. *Mol Plant Microbe Interact.* 11, 979-987.
- Gage D. 2004. Infection and invasion of root by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Micro Mol Biol Rev* 68, 280-300.
- Galibert F, Finan T M, Long S R, Puhler A, Abola P, Ampe F, Barloy-Hubler F, Barnett M J, Becker A, Boistard P, Bothe G, Boutry M, Bowser L, Buhrmester J, Cadieu E, Capela D, Chain P, Cowie A, Davis R W, Dreano S, Federspiel N A, Fisher R F, Gloux S, Godrie T, Goffeau A, Golding B, Gouzy J, Gurjal M, Hernandez-Lucas I, Hong A, Huizar L, Hyman R W, Jones T, Kahn D, Kahn M L, Kalman S, Keating D H, Kiss E, Komp C, Lelaure V, Masuy D, Palm C, Peck M C, Pohl T M, Portetelle D, Purnelle B, Ramsperger U, Surzycki R, Thebault P, Vandenbol M, Vorholter F J, Weidner S, Wells D H, Wong K, Yeh K C and Batut J. 2001. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science.* 293, 668-672.
- Gebauer B and Jendrossek D, 2006. Assay of poly(3-Hydroxybutyrate) depolymerase activity and product determination. *App Env Micro.* 72, 6094–6100.
- Gelvin S. 2000. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 51:235-240.
- Geniaux E, Flores M, Palacios R and Martínez E. 1995. Presence of megaplasmids in *Rhizobium tropici* and further evidence of differences between the two *R. tropici* subtypes. *Int. J. Syst. Bac.* 45, 417–426.
- González V, Santamaría R, Bustos P, Hernández-González I, Medrano-Soto A, Moreno-Hagelsieb G, Janga S, Ramírez M, Jiménez-Jacinto V, Collado-Vides J, and Dávila G. 2006. The partitioned *Rhizobium etli* genome: Genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 3834-3839.
- Gottfert M, Rothlisberger S, Kuding C, Beck C, Marty R and Hennecke H. 2001. Potential symbiosis specific genes uncovered by sequencing a 410-kilobases DNA region of the *Bradyrhizobium japonicum* chromosome. *J Bac.* 183, 1405-1412.
- Guo X W, Zhang X X, Zhang Z M and Li F D. 1999. Characterization of *Astragalus sinicus* rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and nodulation gene regions. *Curr Microbiol.* 39, 358-364.
- Hernández-Lucas I, Mavingui P, Finan T, Chain P, and Martínez-Romero E. 2002. *In vivo* cloning strategy for *Rhizobium* plasmids. *BioTechniques.* 33, 1-4.
- Hernandez-Lucas I, Pardo M A, Segovia L, Miranda J and Martinez-Romero E. 1995 *Rhizobium tropici* chromosomal citrate synthase gene. *Appl Environ Microbiol.* 61, 3992-3997.

- Hernandez-Lucas I, Segovia L, Martínez-Romero E and Pueppke S G. 1995. Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. *Appl Environ Microbiol.* 61, 2775-2779.
- Hungria M, Andrade D, Chueire L M, Probanza A, Gutierrez-Mañero F and Megías M. 2000. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biol & Bioch.* 32, 1515-1528.
- Ibraim R. 2001. Flavonoids. *ELS* in Jhon Wiley & sons, Ltd. www.els.net.
- Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Asamizu E, Kato T, Sasamoto S, Watanabe A, Idesawa K, Ishikawa A, Kawashima K, Kimura T, Kishida Y, Kiyokawa C, Kohara M, Matsumoto M, Matsuno A, Mochizuki Y, Nakayama S, Nakazaki N, Shimpo S, Sugimoto M, Takeuchi C, Yamada M and Tabata S., 2000, Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.* 31, 381-406.
- Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Minamisawa K, Uchiumi T, Sasamoto S, Watanabe A, Idesawa K, Iriguchi M, Kawashima K, Kohara M, Matsumoto M, Shimpo S, Tsuruoka H, Wada T, Yamada M and Tabata S. 2002. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res.* 31, 189-197.
- Kullik I, Fritsche S, Knobel H, Sanjuan J, Hennecke H and Fischer HM. 1991 *Bradyrhizobium japonicum* has two differentially regulated, functional homologs of the sigma 54 gene (rpoN). *J Bac.* 173, 1125-1138.
- Labes M and Finan T M. 1993. Negative regulation of sigma 54-dependent dctA expression by the transcriptional activator DctD. *J Bac.* 175, 2674-2681.
- de Lajudie P, Willems A, Nick G, Moreira F, Molouba F, Hoste B, Torck U, Neyra M, Collins M D, Lindstrom K, Dreyfus B and Gillis M. 1998. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. *Int J Syst Bac.* 48, 369-382.
- Lewin A, Rosenberg C, Meyer H, Wong C-H, Nelson J, Manen F, Stanley J, Dowling J, Dénarié J and Broughton. 1987. Multiple host-specificity loci of the broad host range *Rhizobium* sp. NGR234 selected using the widely compatible legume *Vigna unguiculata*. *Plant Mol Biol.* 8, 447-459.
- Luyten E, Swinnen E, Vlassak K, Verreth C, Dombrecht B and Vanderleyden J. 2001. Analysis of a symbiosis-specific cytochrome P450 homolog in *Rhizobium* sp. BR816. *Mol Plant Microbe Interact.* 14, 918-924.
- Martínez-Romero E, Palacios R and Sánchez F. 1987. Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. *J Bac.* 169, 2828-2834.
- Martínez-Romero E, Romero D and Palacios R. 1990. The *Rhizobium* genome. *Crit. Rev Plant Sci.* 9, 59-63.
- Martínez-Romero E and Rosenblueth M. 1990. Increased Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Nodulation competitiveness of genetically modified *Rhizobium* strains. *Appl Environ Microbiol.* 56, 2384-2388.
- Martínez-Romero E, Segovia L, Mercante F, Franco A, Graham P and Pardo M. 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp trees. *Int. J. Syst. Bac.* 41, 417-426.

- Mavingui P, Flores M, Romero D, Martinez-Romero E and Palacios R. 1997. Generation of *Rhizobium* strains with improved symbiotic properties by random DNA amplification (RDA). *Nat Biotech.* 15, 564-569.
- Mesa S, Ucurum Z, Hennecke H and Fischer H-M. 2005. Transcription activation *In Vitro* by the *Bradyrhizobium japonicum* regulatory protein FixK₂. *J Bac.* 187, 3329–3338.
- Michielis J, Dombrech B, Vermeiren N, Xi C W, Luyten E and Vanderleyden J. 1998. *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. *FEMS Microbiol Ecol.* 26, 193-205.
- Michiels J, Moris M, Dombrecht B, Verreth C and Vanderleyden J. 1998. Differential regulation of *Rhizobium etli* rpoN2 gene expression during symbiosis and free-living growth. *J Bac.* 180, 3620-3628.
- Minamisawa K Isawa T, Nakatsuka Y and Ichikawa N. 1998. New *Bradyrhizobium japonicum* strains that possess high copy numbers of the repeated sequence RS alpha. *Appl Environ Microbiol.* 64, 1845-1851.
- Moreira F, Auca K and Young J. 1998. Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brazil. *Mol Ecol.* 7, 889-895.
- Morett E and Buck M. 1989. *In vivo* studies on the interaction of RNA polymerase-sigma 54 with the *Klebsiella pneumoniae* and *Rhizobium meliloti* nifH promoters. The role of NifA in the formation of an open promoter complex. *J Mol Biol.* 5, 65-77.
- Morett E, Fischer H M and Hennecke H. 1991 Influence of oxygen on DNA binding, positive control, and stability of the *Bradyrhizobium japonicum* NifA regulatory protein. *J Bac.* 173, 3478-3487.
- Mostasso L, Mostasso F, Días B, Vargas M and Hungria M. 2002. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. *Field Crops Res.* 73, 121-132.
- Mylona P, Pawlowski K and Bisseling T. 1995 Symbiotic Nitrogen Fixation. *Plant Cell.* 7, 869-885.
- Nuswantara S, Fujie M, Yamada T, Malek W, Inaba M, Kaneko Y and Murooka Y. 1999. Phylogenetic position of *Mesorhizobium huakuii* subsp. reingei, a symbiont of *Astragalus sinicus* cv. Japan. *J Biosci Bioeng.* 87, 49-55.
- Oke V and Long S R. 1999. Bacterial genes induced within the nodule during the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Mol Microbiol.* 32, 837-849.
- Peralta H, Mora Y, Salazar E, Encarnacion S, Palacios R and Mora J. 2004. Engineering the nifH promoter region and abolishing poly-beta-hydroxybutyrate accumulation in *Rhizobium etli* enhance nitrogen fixation in symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *Appl Environ Microbiol.* 70, 3272-3281.
- Perret X, Freiberg C, Rosenthal A, Broughton W J and Fellay R. 1999. High resolution transcriptional analysis of the symbiotic plasmid of *Rhizobium* sp. NGR234. *Mol Microbiol.* 32, 415-425.
- Perret X, Staehlin C, William C and Broughton J. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62, 181-201.
- Pingret J L, Journet E P and Barker D G. 1998. *Rhizobium* Nod factor signaling. evidence for a G protein-mediated transduction mechanism. *Plant Cel.*10, 659-672.

- Preisig O, Zufferey R and Hennecke H. 1996. The *Bradyrhizobium japonicum* *fixGHIS* genes are required for the formation of the high-affinity *cbb₃*-type cytochrome oxidase. *Arch Microbiol.* 165, 297-305.
- Pueppke S G and Broughton W J. 1999. *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Mol Plant Microbe Interact.* 12, 293-318.
- Ramirez-Trujillo J A, Encarnación S, Salazar E, de los Santos A G, Dunn M F, Emerich D W, Calva E and Hernández-Lucas I. 2007. Functional characterization of *Sinorhizobium meliloti* acetate metabolism genes *aceA*, *SMc00767* and *glcB*. *J. Bac.* 189, 5875-5884.
- Raymond J, Siefert J L, Staples C R and Blakenship R E. 2004. The natural history of nitrogen fixation. *Mol. Biol. Evol.* 21, 5341-5354.
- Recourt K, van Tunen A J, Mur L A, van Brussel A A, Lugtenberg B J and Kijne J W. Activation of flavonoid biosynthesis in roots of *Vicia sativa* subsp. *nigra* plants by inoculation with *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Plant Mol Biol.* 9, 411-420.
- Relic B, Talmont F, Kopcinska J, Golinowsky W, Promé J C and Broughton W. 1993. Biological activity of *Rhizobium* sp. NGR234 Nod-factors on *Macroptilium atropurpureum*. *Mol Plant Microbe Interact.* 6, 764-774.
- Riely B K, Ane J M, Penmetsa R V and Cook D R. 2004. Genetic and genomic analyses in model legumes bring Nod-factor signaling to center stage. *Curr Opin Plant Biol.* 7, 408-413.
- Rogel M A, Hernández-Lucas I, Kuykendall L D, Balkwill D L and Martínez-Romero E. 2001. Nitrogen-fixing nodules with *Ensifer adhaerens* harboring *Rhizobium tropici* symbiotic plasmids. *Appl Environ Microbiol.* 67, 3264-3268.
- Rosenblueth M, Hynes M F and Martínez-Romero E. 1998. *Rhizobium tropici* *teu* genes involved in specific uptake of *Phaseolus vulgaris* bean-exudate compounds. *Mol Gen Genet.* 258, 587-598.
- Saad M M, Kobayashi H, Marie C, Brown I R, Mansfield J W, Broughton W J and Deakin W J. 2005. NopB, a type III secreted protein of *Rhizobium* sp. strain NGR234, is associated with pilus-like surface appendages. *J Bac.* 187, 1173-1181.
- Schell M A. 1993. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol.* 47, 597-626.
- Schmidt P, Broughton W and Werner D. 1994. Nod factors of *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium* sp. NGR234 induce flavonoid accumulation in soybean root exudate. *Mol Plant-Microbe Interact.* 7, 384-390.
- Schultze M and Kondorosi A. 1998. Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu Rev Genet.* 32, 33-57.
- Sessitsch A, Howieson J, Perret H, Antoun H and Martínez-Romero E. 2002. Advances in *Rhizobium* research. *Crit Rev Plant Sci.* 21, 323-378.
- Southern, E M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J Mol Biol.* 98, 503-517
- Spaink H P, Kondorosi A and Hooykaas P J J (Eds). 1998. *The Rhizobiaceae*, Kluwer Academic Publishers.
- Spaink H. 2000. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Ann Rev Micro.* 54, 257-288.

- Stam H, van Verseveld H W, de Vries W and Stouhamer AH (1986) Utilization of poly-3-hydroxybutyrate in free-living cultures of *Rhizobium* ORS571. *FEMS Microbiol Lett.* 35, 215–220
- Sullivan J T and Ronson C W. 1998. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 28, 5145-5149.
- Sullivan J T and Ronson C W. 1998. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 21, 9059.
- Sullivan J T, Patrick H N, Lowther W L, Scott D B and Ronson C W. 1995 Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 12, 8985-9.
- Swanson J A, Mulligan J and Sharon-Long 1993. Regulation of *syrM* and *nodD3* in *Rhizobium meliloti*. *Genetics.* 134, 435-439.
- Tombolini R and Nuti M P. 1989. Poly (b-hydroxyalkanoate) biosynthesis and accumulation by different *Rhizobium* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 60, 299-304.
- Verghese S and Misra A K. 2002. *Frankia*–actinorhizal symbiosis with special reference to host–microsymbiont relationship. *Current Sci.* 83, 404-408.
- Wang E T, Tan Z Y, Willems A, Fernández-López M, Reinhold-Hurek B, and Martínez-Romero E. 2002. *Sinorhizobium morelense* sp. nov., a *Leucaena leucocephala*-associated bacterium that is highly resistant to multiple antibiotics. *Int J Syst Evol Microbiol.* 52, 1687-1693.
- Waters J K, Hughes B L 2nd, Purcell L C, Gerhardt K O, Mawhinney T P and Emerich D W. 1998. Alanine, not ammonia, is excreted from N₂-fixing soybean nodule bacteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 12038-12042.
- Wong P P and Evans H J. 1971. Poly-b-hydroxybutyrate utilization by soybean (*Glycine max* Merr.) nodules and assessment of its role in maintenance of nitrogenase activity. *Plant Physiol.* 47, 750-755.
- Yang W C, de Blank C, Meskiene I, Hirt H, Bakker J, van Kammen A, Franssen H and Bisseling T. 1994. *Rhizobium* nod factors reactivate the cell cycle during infection and nodule primordium formation, but the cycle is only completed in primordium formation. *Plant Cell.* 6, 1415-1426.
- Yeh K C, Peck M C and Long S R. 2002. Luteolin and GroESL modulate in vitro activity of NodD. *J Bac.* 184, 525-530.