

03081  
16  
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Unidad Académica de los Ciclos Profesionales y de Posgrado del  
Colegio de Ciencias y Humanidades.

Sede: Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno.

CARACTERIZACION GENETICA Y MOLECULAR DE LOS GENES ESENCIALES  
PARA NODULACION DE Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli EN LAS  
RAICES DE Phaseolus vulgaris.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN INVESTIGACION  
BIOMEDICA BASICA PRESENTA

Martha Verónica Vázquez Laslop

Cuernavaca, Morelos.

Enero de 1991.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## AGRADECIMIENTOS

A Carmen y a Federico por su apoyo profesional y por la amistad que me han brindado.

A Alejandra, Mario, Alejandro, Zuro, Pati e Irene, mis hermanos.

A todos mis amigos cefinitas y ceingebitas.

A Esperanza Martínez, maestra y amiga.

A Alejandro de las Peñas y a Olivia Santana, compañeros de trabajo y amigos.

A los miembros del Comité Asesor y del Jurado de este trabajo: M. en IBB Carmen Quinto, Dra. Alejandra Covarrubias, Dr. Rafael Palacios, Dra. Esperanza Martínez-Romero, Dr. Federico Sánchez, Dr. Fernando Bastarrachea, Dr. Xavier Soberón, Dr. Luis Servín y Dr. Mario Rocha, por los consejos e ideas para la realización de este trabajo y por el tiempo invertido en el seguimiento del mismo.

A todos los que me ayudaron en el camino.

## **El Descubrimiento de la Fijación de Nitrógeno.**

La presencia de nódulos en las raíces de plantas de la familia de las leguminosas, ha atraído el interés de los científicos desde la Edad Media. Después de la introducción en Biología del término "simbiosis" por DeBary en 1878, Schindler (1884) fué el primero en describir a los nódulos de la raíz como el resultado de una simbiosis entre plantas y bacterias. A principios del siglo XIX existía la creencia de que las plantas tomaban el carbón de la atmósfera y el resto de los elementos esenciales, incluido el nitrógeno, de sales del suelo. En 1886 Hellriegel y Wilfarth descubren que las plantas leguminosas y no otras, pueden utilizar el nitrógeno atmosférico y que esta capacidad está asociada a la presencia de los nódulos en las raíces (revisado en Quispel, 1988). Más tarde, se demuestra que los nódulos son formados por bacterias del suelo que dentro de estas estructuras son capaces de reducir el nitrógeno atmosférico en amonio que es utilizado por la planta. A este proceso se le conoce como fijación simbiótica de nitrógeno.

A partir de entonces, este tema despertó gran interés científico y económico, ya que se demostró que algunos cultivos producían un mejor rendimiento cuando eran inoculados con cepas de estos microorganismos. Desde entonces, algunos grupos de investigación centraron sus objetivos en encontrar las mejores cepas para ser utilizadas como inoculantes. Otros grupos se

dedicaron a investigar las condiciones y el sistema por los cuales estas bacterias son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico. Después de más de 100 años del inicio del estudio de la simbiosis entre Rhizobium y las plantas de la familia de las leguminosas, se han contestado muchas preguntas pero se han generado otras tantas.

En la Introducción de esta tesis se tocarán los aspectos que por el momento creemos que son importantes para las primeras etapas del desarrollo de un nódulo, desde que la bacteria se encuentra en la rizósfera hasta que ésta penetra a las células de la raíz, que es el lugar donde posteriormente se llevará a cabo la fijación de nitrógeno atmosférico.

## Clasificación de los Organismos Simbiontes.

Todas las especies conocidas que fijan nitrógeno en vida libre y en simbiosis, han sido clasificadas en diferentes grupos taxonómicos procariotes que incluyen bacterias Gram<sup>-</sup> (púrpuras y cianobacterias) y Gram<sup>+</sup> (un sólo caso, Frankia sp.). El grupo que incluye a los rhizobia incluye a cuatro géneros: Rhizobium, Bradyrhizobium, Agrobacterium y Phyllobacterium. Se ha propuesto la creación de un nuevo género llamado Azorhizobium que puede nodular los tallos de las plantas de la especie Sesbania. Rhizobium y Bradyrhizobium son los géneros capaces de formar nódulos fijadores de nitrógeno en raíces de plantas leguminosas y son los que en adelante serán referidos como rhizobia. Las especies del género Agrobacterium producen tumores o hipertrofias en la raíz de varias plantas dicotiledóneas. Las especies del género Phyllobacterium producen hipertrofias en las hojas de plantas dicotiledóneas.

En sus inicios la clasificación de las especies de los géneros Rhizobium y Bradyrhizobium se llevó a cabo considerando la capacidad de los diferentes grupos de bacterias para nodular distintas especies de leguminosas. Sin embargo, este tipo de clasificación ha resultado confuso pues se ha demostrado que muchas de estas bacterias pueden nodular a más de un hospedero. Por otro lado la transmisión de información genética de una bacteria a otra (ver Sección Genética) puede modificar la capacidad de nodulación de las bacterias en determinados

hospederos. Actualmente se están considerando criterios más amplios y características "más estables" para llevar a cabo la clasificación y es por esto que la taxonomía de estos géneros se está reorganizando en base a criterios genéticos y/o evolutivos y no fenotípicos ó ecológicos. Con estos criterios, ha sido posible aislar bacterias edáficas cromosomalmente idénticas a Rhizobium leguminosarum, pero carentes de plásmido simbiótico y por lo tanto, incapaces de establecer una simbiosis (Segovia y col., 1991 y Jarvis y col., 1989).

En la Tabla 1 se mencionan los géneros y especies más reconocidos aunque algunos de ellos probablemente serán pronto modificados. El género Rhizobium incluye especies de crecimiento rápido en el laboratorio. Sus espectros de especificidad en general son limitados y rara vez fijan nitrógeno ex planta. El género Bradyrhizobium está formado por especies de crecimiento lento en el laboratorio que nodulan en general plantas tropicales. Sus rangos de especificidad son amplios y algunas especies fijan nitrógeno ex planta. El género Azorhizobium consta de una sola especie descrita de crecimiento rápido, que es capaz de fijar nitrógeno en vida libre (revisado en Sprent, 1989).

Las leguminosas son una familia muy diversa, que contiene aproximadamente 15,000 especies y hasta ahora sólo se ha descrito un porcentaje muy bajo que es nodulado por las rizobiáceas. En las subfamilias Papilionoideae y Mimosoideae existen algunos géneros incapaces de nodular y la subfamilia

Caesealpinioideae incluye muchos géneros que no nodulan. Fuera de las leguminosas, el único género capaz de formar nódulos es Parasponia de la familia Ulmaceae que está tan relacionada a las leguminosas como cualquier otra familia de dicotiledóneas, por lo que no se puede hacer ninguna inferencia filogenética al respecto (Young y Johnston, 1989).

Es importante hacer notar que una especie de leguminosas puede ser nodulada por más de una especie de rizobiáceas y que una especie de rizobiácea puede nodular a más de una especie de leguminosas, aún de diferentes subfamilias (revisado en Sprent, op. cit.).

**BACTERIA**

**HOSPEDERO MAS COMUN**

**Rhizobium**

R. meliloti  
R. leguminosarum bv. trifolii  
phaseoli  
viciae

R. loti  
R. galega  
R. fredii  
R. xinjiangensis  
Rhizobium spp.

Alfalfa  
Trébol  
Frijol  
Haba y chícharo  
Lotus corniculatus  
Galega officinalis  
Soya  
Soya  
Cacahuate  
Jicama  
Parasponia (no Legum.)

**Bradyrhizobium**

B. japonicum

Soya

**Azorhizobium**

A. caulinodans

Sesbania

**Agrobacterium**

A. tumefaciens  
A. rhizogenes  
A. rubi  
A. radiobacter

Dicotiledóneas  
Dicotiledóneas  
Dicotiledóneas  
Ninguna

**Phyllobacterium**

Dicotiledóneas

## **El Establecimiento de la Simbiosis**

El proceso por el cual se da el establecimiento de la simbiosis entre dos organismos es afectado por muchos factores. Inicialmente, ambos miembros de la asociación deben estar en contacto y por lo tanto han tenido que desarrollar mecanismos para reconocerse. El estudio de la ecología y dinámica de las poblaciones bacterianas que se encuentran alrededor de las raíces (rizósfera) de leguminosas ha demostrado que esta dinámica es compleja. La raíz de las leguminosas excreta gran cantidad de sustancias que hacen a la zona aledaña a la raíz un sitio privilegiado para el desarrollo de poblaciones de gran número de bacterias y hongos. Las bacterias rizobiáceas, coexisten en la rizósfera junto con una gran diversidad de especies, y forman parte de lo que podríamos llamar un miniecosistema donde se dan relaciones de dinámica de poblaciones, variación de disponibilidad de nutrientes, flujo por cadenas tróficas de nitrógeno y carbono, competencia, ciclos de depredador-presa y es un ámbito donde pudieran darse eventos de transmisión genética.

Los exudados de las leguminosas, entre otras sustancias, contienen una gran variedad de compuestos fenólicos llamados flavonoides. Los principales compuestos flavonoides están ampliamente distribuidos entre las plantas superiores y sus tasas de síntesis y degradación varían sensiblemente durante

las etapas de desarrollo de la planta. Sus funciones son muy variadas, pues sirven para atraer animales para la polinización, como agentes protectores de luz ultravioleta y contra la infección de microbios fitopatógenos (revisado por Rolfe, 1988).

Las bacterias rizobiáceas son sumamente sensibles a estos compuestos. Son capaces de detectar hasta concentraciones de  $10^{-7}$  a  $10^{-8}$  M de estas sustancias en el medio. La gran sensibilidad de Rhizobium a estas señales de la planta puede indicarle su situación en la rizósfera (Rolfe, op. cit.). Como se verá más adelante, estos compuestos pueden activar la expresión de información genética de la bacteria, necesaria para el desarrollo de la simbiosis. Los inductores vegetales de la expresión genética simbiótica de los rhizobia caracterizados químicamente han sido obtenidos de extractos de semillas y plántulas. De esta forma, sabemos que en extractos de semillas de alfalfa, los principales inductores son luteolina (Peters y col., 1986) y crisoeriol (Hartwig y col., 1990), en trébol es la 7,4'dihidroxi flavona (Redmond y col., 1986), en chícharo, eriodictiol y apigenina (Firmin y col., 1986), en soya genisteína y daidzeína (Banfalvi y col., 1988); en haba se han sugerido como moléculas activas naringenina, eriodictiol y luteolina (Zaat y col., 1987). Algunos de estos flavonoides se esquematizan en la Figura 1. Actualmente, se están empezando a caracterizar los componentes de los exudados de la raíz a los

que responden algunos genes bacterianos, al ser activados en su expresión. El exudado de raíz de Vicia sativa contiene siete compuestos capaces de inducir el gene nodA de R. leguminosarum bv. viciae (ver sección Genética). De estos siete inductores, seis de ellos son flavanonas (Zaat y col., 1989). En los exudados de alfalfa se han descrito tres inductores principales. El principal inductor del exudado, la 4,4'-dihidroxi-2'-metoxichalcona, es un orden de magnitud más potente que la luteolina que es el inductor encontrado en las semillas de alfalfa y que no se encuentra en el exudado (Maxwell y col., 1989). Los compuestos exudados por las semillas y las raíces de alfalfa pueden causar efectos complejos en la rizósfera y se ha visto que según las concentraciones de los diferentes inductores, las interacciones entre ellos pueden ser aditivas, sinérgicas o competitivas (Hartwig y col., 1989). Por otro lado, en estos exudados también existen sustancias inhibitoras de la expresión de genes bacterianos simbióticos (Djordjevic, y col., 1987), por lo que para que la simbiosis se lleve a cabo, se requiere un balance muy particular de todos estos compuestos en el exudado de la planta que va a ser nodulada. Además en los casos de soya y Vicia, las bacterias (B. japonicum y R. leguminosarum bv. viciae respectivamente) pueden provocar la aparición de flavonoides nuevos en los exudados de las raíces. En el caso de Vicia, ésta nueva combinación de flavonoides depende de la

presencia del plásmido simbiótico en la bacteria que es inoculada (Recourt y col., 1990), y este nuevo balance favorece el establecimiento de la simbiosis. Sin embargo, un ejemplo contrario se encuentra en la soya, donde la presencia de Bradyrhizobium causa un aumento en la concentración de la fitoalexina isoflavonoide gliceolina I que es tóxica para la bacteria. Bradyrhizobium posee un mecanismo de resistencia a la gliceolina que a su vez es inducible por otros isoflavonoides (Parniske y col., 1990). Este mecanismo posiblemente ha sido desarrollado por la bacteria para poder establecerse en las raíces de la planta.

En cuanto al transporte de los flavonoides hacia el interior de la célula, Recourt y col. (1989), señalan que la flavanona naringenina penetra a las células de R. leguminosarum bv. viciae aparentemente sin sufrir ninguna conversión metabólica. Esta acumulación es instantánea, no saturable, altamente reversible y no es inhibida por la presencia de otros flavonoides en el medio ni por inhibidores metabólicos como cianuro de potasio o azida de sodio. Por lo tanto, el mecanismo de acumulación carece de sitios de alta afinidad y no requiere de gasto de energía celular. La unión de la naringenina a la membrana celular depende del pH, siendo muy alta a un pH de 5.7 y muy baja a un pH de 9.7. La acumulación de naringenina es independiente de la presencia del plásmido simbiótico de esta cepa.

Otros compuestos cuya producción es afectada tanto cualitativa como cuantitativamente por los flavonoides y los exudados de las semillas son las citoquininas producidas por Rhizobium y Bradyrhizobium (Taller, 1990). El papel en la nodulación de ésta y otras hormonas de tipo vegetal (auxinas) producidas por las rizobiáceas aún no es muy claro. Sin embargo se pueden obtener pseudonódulos con la aplicación de citoquininas o de inhibidores de transporte de auxinas en las raíces de leguminosas (Hirsch y col., 1989), aunque la formación de estas estructuras no es inhibida por la presencia de nitrógeno combinado por lo que podrían ser consideradas únicamente como deformaciones de las raíces secundarias. Por otro lado, varios flavonoides compiten con inhibidores sintéticos de transporte de auxinas (Jacobs y Rubery, 1988), y recientemente, se ha encontrado que los exudados de semilla y los flavonoides presentes en estos exudados como luteolina y quercetina inducen también abultamientos en las raíces de alfalfa (McKahnn y col., 1990). Con todo esto se ha podido sugerir que Rhizobium podría cambiar la relación citoquininas/auxinas en las células corticales de la raíz, a través de la síntesis de productos que afecten directa o indirectamente la secreción de citoquininas, o bien, produciendo inhibidores de la síntesis, el transporte o la acción de las auxinas. Los aspectos posteriores del establecimiento de la simbiosis serán discutidos en otra

sección.

Las bacterias rizobiáceas poseen sistemas quimiotácticos que perciben sustancias que la planta produce como aminoácidos y exudados y por lo tanto son activados por la misma. Los genes para la formación del flagelo (fla), movilidad (mut) y quimiotaxis (che) descritos en R. meliloti son cromosomales y las mutantes obtenidas nodulan normalmente, aunque las que tienen afectada la movilidad son menos competitivas (revisado en Watson, 1989). Hasta el momento se sabe que en R. meliloti pueden existir dos vías de quimiotaxis, pues existen mutantes que pueden detectar exudados de la planta pero son incapaces de detectar atrayentes como aminoácidos (revisado por Long, 1989).

Una de las etapas importantes para la iniciación de la simbiosis es la adhesión de la bacteria a los pelos de la raíz. Se ha observado que esta adhesión no es un fenómeno específico. En chícharo, la unión de Rhizobium a los pelos depende de una adhesina cuya formación requiere de concentraciones suficientes de  $Ca^{2+}$ , y de la aglutinación posterior de las bacterias a través de la formación de fibrillas de celulosa (Smit y col., 1987). Sin embargo, las bacterias incapaces de producir estas fibrillas siguen nodulando al menos chícharo. Por otro lado, Richardson y col., (1988), han sugerido que la presencia de ciertas concentraciones de  $Ca^{2+}$  pueden ser importantes para el efecto de las flavonas en la inducción de los genes nod (ver sección Genética).

### La Formación del Nódulo.

El estudio de la formación del nódulo se ha llevado a cabo a varios niveles. El aspecto genético se ha estudiado sobre todo en asociaciones simbióticas donde la entrada de la bacteria a la planta es por los pelos radiculares a través de hilos de infección en raíces no leñosas. Sin embargo, cabe señalar que las rizobiáceas también pueden penetrar a la planta intercelularmente por fisuras como en Arachis (cacahuete), Stylosanthes y Parasponia. Además, una misma cepa rizobiácea puede entrar por ambas vías según el hospedero de que se trate. Por otro lado, las rizobiáceas son también capaces de nodular raíces leñosas y por lo menos en el caso de Mimosa scabrella la penetración es a través de las células epidérmicas intactas (Faria y col., 1988).

A continuación se hará un resumen de los eventos mejor caracterizados que ocurren durante la formación de nódulos a través de hilos de infección, pero éstos no son necesariamente, eventos comunes para todos los tipos de infección mencionados arriba.

La presencia de las bacterias rizobiáceas en la superficie de la raíz es debida a fenómenos de quimiotaxis y es posiblemente favorecida por los exudados de la planta. Esta presencia induce deformaciones (enroscamiento, ramificación y en algunos casos la formación de raíces gruesas y cortas) de

los pelos radiculares donde las bacterias quedan atrapadas. La bacteria se une al pelo y se han señalado tres etapas de unión que aumentan progresivamente en especificidad (Dazzo y col., 1988). La bacteria penetra en el pelo radicular y ésto ocasiona que el crecimiento de la pared celular del pelo se reorienta y se forme, en asociación con glicoproteínas, una estructura tubular llamada hilo de infección de origen vegetal, a través del cual penetran las bacterias hacia las células de la corteza de la raíz. El hilo de infección penetra precedido por el núcleo de la célula vegetal. Rhizobium produce pectinasas y celulasas que pudieran funcionar durante la entrada, aunque se ha señalado que la acción de estas enzimas podría dañar las fibras de celulosa necesarias para la infección o algunos mecanismos de especificidad. Un ejemplo claro es el caso de R. loti que normalmente no nodula trébol y puede hacerlo cuando las raíces de esta planta son tratadas previamente con celulasas y pectolasas (Al-Mallah y col., 1987). Por otro lado, si los rhizobia producen estas enzimas, el hilo de infección debería contener elementos que los protejan contra la degradación que pudieran llevar a cabo estas enzimas (Sprent, op. cit.).

Una evidencia más del intercambio de señales que se da entre Rhizobium y la planta, es el hecho de que a varias capas celulares por debajo de los sitios por donde va penetrando el hilo de infección, se inicia un foco de división celular en las

células no diferenciadas del parénquima de la raíz, es decir que la planta inicia la formación del nódulo en células que aún no han estado en contacto directo con la bacteria. Esto implica que debe existir una señal bacteriana transmitida a distancia. Recientemente se ha identificado en R. meliloti una molécula (NodRm1) (Lerouge y col., 1990), que probablemente sea la responsable de causar esta respuesta (ver sección Genética y Fig. 2).

El meristemo o área de crecimiento del nódulo se origina en este foco inicial de división y puede perdurar por varios meses en condiciones adecuadas. Ciertas hormonas vegetales como auxinas y citoquininas producidas por la bacteria o por la planta, han sido relacionadas a la iniciación y persistencia del meristemo. Las células proximales al meristemo son invadidas por los hilos de infección que contienen a los rhizobia. Estos son liberados en el citoplasma de las células vegetales y quedan rodeados por membranas de origen vegetal llamadas membranas peribacteroidales. Esta liberación ha sido descrita como un requisito importante para la diferenciación de la bacteria en bacteroide que es la forma fijadora de nitrógeno, aunque en Parasponia la liberación no ocurre; en 12 géneros de leguminosas se ha descrito que las bacterias quedan atrapadas en los hilos de infección y allí son capaces de fijar nitrógeno, por lo que se cree que la liberación está determinada por el genotipo del hospedero (Sprent, op. cit.) La

diferenciación de la bacteria en bacteroide implica un aumento de tamaño, pleomorfismo frecuente, la aparición de gránulos de  $\beta$ -polihidroxibutirato, una descondensación del nucleoide y la inducción de la actividad de la enzima reductora del nitrógeno atmosférico, la nitrogenasa. A medida que los nódulos maduran, las células vegetales que contienen a los bacteroides incrementan su volumen varias veces. Algunas células vegetales del nódulo permanecen sin bacteroides y se cree que su función es mantener y nutrir a las células que sí los contienen (Vance y col., 1988).

Los nódulos formados en las leguminosas se pueden clasificar en tres grupos principales de acuerdo a su forma, a su actividad meristemática y a los productos nitrogenados que transportan: 1) nódulos cilíndricos con meristemo apical que asimilan el nitrógeno fijado en amidas como los de alfalfa, chícharo y trébol; 2) nódulos esféricos con meristemo interno que asimilan el nitrógeno fijado en ureidos como los de frijol y soya y 3) nódulos en forma de collar que rodean la raíz primaria como los de Lupinus alba L. (Vance, op. cit.).

## GENETICA

Dos de las áreas que más luz han dado al conocimiento del establecimiento de la simbiosis y la formación del nódulo son la genética y la biología molecular bacterianas. El aislamiento y la caracterización de la información genética necesaria para la nodulación, así como el estudio de cepas mutantes que tienen alterada alguna de sus funciones simbióticas han permitido analizar el complejo proceso en eventos más sencillos.

En las especies de Rhizobium la mayoría de los genes necesarios para la nodulación se encuentran en plásmidos. Estos plásmidos son de gran tamaño y varían de 200-300 kb en R. leguminosarum hasta los megaplásmidos encontrados en R. meliloti de 1200-1500 kb (Long, 1989a). Sin embargo, no ha podido ser determinada la posible importancia de grandes zonas de estos plásmidos, ya que al ser mutagenizadas no se ha observado ningún defecto simbiótico de la bacteria en el laboratorio. Por otro lado, se ha encontrado que mucha información simbiótica se encuentra acumulada en una zona. Estos plásmidos han sido llamados simbióticos pero en la misma bacteria existen otros plásmidos que en algunos casos se ha demostrado que también contienen información simbiótica. Algunos otros genes simbióticos se encuentran en el cromosoma. En Bradyrhizobium y Azorhizobium la información simbiótica se encuentra en el cromosoma (revisado por Martínez y col., 1990).

La transferencia y la replicación autónomas de los plásmidos contenidos en los rhizobia han facilitado su estudio en el laboratorio. Este hecho ha generado la pregunta de si la transferencia de plásmidos que se puede seguir y favorecer en el laboratorio es un evento que se da naturalmente en la rizósfera donde coexisten más de un tipo de rhizobia. Si este fuera el caso, el flujo de información genética entre varias especies daría un gran valor adaptativo al género y las interpretaciones de los experimentos sobre el origen y evolución de Rhizobium y bacterias cercanas al mismo, tendrían que tomar en cuenta este argumento. Con los datos actuales, sólo se puede decir que este flujo o transmisión de información genética de plásmidos en un ambiente natural parece ocurrir a baja frecuencia (Schofield y col., 1987 y Kaijalainens y col., 1989).

Por otro lado, el análisis de la información genética que se encuentra en estos plásmidos, ha permitido clasificar a los genes en diferentes grupos. Los grupos principales son los genes comunes, los específicos, los de polisacáridos y los de fijación de nitrógeno. Al final de esta sección en la Tabla 2, se encuentra un resumen de los genes nod descritos hasta el momento.

Los genes nod comunes.

Estos genes son llamados así pues son intercambiables entre una especie y otra sin alteración del espectro de hospedero al que estas bacterias nodulan.

Estos genes se denominan nodA, B, C, I y J. Los genes nodA, B y C se encuentran en todas las especies de Bradyrhizobium y Rhizobium estudiadas. Los productos de estos genes son necesarios para los eventos iniciales del establecimiento de la simbiosis como la deformación y el enroscamiento de los pelos de la raíz y la inducción de la actividad mitótica en las células radiculares (revisado por Long, 1989a). La expresión de estos genes es inducida por la presencia de exudados de la raíz. Los productos de nodA y B están involucrados en la síntesis de algún(os) factor(es) de crecimiento vegetal difusible(s) y termoestable(s), ya que los extractos y los sobrenadantes de los medios de crecimiento de cepas silvestres, así como una fracción semipurificada de los mismos que contiene los compuestos de bajo peso molecular, inducen la división de protoplastos de células vegetales, mientras que las cepas incapaces de sintetizar NodA y/o NodB son incapaces de inducir la división de los protoplastos (Schmidt y col., 1988).

El producto del gene nodC parece ser un receptor extramembranal que pudiera transmitir una señal de la bacteria

a la planta o viceversa (John y col., 1988), aunque por el momento no se sabe cual(es) pueda(n) ser la(s) molécula(s) que actúe(n) como señal de este receptor y mucho menos del mecanismo de transducción de la señal cuando ésta es recibida. A pesar de que, como se mencionó, estos genes se expresan durante los inicios del proceso, se ha demostrado que la proteína NodC está presente en nódulos maduros inducidos por R. meliloti en Medicago sativa y que durante el desarrollo del nódulo esta proteína parece ser procesada en una molécula de menor tamaño (Schmidt y col., 1986).

La alteración o mutación de cualquiera de estos tres genes incapacitan totalmente a la bacteria para formar nódulos (fenotipo Nod<sup>-</sup>). Por otro lado los productos de estos tres genes son esenciales para la producción de NodRml en R. meliloti (Lerouge y col., 1990, Fig. 2) y de los productos similares a esta molécula encontrados en otras especies.

La alteración de nodI y nodJ ocasiona un retraso en la aparición de los nódulos en las raíces. Se cree que ambas proteínas pueden estar involucradas en un complejo de transporte membranal pues las dos están asociadas a membrana y tienen una región de unión a ATP que podría ser el donador de energía para un proceso de transporte activo (Evans y Downie, 1986).

### Los genes nod específicos.

Los genes nod específicos son llamados así, pues el fenotipo simbiótico alterado que ocasionan las mutaciones en estos genes no puede ser restaurado por genes similares intactos de otras especies. Las mutaciones y/o las transferencias de estos genes de una especie a otra ocasionan un cambio en el espectro de infección de las bacterias (revisado en Martínez y col., 1990). La expresión de todos estos genes es inducida por compuestos flavonoides y la proteína NodD.

A pesar de que durante la simbiosis se puede suponer la existencia de un cierto número de moléculas, tanto bacterianas como de la planta encargadas de transmitir señales de un miembro de la asociación al otro y viceversa, se ha encontrado una sola vía de transmisión de señales de la planta a la bacteria.

Los elementos de esta vía son los exudados de la raíz y el producto de un gene bacteriano llamado nodD. El producto de este gene forma parte de una familia de activadores de la transcripción en procariotes (Henikoff y col., 1988) y en presencia de exudados de la planta tiene como función activar la expresión del regulón conformado por los genes nod comunes y los específicos (Fig. 3). NodD interacciona con los compuestos flavonoides de la planta de una manera específica, lo que

repercute esencialmente en el espectro de infección de las bacterias.

Dicho gene se encuentra presente en general en una o más copias en las rizobiáceas estudiadas (en R. leguminosarum bv. viciae y en R. leguminosarum bv. trifolii sólo hay una y en R. meliloti hay 3) (revisado en Martínez y col., 1990). Ya que dicho gene existe en todas estas especies, inicialmente fué considerado como un gene nod común. Sin embargo Spaink y col., (1987), Horvath y col., (1987) y Bassam y col., (1988) demostraron que las diferentes proteínas NodD, tenían distinta sensibilidad a compuestos flavonoides presentes en los exudados y por lo tanto están involucradas en la determinación de la especificidad de la bacteria para nodular a su hospedero normal. En contraste con los genes nodABC, el intercambio de genes nodD sí ocasiona un cambio en el tipo de planta que puede ser nodulada por la bacteria, por lo que este gene no se considera más como un gene nod común sino como un nod específico.

El análisis de genes nodD híbridos de dos especies diferentes, ha sugerido que la zona de la proteína necesaria para el reconocimiento de los flavonoides se encuentra en el extremo carboxilo de la molécula (Spaink y col., 1989) conclusión a la que se ha llegado también por estudios con mutantes puntuales a lo largo de todo el gene (Burn y col., 1987, Horvath y col., 1987, McIver y col., 1989 y Burn y col.,

1989). El producto de nodD es un regulador positivo de varios genes simbióticos comunes y específicos. La razón de que esto sea así, es que en las zonas de control de la expresión de los genes regulados por NodD existe una secuencia de ADN común a todos ellos conocida como caja nod y que es de alrededor de 45 pares de bases (Rostas y col., 1986). Esta secuencia de ADN es reconocida por la proteína NodD y se ha demostrado que la proteína se une al ADN en presencia o en ausencia de los compuestos flavonoides (Kondorosi y col., 1989 y Fisher y col., 1989).

El producto de nodD se localiza en la membrana citoplásmica y esta localización no es afectada por la presencia o ausencia de los inductores (Schlaman y col., 1989).

En R. meliloti donde existen tres copias de nodD, nodD1, nodD2 y nodD3, existe otro gene regulatorio llamado syrM. syrM actúa junto con nodD3 causando la expresión alta de una fusión nodC::lacZ en ausencia de inductores (Mulligan y Long, 1989) y ambos productos se requieren para el efecto de inhibición de la expresión de los genes nod en presencia de nitrógeno combinado en el medio (Dusha y col., 1990). Además cuando syrM se encuentra en multicopia junto con otro gene llamado syrA ocasiona un fenotipo mucoide. syrA no está relacionado con la actividad inductora de nodD3. Entonces syrM estimula en trans la expresión de los genes nod junto con nodD3 y la expresión de los genes exo (de exopolisacáridos) junto con syrA. La

secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia nucleotídica de syrM es 30% similar a la predicha para diversos genes nodD secuenciados. El parecido entre ambas moléculas se encuentra principalmente en el amino terminal que en nodD es la zona propuesta de unión a ADN. El gene syrM carece de una caja nod y por lo tanto su expresión no es inducida por flavonoides (Barnett y Long, 1990). Las cepas con una mutación sencilla syrM<sup>-</sup> (Honma y Ausubel, 1989) o una doble mutante syrM<sup>-</sup> nodD3<sup>-</sup> pero nodD1<sup>+</sup> y nodD2<sup>+</sup> (Mulligan y Long, 1989) carecen de fenotipo simbiótico alterado en el laboratorio. Por otro lado, Sharma y Signer (1990) encontraron que en nódulos de alfalfa,, syrM sigue el patrón de expresión de varios genes de fijación de nitrógeno. Dicha expresión se inicia posteriormente a la de los genes nod y sin embargo no está controlada por los reguladores de la expresión de los genes de fijación de nitrógeno ni por condiciones microaeróbicas. Por todas estas razones el papel simbiótico de syrM permanece oscuro.

También en una cepa de R. meliloti se ha descrito la existencia de un represor codificado por nodR (Pierre y col., 1990) que se une al sitio de unión de la RNA polimerasa en los promotores de nodD y de nodA que están sobrelapados, interfiriendo con la unión del activador NodD. Se propone que sólo en presencia de flavonoides, NodD puede desplazar al represor, con la consecuente activación de la expresión de los genes nod (Kondorosi y col., 1989). La mutación de este

repressor ocasiona una nodulación retrasada.

Otro gene es nodH que parece estar presente únicamente en R. meliloti. La mutación de nodH causa una inhibición total de la capacidad de nodulación de la bacteria en alfalfa (Medicago sativa), pero lo capacita para producir deformaciones en los pelos radiculares y la formación de estructuras semejantes a nódulos en arvejas (Vicia sativa subsp. nigra) aunque esto último a muy baja eficiencia (Horvath y col., 1986 y Debelle y col., 1986). El producto del gene nodH está involucrado en la síntesis de un factor que ocasiona la deformación de pelos radiculares de alfalfa en presencia de los genes nodABC y nodQ. Con esta evidencia, se sugirió que los genes nodABC podrían determinar la producción de un factor simbiótico común que sería modificado por NodH, transformándolo en un factor de especificidad para la nodulación de alfalfa (Faucher y col., 1988, y Banfalvi y col., 1989). Recientemente, el factor ha sido identificado como NodRml (Lerouge y col., 1990). NodRml es un tetrasacárido de  $\beta$ -glucosaminas (Fig. 2). Tres de los azúcares tienen un grupo acetilo, el extremo reductor de la molécula está modificado por un grupo sulfato y el extremo no reductor posee un N-acil-ácido graso de 16 carbonos. Esta molécula ocasiona la deformación de los pelos en las raíces de alfalfa.

Por lo tanto esta señal no es ninguna de las hormonas vegetales como auxinas o citoquininas y el hecho de que la

señal de especificidad sea un oligosacárido (que son moléculas que ya habían sido descritas como morfógenos en otras plantas, Tran Thanh Van y col., 1985), resucita la importancia de las lectinas vegetales en la nodulación. Por otro lado, la estructura de NodRm1 se asemeja a la de los intermediarios de la síntesis de pared celular y de polisacáridos en otras bacterias. Dado este descubrimiento, han surgido muchas preguntas sobre el (los) efecto(s) y el mecanismo de acción de NodRm1; además de causar la deformación de los pelos en las raíces de alfalfa ¿NodRm1 per se puede ocasionar la inducción de la actividad mitótica de las células de la raíz?, ¿quién es el receptor en la planta?, ¿cuál es el mecanismo de transducción de la señal?, ¿NodRm1 puede penetrar a través de varias capas celulares de la raíz o existe(n) otra(s) molécula(s) encargada(s) de la transducción de la señal?. Una posibilidad, es que NodRm1 no penetre la corteza radicular sino que afecte directa o indirectamente el balance hormonal de la planta, lo que ocasionaría entonces el inicio de la formación del nódulo. Por otro lado, se ha iniciado ya, la caracterización de los factores de especificidad similares, pero obviamente no equivalentes, presentes en otras especies de rizobiáceas. Spaink y col., (1990) han caracterizado los compuestos que confieren la especificidad de R. leguminosarum bv. viciae y en R. leguminosarum bv. trifolii, y en estos dos casos la estructura es similar a NodRm1 aunque las

modificaciones son diferentes. También se ha identificado la molécula en la cepa de amplio espectro de infección NGR234 que en este caso es un pentasacárido (Price y col., 1990). Para la producción de estos compuestos se requieren NodAB, probablemente NodC y NodFEL (Fig. 2). De estos tres últimos trataré a continuación.

Los genes nodFE están involucrados en el desarrollo de los hilos de infección y su alteración provoca un retraso en la nodulación y una reducción en el número de nódulos. Sin embargo, la nodulación deficiente de estas mutantes es evidente en ciertas plantas pero no en otras, donde este tipo de mutantes nodula bien.

El producto de nodE está localizado en la membrana citoplásmica. Al igual que para nodD, se han construido genes híbridos con el gene nodE de R. leguminosarum bv. trifolii y el de R. leguminosarum bv. viciae, lo que ha permitido demostrar que el producto de este gene, es el factor de especificidad principal entre estos dos géneros. Con este trabajo, además, se determinó el dominio de la proteína que confiere la especificidad por la planta que va a ser nodulada (Spaink y col., 1989b). Se ha sugerido que los productos de nodF y E están relacionados con la producción, la modificación ó el transporte de  $\beta$ 1-2 glucanos, ya que en Escherichia coli, el producto de un gene similar a nodF funciona como una transglucosilasa en la síntesis de estas moléculas (Therisod y

Kennedy, 1987). Muy recientemente se ha sugerido que los productos NodF y NodE están involucrados en la síntesis de policétidos (intermediarios de lipopolisacáridos), ya que NodF es una proteína acarreadora de acilos que tiene como grupo prostético un grupo 4'-fosfopanteteíno (Geiger y col., 1990). Una de las funciones de estas proteínas en E. coli es la síntesis de oligosacáridos derivados de membrana.

Spaink y col., 1990 proponen que NodL modifica el producto de NodFE y también se ha propuesto que está relacionado con la estabilidad del hilo de infección y en la regulación del enroscamiento de los pelos (Canter-Cremers y col., 1989). El fenotipo de las mutantes en este gene está en controversia ya que Surin y Downie (1988) reportan que las mutantes en nodL sufren una disminución en la eficiencia de nodulación en chícharos pero no en Vicia sativa, mientras que Canter-Cremers y col. (op. cit.), reportan que la nodulación de estas mutantes afecta la eficiencia de nodulación en Vicia sativa y trébol, pero no en V. hirsuta. La explicación que se da a estas incongruencias es que el fenotipo de estas mutantes depende tanto del fondo genético donde se encuentra la mutación como de la planta que se usa en las pruebas de nodulación (Canter-Cremers y col., op. cit.). Por otro lado Downie (1989), demuestra que la secuencia de este gene es similar a las acetil-transferasas codificadas por lacA y cysE de E. coli y propone que NodL este involucrado en la acetilación de algún

azúcar y Canter-Cremers y col., (op. cit.) proponen que es una proteína membranal.

Se ha establecido que para la producción de NodRm1 se requiere del producto de nodQ (Fig. 2). Los genes nodP y nodQ son necesarios para transferir la capacidad de enroscamiento de los pelos radiculares de R. meliloti a R. leguminosarum bv. trifolii y una mutación en esta zona extiende el espectro de infección de R. meliloti para nodular Vicia sativa nigra (Cervantes y col., 1989). Inicialmente se dijo que NodQ poseía un dominio que une GDP similar al encontrado en factores de iniciación y de elongación de la traducción en la síntesis de proteínas (Schwedock y Long, 1989), sin embargo recientemente se ha demostrado que nodP y nodQ probablemente están codificando para una ATP sulfurilasa, ya que estos genes pueden complementar para esta actividad a mutantes en cysD y cysN en E. coli. Es posible que en la zona donde se encuentran nodP y nodQ también exista un gene equivalente a cysC de E. coli que codifica para una adenosin-5'-fosfosulfato-cinasa (APS-cinasa) ya que también hay complementación, aunque no se ha detectado homología y se ha propuesto que nodP y nodQ están involucrados en crear una forma activada de sulfato (APS) que puede ser transferido al precursor de NodRm1 posiblemente por NodH (Schwedock y Long, 1990). Ambos genes parecen estar en más de una copia en R. meliloti y por hibridización ADN-ADN se determinó que E. coli y Azospirillum brasilense tienen

similitud con nodP. Los genes nodP y nodQ no tienen en su región 5' una caja nod aunque sí son inducidos por luteolina por lo que podrían estar formando un operón con los genes nodFEG (Schwedock y Long, 1989).

El gene nodG codifica para un producto que es similar a las deshidrogenasas de ribitol. Debellé y Sharma (1986), postulan que dicho producto pudiera servir a la bacteria para utilizar algún compuesto vegetal como fuente de energía para la infección.

Las mutantes de R. leguminosarum bv. viciae en nodM no tienen efecto en la nodulación en el laboratorio de Vicia hirsuta y de otras leguminosas según Canter Cremers y col. (op. cit.), pero Surin y Downie (op. cit.) dicen que en este mismo hospedero las mutantes nodM<sup>-</sup> sufren una disminución en la eficiencia de nodulación al igual que las mutantes en nodN. La secuencia de nodM (Surin y Downie, op. cit.) indica similitud con las amidofosforibosil transferasas aunque posteriormente se demostró que tiene mayor homología con la glucosamino sintetasa de E. coli y por lo tanto actualmente se cree que NodM está involucrado en la síntesis de glucosamina-6-fosfato (Fig. 2) (Marie y Downie, 1990). Por otro lado se ha propuesto que los productos de nodM y N podrían modificar la acetilación de polisacárido ácido extracelular, afectando así las propiedades de la bacteria para su unión a lectinas (Dazzo y col., 1988).

El gene nodT se encuentra en R. leguminosarum bv. trifolii

abajo de nodJ y en R. leguminosarum bv. viciae abajo de nodMN. La secuencia peptídica predicha sugiere que NodT es enviado a la membrana externa (Surin y col., 1990). El fenotipo de las mutantes en este gene también está en controversia ya que Canter-Cremers y col., (1989) dicen que las mutantes nodT<sup>-</sup> en R. leguminosarum bv. viciae tienen un retraso en la nodulación de Trifolium subterraneum pero no de V. sativa mientras que Surin y col. (op. cit.) afirman que estas mutantes en R. leguminosarum bv. viciae o trifolii no están afectadas en la nodulación de tréboles y chícharos para la primera especie y de V. hirsuta para la segunda.

El gene nodO (también llamado nodR) afecta la expresión del producto de rhiA que es una proteína de la bacteria que desaparece en presencia de los inductores de los genes nod en R. leguminosarum bv. viciae (Economou y col., 1989). La secuencia de nodO ha revelado cierta similitud con el extremo amino de la proteína hemolisina HlyA de E. coli y con otras proteínas de bacterias que se excretan de la misma manera (de Maagd y col., 1989). HlyA es un factor de virulencia en infecciones extraintestinales de E. coli (Felmlee y col., 1985). NodO es un producto de excreción a pesar de que la proteína carece de péptido señal. El gene posee en su región 5' una caja nod poco conservada. Quizás por este motivo, la regulación de su expresión es distinta a otros genes nod pues responde con un incremento de transcripción cuando existen

varias copias de nodD en la cepa estudiada. NodO es una proteína que une  $\text{Ca}^{2+}$  y su exportación no requiere del extremo amino (Economou y col., 1990). Downie y Surin (1990) demuestran que R. leguminosarum bv. viciae puede tener dos vías de infección determinadas por dos grupos de genes diferentes ya que una mutante que sólo contiene los genes nodDABCI y J y que es  $\text{Nod}^-$ , puede ser complementada parcialmente para la capacidad de nodulación por dos regiones nod diferentes que no se traslapan y que no contienen genes en común. De esta forma se demuestra que una de las vías requiere de los genes nodFE y la otra de nodO para la nodulación de V. hirsuta y de nodO junto con nodL para la nodulación de chicharo. Ambas vías son aditivas pues la mejor nodulación se obtiene cuando todos estos genes están presentes. Otra alternativa es que con cada uno de estos grupos de genes se estén produciendo factores del tipo de NodRm1 con diferentes capacidades de generar un efecto biológico y sólo en presencia de todos estos genes se podría producir el factor más activo.

nodX es un gene que se encuentra abajo de nodABCIJ en la cepa TOM de R. leguminosarum bv. viciae y en R. leguminosarum bv. trifolii. Cuando este gene está presente amplía el espectro de infección del bv. viciae para nodular chicharos primitivos (Afganistán) (Davis y col., 1988).

nodS y nodU en B. japonicum están hacia abajo de los genes nod comunes nodIJ. La secuencia nucleotídica no reveló parecido

a ningún gene descrito. Las mutantes en nodS no tienen fenotipo simbiótico alterado en soya y siratro entre otras (Göttfert y col., 1990b).

nodV y nodW están presentes en B. japonicum y son esenciales para la nodulación de esta bacteria en "mungbean" (frijol de Castilla), Vigna unguiculata y siratro, pero no para la nodulación de soya. Estos genes forman un operón pero carecen de caja nod. Con la secuencia peptídica predicha y su comparación en bancos de genes se determinó que NodV y NodW pertenecen a la superfamilia de regulación procariote de dos componentes. Se propone que NodV es el sensor asociado a membrana y que NodW es el regulador (activador transcripcional probablemente) que podría fosforilarse (Göttfert y col., 1990a).

Otros genes son: nodK descrito en B. sp. (Parasponia) (Scott, 1986) y nodY en B. japonicum cuyas funciones son desconocidas (Banfalvi y col., 1988).

#### **Los genes de polisacáridos**

La superficie celular de Rhizobium ha sido muy estudiada debido al papel que puede tener en las etapas de reconocimiento. Estos polisacáridos pueden ser de 4 tipos: 1) polisacáridos extracelulares o exopolisacáridos (EPS), 2)

polisacáridos capsulares (CPS), 3)  $\beta$ 1-2 glucanos cíclicos y 4) lipopolisacáridos (LPS).

En este campo, nuevamente los estudios genéticos han revelado la complejidad del sistema. Brevemente, en R. meliloti, se han descrito por lo menos 15 genes que afectan de alguna manera la producción de estas moléculas.

Las mutantes defectuosas en la producción de EPS, LPS ó en  $\beta$ 1-2 glucanos no pueden formar hilos de infección o no pueden mantener estos hilos. Es por esto que los nódulos formados por algunas de estas mutantes son estructuras vacías, sin bacteroides e incapaces de fijar nitrógeno. En R. meliloti los genes que afectan la producción de estas moléculas están localizados fuera del plásmido simbiótico, ya sea en otros plásmidos o en el cromosoma. La síntesis de EPS no requiere de la presencia del pSim. Sin embargo, Dazzo y col., (1985) han descrito alteraciones de LPS en mutantes que tienen afectados los genes de nodulación y por lo tanto sugieren que los genes nod pueden modificar después de su síntesis los LPS o los CPS.

Al igual que otros genes de nodulación, algunos de los genes de la síntesis de polisacáridos parecen ser requeridos para la nodulación de ciertas leguminosas pero no de otras pues mientras que mutantes alteradas en la producción de EPS inducen nódulos normales en ciertos hospederos en otras especies sólo son capaces de formar callos (Chen y col., 1985), y en algunos casos, estas mutantes son absolutamente incapaces de nodular

(Borthakur y col., 1986).

Se ha sugerido que los polisacáridos de Rhizobium pueden funcionar en la simbiosis como: 1) señales o sustratos para la producción de señales, 2) materiales osmóticos requeridos durante la invasión, 3) factores de reconocimiento (revisado en Long, 1989a). También han sido relacionados a la unión de la bacteria a las raíces quizá a través de lectinas vegetales que son proteínas con azúcares unidos que pueden interaccionar con los polisacáridos. La controversia que por años ha existido en esta área empieza a aclararse con estudios como el realizado por Díaz y col., 1989. En este trabajo el gene psl que codifica para una lectina específica de chícharo, fué introducido en plantas de trébol blanco y posteriormente se indujo la formación de raíces transgénicas. R. leguminosarum bv. viciae nodula chícharo, arveja y lenteja pero no trébol. Sin embargo, las raíces transgénicas de trébol blanco que contenían la lectina de chícharo, fueron noduladas por R. leguminosarum bv. viciae. Esto demostró la importancia de esta lectina en la especificidad de nodulación hacia chícharo de Rhizobium leguminosarum bv. viciae. Por otro lado, la preexposición de bacterias a lectinas de raíz aumenta la nodulación y puede revertir el retraso en la aparición de nódulos de algunas mutantes (Halverson y Stacey, 1986). Con el descubrimiento de NodRm1 estos experimentos adquieren más importancia ya que las lectinas podrían ser los receptores de NodRm1 y las moléculas

similares encontradas en otras especies.

También se ha observado que los polisacáridos pueden formar complejos con flavolanos (taninos producidos por algunas raíces de leguminosas). Esta interacción es bacteriostática y ocasiona pérdida de viabilidad (Sprent, op. cit.). Sin embargo, no se sabe si esto pudiera tener alguna relevancia simbiótica.

Se ha pensado que los polisacáridos pueden ser procesados durante el desarrollo de la simbiosis por enzimas de la planta, lo cual ha complicado el estudio de esta área. Los productos del procesamiento pudieran ser señales de la bacteria a la planta (oligosacarinas, Tran Thanh Van y col., op. cit.). Una tercera hipótesis es que algunos polisacáridos pudieran evitar que la planta generara reacciones de defensa contra las bacterias rizobiáceas involucradas en la simbiosis. Sin embargo el papel que estas moléculas juegan en la simbiosis aún no se ha definido (revisado en Long, 1989b).

La nodulación de R. meliloti y la inducción de tumores por A. tumefaciens requieren de un conjunto de genes cromosomales conocidos como ndvA y B en R. meliloti y como chvA y B en A. tumefaciens. Ambos conjuntos de genes son funcionalmente equivalentes en ambas especies. Las mutaciones en ndvA ó B ocasionan un retraso en la nodulación y la formación de muchos nódulos blancos pequeños. Estos nódulos carecen de bacteroides y por lo tanto son incapaces de fijar nitrógeno. Estos genes se han asociado a la producción de  $\beta$ 1-2 glucanos extracelulares y

se sabe que las mutantes en ndvA no contienen esta molécula extracelular aunque sí contienen un intermediario de su síntesis. La secuencia de este gene indica una gran similitud con proteínas que unen ATP, sobre todo con HlyB que es una proteína de E. coli relacionada con la exportación de hemolisina (Stanfield y col., 1988).

El gene ndvB codifica para un producto al que se unen los  $\beta$ 1-2 glucanos durante su síntesis (revisado en Watson, 1989).

TABLA 2. GENES DE NODULACION

GENE	SIMILITUD CON OTROS GENES	COMENTARIOS
<u>nodA</u>	?	Citosólica División de protoplastos vegetales Producción de NodRm1
<u>nodB</u>	?	División de protoplastos vegetales Producción de NodRm1
<u>nodC</u>	?	Unido a membrana externa Con dominios de receptor eucariote
<u>nodD</u>	<u>lysR</u>	Unido a membrana Activador transcripcional del regulón <u>nod</u> en presencia de flavonoides. En algunas especies en multicopia
<u>nodE</u>		Determinante de especificidad Membranal Producción/modificación de NodRm1 y compuestos similares
<u>nodF</u>		Acarreador de acilos Determinante de especificidad Grupo prostético 4'fosfopanteteino Producción/modificación de NodRm1 y compuestos similares a NodRm1 en <u>R. leguminosarum</u>
<u>nodG</u>	Deshidrogenasa de ribitol	¿Metabolismo bacteroidal de nutrientes de la planta?
<u>nodH</u>	?	Modificación de NodRm1. ¿Sulfotransferasa?
<u>nodI</u>	Transportador de prot.	
<u>nodJ</u>	Sitio de unión de ATP	¿Membranal?
<u>nodK</u>	?	Específico de <u>Bradyrhizobium</u>
<u>nodL</u>	Acetil transferasas	Modificación de compuestos similares a NodRm1 en <u>R. leguminosarum</u> ¿Acetilación de alguna azúcar? Determinante de especificidad
<u>nodM</u>	Glucosamina-sintasa	
<u>nodN</u>	?	
<u>nodO</u>	?	Proteína de excreción Une Ca <sup>++</sup> Necesario para la infección
<u>nodP</u>	<u>cysD</u>	Necesario para enroscamiento ¿Necesario para producción/modificación de NodRm1? Junto con <u>nodQ</u> tiene actividad de ATP sulfurilasa
<u>nodQ</u>	<u>cysN</u>	Necesario para enroscamiento y para la producción/modificación de NodRm1

		Junto con <u>nodP</u> tiene actividad de ATP sulfurilasa
<u>nodR</u>	-	Represor de la expresión de genes <u>nod</u> en <u>R. meliloti</u> AK41
<u>nodS</u>	?	<u>B. japonicum</u>
<u>nodT</u>	?	¿Membrana externa?
<u>nodU</u>	?	<u>B. japonicum</u>
<u>nodV</u>	Familia de regulación de dos componentes	Determinante de especificidad Sin caja <u>nod</u>
	Sensor	<u>B. japonicum</u>
<u>nodW</u>	Familia de regulación de dos componentes	Determinante de especificidad <u>B. japonicum</u>
	Activador	Unión de ATP
<u>nodX</u>	?	Membranal
		Nodulación de chícharos primitivos
<u>nodY</u>	?	<u>B. japonicum</u>

## ANTECEDENTES

Como se ha establecido en la Introducción de este trabajo, la Genética de las etapas iniciales de la simbiosis entre las rizobiáceas y las Leguminosas, es un campo ampliamente estudiado. Las especies bacterianas que más han sido utilizadas como modelos han sido R. meliloti, R. leguminosarum bv. viciae y R. leguminosarum bv. trifolii.

El estudio de la simbiosis de R. leguminosarum bv. phaseoli con las raíces de frijol no ha llegado a niveles de caracterización genética tan fina como la de los sistemas mencionados.

La caracterización taxonómica reciente del biovar phaseoli como tal (Martínez y col., sometido), ha demostrado que las bacterias del género Rhizobium capaces de nodular frijol pertenecen a más de una especie, es decir que el nombre de R. leguminosarum bv. phaseoli incluye a grupos de bacterias que probablemente ni siquiera sean R. leguminosarum. Sin embargo para fines prácticos utilizaré la clasificación actual de las bacterias que pueden nodular raíces de frijol, pero bajo la advertencia de que ésta probablemente cambiará en un período corto. Este biovar está dividido en dos biotipos, el I y el II. El biotipo I tiene un espectro de infección estricto (sólo nodula frijol) y tiene reiteraciones de los genes estructurales de la nitrogenasa. El biotipo II tiene un espectro de infección

más amplio y no tiene reiteraciones de los genes estructurales de la nitrogenasa.

La información escasa que se encuentra sobre el tema que nos ocupa en cepas de R. leguminosarum bv. phaseoli se centra esencialmente en la cepa inglesa 8002 que no sabemos a cuál de los dos biotipos pertenece y en las cepas que utilizamos nosotros como modelo, que son la cepa CFN42 (CE3) que es un aislado mexicano biotipo I y la cepa CIAT899 aislada en Sudamérica y que hasta el momento es considerada como biotipo II. La cepa CFN42 biotipo I es considerada como un R. leguminosarum bv. phaseoli "verdadero" por los criterios establecidos recientemente por Martínez y col., op. cit.

De los genes mencionados en la introducción de esta tesis, se han descrito en la cepa 8002 (Davis y col., 1990 a y b) tres copias funcionales de nodD y dos posibles genes llamados noIP y noIE (que forma un operón con nodD1). Las mutaciones en cualquiera de estos cinco genes no causan ningún fenotipo simbiótico alterado en el laboratorio. En estos trabajos también se describió una zona que hibridiza con un probador heterólogo que contiene los genes nodABC. En la cepa CIAT899 (biotipo II) Vargas y col., op. cit. han descrito los genes nodABCDEFGHIJ, una sola copia de nodD y el gene de especificidad nodE por hibridización con probadores heterólogos. En la cepa CE3, Cevallos y col., (1990), describieron una zona que hibridiza con los genes nodABC y tres zonas que por

hibridización tienen homología con un probador que incluye al gene nodD de R. meliloti.

En estos trabajos no se pudo establecer claramente la organización de los genes nod comunes ya que en ninguno de ellos se usaron probadores intragénicos para cada uno de estos genes (excepto para nodC).

Al inicio de esta tesis, sabíamos que el cósmido pSM991.25 que contiene un fragmento de 18 kb del plasmido simbiótico de la CE3, poseía dos zonas esenciales para nodulación cuando el cósmido se encontraba en una cepa curada del plásmido simbiótico (CFN2001). Creíamos que una de ellas contenía a los genes nod comunes (nodABC) por los experimentos de hibridización mencionados anteriormente, y la otra localizada a aproximadamente 18 kb de la primera no hibridizaba con ninguno de los probadores utilizados para la caracterización de la información del pSM991.25 (nodD y nodABC de R. meliloti), por lo que el objetivo inicial del trabajo fué hacer un análisis genético y molecular fino de esta zona para determinar por qué esta información es esencial para la nodulación de la cepa CE3 en las raíces de frijol.

## Novel Organization of the Common Nodulation Genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* Strains

MARTHA VÁZQUEZ,\* ARACELI DÁVALOS, ALEJANDRO DE LAS PEÑAS, FEDERICO SÁNCHEZ,  
AND CARMEN QUINTO

Unidad de Biología Molecular y Biotecnología Vegetal, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno,  
UNAM, Apartado Postal 2-246, Cuernavaca, Morales, Mexico

Received 4 October 1990/Accepted 3 December 1990

Nodulation by *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, and *Azorhizobium* species in the roots of legumes and nonlegumes requires the proper expression of plant genes and of both common and specific bacterial nodulation genes. The common *nodABC* genes form an operon or are physically mapped together in all species studied thus far. *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* strains are classified in two groups. The type I group has reiterated *nifHDK* genes and a narrow host range of nodulation. The type II group has a single copy of the *nifHDK* genes and a wide host range of nodulation. We have found by genetic and nucleotide sequence analysis that in type I strain CE-3, the functional common *nodA* gene is separated from the *nodBC* genes by 20 kbases and thus is transcriptionally separated from the latter genes. This novel organization could be the result of a complex rearrangement, as we found zones of identity between the two separated *nodA* and *nodBC* regions. Moreover, this novel organization of the common *nodABC* genes seems to be a general characteristic of *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* type I strains. Despite the separation, the coordination of the expression of these genes seems not to be altered.

The common nodulation genes *nodA*, *nodB*, and *nodC* have been found in different *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, and *Azorhizobium* species and are required for the initiation of nodulation of legumes and nonlegumes. The *nodABC* genes have always been found together in all species studied so far. In some species, the *nodABC* genes form an operon, as shown by genetic analysis (2, 29, 39). In others, there is indirect evidence, such as nucleotide sequence analysis (15, 45, 46, 50) or induction of *nodABC::lacZ* fusions in the presence of flavonoids (2, 15, 16, 23), suggesting that the common *nod* genes could be transcribed as a polycistronic unit. In a few other cases, these genes have only been physically mapped together (1, 34).

Mutations in the *nodA*, *nodB*, or *nodC* gene prevent early events in the infection process, such as root hair curling and the initial cortical cell divisions in the root tissue (for a review, see reference 37), and completely abolish the ability to nodulate. Recent studies on the function of the Nod proteins suggest that the NodA and NodB proteins are involved in generating small, heat-stable compounds that stimulate the mitosis of various legume and nonlegume protoplasts (44). The NodA protein is found in the cytoplasm and cell envelope (21), and the NodB protein is also located in the cytosol (44). NodC is a cell surface protein with a eukaryotic receptor-like structure, which may serve as a transducer of an intracellular bacterial signal to root cells (20). It has been proposed (11) that the common *nodABC* genes are responsible for production of a basic, common signal which could be modified by the action of the host range genes. This specific factor, NodRml, has recently been purified in *Rhizobium meliloti*; it is a sulfated  $\beta$ -1,4-tetrasaccharide of D-glucosamine (24).

The product of the *nodD* gene, acting as a positive regulator in combination with plant flavonoid compounds,

induces the expression of common *nodABC* genes and other *nod* genes. The NodD product has been found in the cytoplasmic membrane, and its localization does not change in the presence of the inducer (43).

The NodD protein binds to the *nod* box (13, 14, 17, 22), a strongly conserved regulatory sequence found upstream of all inducible *nod* genes (40). Negative regulation of *nod* gene expression has been reported in some genetic backgrounds in *R. meliloti* and is mediated by a putative repressor recognizing the RNA polymerase binding site (22). The mechanism of interaction between NodD, the *nod* box, the flavonoids, the repressor (if such is the case), and RNA polymerase to promote expression is not yet well established.

Many flavonoid compounds produced by seeds or root exudates have been described as having particular capacities to induce or repress transcription of the common *nodABC* genes and other *nod* genes (reviewed in reference 36). This specificity depends on the presence of the different *nodD* products described for each species. In contrast to other fast-growing rhizobia, it has been shown that in the *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* type I strain CE-3, isoflavones such as genistein and diadzein are good inducers of common *nod* gene expression, as is the flavanone naringenin (41).

The *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* group has been classified into two types. The type I strains are defined by the reiteration of the *nifHDK* genes and a narrow host range of nodulation. In contrast, the type II strains have one copy of the *nifHDK* genes and have a broad host range of nodulation (4).

Studies of *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* 8002 (8, 9) demonstrate that it harbors three functional *nodD* copies, two of them tightly linked and the third mapping near to a common *nod* region, defined by hybridization to a *nodABC* probe from *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Nevertheless, it is not clear from those studies whether the *nodA* gene is present in this hybridizing region.

\* Corresponding author.

TABLE 1. Bacterial strains, plasmids, cosmids, and bacteriophages used

Strain, plasmid, cosmid, or bacteriophage	Relevant characteristics	Source or reference
<b>Strains</b>		
<i>R. leguminosarum</i> bv. phaseoli		
CE-3	Spontaneous Str <sup>r</sup> derivative of wild-type strain CFN42; Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup>	31
CFN-2001	Rif <sup>r</sup> derivative of CFN-42 cured of plasmids p42a and p42d; Nod <sup>-</sup> Fix <sup>-</sup>	32
UBP101	CE-3 with pRp30	This work
UBP102	CE-3 derivative with <i>nodA::Mu dIIIPR13</i> in p42d	This work
UBP201	CFN-2001 with pRp30	This work
UBP301	CE-3 with pRp32	This work
UBP401	CFN-2001 with pRp32	This work
Bra-8	<i>R. leguminosarum</i> bv. phaseoli type I strain	33
Viking-I	<i>R. leguminosarum</i> bv. phaseoli type I strain	27
Nitragin-8251	<i>R. leguminosarum</i> bv. phaseoli type I strain	27
CFN-3	<i>R. leguminosarum</i> bv. phaseoli type I strain	27
<i>E. coli</i>		
MC4100 (Mu cts)	<i>araD139 Δ(argF-lacIPOZYA)U169 rpsL150 relA1 fibB5301 ptsF25 deoC1</i> (Mu cts)	6
M8820 (Mu c <sup>+</sup> )	<i>araD139 Δ(araCOIB.A-leu)7679 Δ(proAB-argF-lacIPOZYA)XIII rpsL</i> (Mu c <sup>+</sup> )	5
HB101	F <sup>-</sup> <i>hsdS20-recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 ml-1 supE44</i>	3
<b>Plasmids</b>		
pRK2013	ColE1 <i>mob</i> <sup>+</sup> <i>Tra</i> <sup>+</sup> (RK2) Km <sup>r</sup>	12
pNC206	IncP1 Cb <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	A. Pühler
pUC19	ColE1 replicon; Ap <sup>r</sup>	53
<b>Cosmids</b>		
pSUP205	ColE1 replicon; <i>cos</i> Tc <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup>	47
pSM991.25	pSUP205 with 18.5 kb from p42d cloned in the <i>EcoRI</i> site; Tc <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup>	7
pSM991.44	pSUP205 with a 3.5-kb <i>EcoRI</i> fragment containing <i>nodA</i> from pSM991.25	7
pRp30	pSM991.44 with <i>nodA::Mu dIIIPR13</i> ; Tc <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup>	This work
pRP32	pSUP205 with a 6.8-kb <i>EcoRI</i> fragment from pSM991.25 <i>nodC::Mu dIIIPR13</i>	This work
<b>Bacteriophage</b>		
Mu dIIIPR13	<i>lacZYA</i> Cm <sup>r</sup>	35

In a previous work (7), we identified two nodulation regions from the symbiotic plasmid of *R. leguminosarum* bv. phaseoli type I strain CE-3 by complementation of a nodulation-deficient strain and by insertional mutagenesis analysis. Mutations in both regions prevent nodulation of bean roots by this complemented strain. Region I, a 6.8-kb *EcoRI* fragment, was associated with the common *nod* genes by heterologous DNA-DNA hybridization criteria, using *nodAB*, *nodBC*, and *nodC* *R. meliloti* probes. Region II, a 3.5-kb *EcoRI* fragment, did not hybridize with these *R. meliloti* common *nod* gene probes in those experiments (7). Here, we show that region II does contain the functional and essential common *nodA* gene and that the separation of *nodA* from *nodBC* is a common arrangement in *R. leguminosarum* bv. phaseoli type I strains.

#### MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains, plasmids, and media.** Bacterial strains and plasmids are described in Table 1. *R. leguminosarum* bv. phaseoli strains were grown in peptone-yeast medium (31) or in medium containing yeast extract and mannitol (18) for determination of  $\beta$ -galactosidase activities. *Escherichia coli* strains were grown as described by Maniatis et al. (26) or in Luria broth medium (28) supplemented with 5 mM CaCl<sub>2</sub> and 200 mM MgSO<sub>4</sub>. The media were supplemented with tetracycline (3  $\mu$ g/ml), chloramphenicol (12  $\mu$ g/ml), nalidixic acid (20  $\mu$ g/ml), kanamycin (30  $\mu$ g/ml), streptomycin (100  $\mu$ g/ml), and rifampin (50  $\mu$ g/ml) for *Rhizobium* strains and with tetracycline (10  $\mu$ g/ml), ampicillin (200  $\mu$ g/ml), chloramphenicol (30  $\mu$ g/ml), and kanamycin (30  $\mu$ g/ml) for *E. coli* strains. *Rhizobium* strains and *E. coli* thermosensitive strains were grown at 30°C. Other *E. coli* strains were grown

at 37°C. 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-Gal) and isopropylthiogalactoside (IPTG) were added to the media at a final concentration of 25  $\mu$ g/ml each when needed.

**Genetic techniques.** To obtain *nodA::lacZ* translational fusions, cosmid pSM991.44 (Tc<sup>r</sup>), which carries the *R. leguminosarum* bv. phaseoli CE-3 *nodA* gene, was mutagenized with the bacteriophage Mu dIIIPR13, which has the *E. coli lacZYA* operon without a promoter and the *cat* gene (Cm<sup>r</sup>) (35). The cosmid was introduced in *E. coli* MC4100(Mu cts)(Mu dIIIPR13) by triparental mating, using pRK2013 (Km<sup>r</sup>) as a helper plasmid and selecting for Cm<sup>r</sup>, Tc<sup>r</sup>, and Km<sup>r</sup> colonies. Thermoinduction of the bacteriophage was performed as described previously (7). After infection, Cm<sup>r</sup> and/or Tc<sup>r</sup> transductants were selected.

Homogenotization was done by triparental mating of the CE-3 wild-type receptor strain, using pRK2013 as a helper plasmid and M8820(Mu c<sup>+</sup>)/pRp30 (Cm<sup>r</sup> Tc<sup>r</sup>) and selecting for Cm<sup>r</sup> Tc<sup>r</sup> colonies.

**DNA manipulation and sequencing.** Recombinant DNA techniques were carried out as described by Maniatis et al. (26). DNA sequencing was done by the dideoxy-chain termination method (42), using the pUC vector system (53) and the Sequenase version 2.0 sequencing kit (U.S. Biochemical Corp.). To sequence the 5'-3' chain of the *nod* box region and the 3'-5' chain from nucleotides 45 to 62 from the *nodA* gene, two oligonucleotides of 20- and 22-base length with the sequences 5'-GAAGTTGGAGCCCCGCCGCT-3' and 5'-GGGCGTTGTAAGCTCCAGTTGG-3', respectively, were used. The nucleotide sequence reported was read in both DNA strands at least twice, and all overlaps were checked except nucleotides -290 to -196 in Fig. 2, for which only the 5'-3' chain was read.

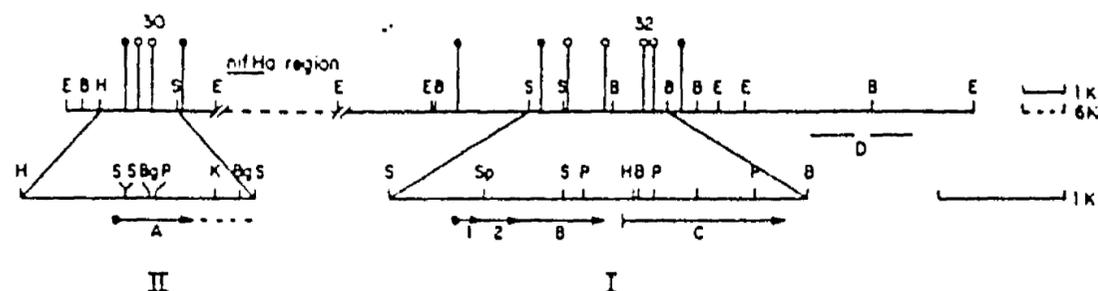


FIG. 1. Nodulation region of symbiotic plasmid p42d from strain CE-3 harbored in pSM991.25. Sequenced regions are amplified. E, *EcoRI*; B, *BamHI*; H, *HindIII*; S, *SstI*; P, *PstI*; Bg, *BglII*; K, *KpnI*; A, *nodA*; 1 and 2, ORF1 and ORF2, respectively; B, *nodB*; C, *nodC*; D, *nodD*; I, region I; II, region II. The broken line downstream of *nodA* indicates the *nodB*-like region; vertical lines indicate different insertions sites isolated in pSM991.25; *nod* boxes are indicated by filled circles at the left of the indicated ORFs or genes; 30 and 32 indicate the insertion sites of Mu dIIPR13 in pRp30 and pRp32, respectively. ●, Nod<sup>+</sup> phenotype; ○, Nod<sup>-</sup> phenotype of strain CFN-2001 harboring pSM991.25 with different insertions. The broken line in the nonamplified map indicates a deletion of the original isolate.

The *R. leguminosarum* bv. phaseoli gene probes used in DNA-DNA hybridizations of total DNAs of different type I strains were a 0.3-kb *PstI-SstI* fragment from *nodA*, a 0.7-kb *SphI-PstI* fragment from *nodB*, and a 0.9-kb *BamHI-PstI* fragment from *nodC*. All probes are intragenic except for the *nodB* probe, which also carries almost the entire open reading frame 2 (ORF2) region.

Homologous DNA-DNA hybridizations were done in phosphate buffer at 65°C, and heterologous hybridizations were done in 30% formamide at 42°C (26).

Computer sequence analysis. The nucleotide sequence analyses were carried out by using the Genetics Computer Group sequence analysis software package (version 6.0) (10). Initially, the analysis was made with the FASTA and FASTAP programs. The percentages of nucleotide and peptide identities and similarities were obtained from the GAP program.

Determination of  $\beta$ -galactosidase activities. Assays of  $\beta$ -galactosidase were carried out as described by Zaat et al. (54). Naringenin (120 nM), genistein (440 nM), or bean root exudate was added, depending on the case. The cultures were concentrated 10-fold in 10 mM MgSO<sub>4</sub>; 0.1 ml was used for  $\beta$ -galactosidase activity determination (28), and 0.1 ml was used for determination of protein concentration (25).

Preparation of bean root exudates. The procedure was done as described by van Brussel et al. (51) and Zaat et al. (54). Sterile exudates were concentrated 10-fold by vacuum evaporation at 0°C and were used as 10-fold stocks in induction growth conditions for the determination of  $\beta$ -galactosidase activities. As for naringenin and genistein, higher concentrations of exudate do not cause higher induction.

Plant nodulation tests. The nodulation tests were done as described before (7). Bacteria from nodules were isolated and checked for antibiotic markers and for the DNA-DNA hybridizations patterns.

Nucleotide sequence accession numbers. The sequences reported for regions I and II will appear in the EMBL, GenBank, and DDBJ nucleotide sequence data bases under accession numbers M58626 and M58625, respectively.

## RESULTS

Genetic analysis of region II. As shown in our previous work (7), cosmid pSM991.25 (Fig. 1) is a deletion derivative of cosmid pSM991 carrying 18 kb from the strain CE-3 symbiotic plasmid (pSym). pSM991.25 has two essential regions for nodulation when tested in a pSym<sup>-</sup> background (strain CFN-2001): region I, a 6.8-kb *EcoRI* fragment that hybridizes with *R. meliloti nodAB*, *nodBC*, and *nodC*

probes; and region II, a 3.5-kb *EcoRI* fragment that does not hybridize with any of these probes. To test whether the information harbored in region II was essential for nodulation also in the wild-type background, we homogenized a mutation in region II in the strain CE-3 symbiotic plasmid. For that purpose, we constructed a Mu dIIPR13 insertion collection in cosmid pSM991.44 which harbors only region II, as described in Materials and Methods. A total of 400 mutations were screened for inducibility by 120 nM naringenin in MM media with X-Gal; the insertions in 30 inducible colonies were mapped with the restriction enzymes *EcoRI*, *BamHI*, and *PstI*. We selected cosmid pRp30 for homogenization because it had an insertion mapping exactly at the same site (Fig. 1) of the previously obtained mutations in cosmid pSM991.25 (pRp23 and pRp24) (7).

The mutation contained in pRp30 was homogenized as described in Materials and Methods. Various colonies were screened by Southern hybridization, using as a probe cosmid pSM991.44, to verify that the mutation had recombined with its homologous wild-type sequence (data not shown). The resulting strain was designated UBP102. Five independent colonies of this strain were used to inoculate five bean seedlings each, to test their nodulation ability. None of the inoculated plants had any nodules after 20 days of growth.

We complemented strain UBP102 with cosmid pSM991.44, which carries the wild-type allele in the 3.5-kb *EcoRI* fragment. Three colonies from the complemented strain were tested for bean nodulation. All plants inoculated with this strain had nodules at the same time, number, and size as the plants inoculated with strain CE-3.

Analysis of the nucleotide sequences of region I and II genes of pSM991.25. The information obtained from the nucleotide sequences of regions I and II is presented in Fig. 1 to 3.

In region II (Fig. 2), we found a 585-nucleotide-long ORF. This ORF codifies for a putative peptide with a molecular weight of 21,870 and shows identity to the NodA peptide sequence from other species (Table 2). These data, taken together with the Nod<sup>-</sup> phenotype of strain UBP102, lead us to propose that this ORF encodes the *R. leguminosarum* bv. phaseoli CE-3 *nodA* gene. We sequenced approximately 400 nucleotides downstream of the *nodA* gene. The longer ORFs found in the 5'-3' and in the 3'-5' strands of this region are 43 and 61 amino acids long, respectively, and they are still open at the end of the reported sequence. Searches of data bases for homology of this 400-nucleotide sequence revealed no significant identity.

Region I has four ORFs (Fig. 3). ORF3 spans from nucleotides 455 to 1141. The ORF3 derived peptide sequence





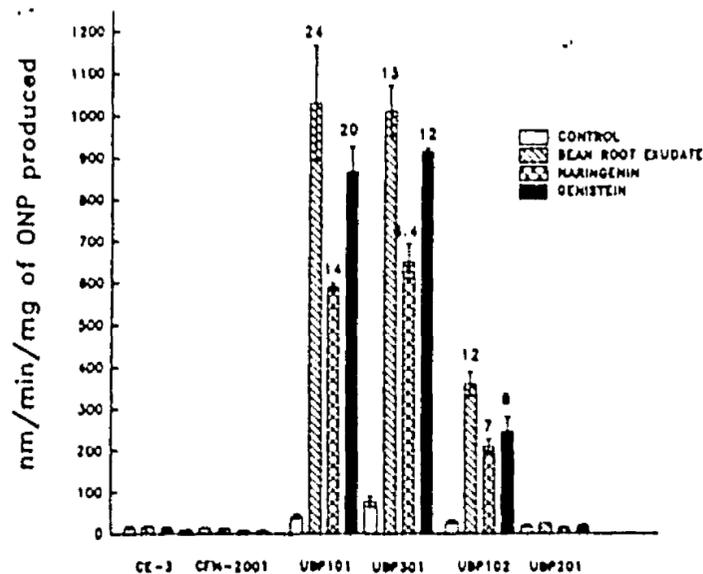


FIG. 5. Expression of *nodA::lacZ* and *nodC::lacZ* fusions in *R. leguminosarum* bv. phaseoli strains. All strains are described in Table 1.  $\beta$ -Galactosidase activities were measured at least three times, and all standard deviations are less than 20%. Cultures were grown without inducer, with naringenin (120 nM), with genistein (440 nM), or with bean root exudate as described in Materials and Methods. Numbers above the bars indicate fold induction with respect to the control. ONP, o-Nitrophenol.

that is 64% identical to the *nod* box consensus sequence but with a 22-base-long insertion (Fig. 4C) in the 3' end of the *nodA* coding region, from nucleotides 458 to 525. This sequence is 58 nucleotides upstream of the TGA codon of the *nodA* gene preceding the mentioned *nodB*-like sequences. The ORF1-ORF2-*nodB*-*nodC* region is also preceded by a sequence from nucleotides -95 to -31 which is 83% identical to the consensus *nod* box sequence (Fig. 4C). There are no sequences suggestive of promoters or terminators between the *nod* box sequence and the end of *nodC*.

Expression of genes found in regions I and II of cosmid pSM991.25. We measured the levels of expression of *nodA::lacZ* and *nodC::lacZ* fusions (pRp 30 and pRp32, respectively; Table 1 and Fig. 1) in the presence (strains UBP101 and UBP301) or absence (strains UBP201 and UBP401) of the symbiotic plasmid. We also measured expression of the *nodA* homogenotized mutation in the symbiotic plasmid in strain UBP102. The flavanone naringenin, the isoflavone genistein, and bean root exudates were used as inducers of expression.

When plasmid pRp30 or pRp32 was in strain CFN-2001 (pSym cured), there was no induction in any case (Fig. 5; data not shown for UBP401). When these plasmids were in the CE-3 background (pSym<sup>+</sup>), naringenin induced  $\beta$ -galactosidase expression from a basal level of 43 to 592 nm/min/mg in pRp30 and from 77 to 651 nm/min/mg in pRp32, representing increments of 14- and 8.4-fold, respectively.

Genistein was a slightly better inducer, although a 440 nM concentration was required to obtain maximal induction. Strains harboring plasmid pRp30 had activity of 870 nm/min/mg, and those with pRp32 had activity of 917 nm/min/mg, which represented 20- and 12-fold induction, respectively. Strain UBP102, which carries the *nodA* homogenotized mutation, maintained the same regulation pattern as the multicopy plasmid pRp30, although since this strain carries the mutation in only one copy, the absolute values of  $\beta$ -galactosidase activities were lower. The basal level of

$\beta$ -galactosidase activity was 30 nm/min/mg; naringenin induced expression to 210 nm/min/mg (sevenfold induction), and genistein increased expression to 247 nm/min/mg (eightfold induction).

In all of the mutant pSym<sup>+</sup> strains tested, the bean root exudates were the best inducers, giving activity levels of 1,031 nm/min/mg for strain UBP101 (pRp30 plasmid), 1,013 nm/min/mg for strain UBP301 (pRp32 plasmid), and 361 nm/min/mg for strain UBP102, representing 24-, 13-, and 12-fold induction, respectively.

Thus, the fold induction of the *nodC::lacZ* fusion was, in general, almost half that of the *nodA::lacZ* fusion with all inducers tested, when measured in the multicopy plasmids harbored in the wild-type background. In the pSym-cured background there was no induction of any of these fusions in any condition.

Separation of *nodA* from *nodBC* genes is a common feature of *R. leguminosarum* bv. phaseoli type I strains. We have shown that in strain CE-3, *nodA* is separated from *nodBC* genes by 20 kb. To test whether this arrangement is common to other *R. leguminosarum* bv. phaseoli type I strains, we made a restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of *nodA*, *nodB*, and *nodC* genes in other strains. We selected five strains representing the genetic diversity found by Piñero et al. (33) in a population genetics study of this group. Total DNAs from strains Viking-I, Nitragin-8251, CFN-3, Bra-S, and CE-3 were digested with *EcoRI*, *HindIII*, and *SstI* and were hybridized with *nodA*-, *nodB*-, and *nodC*-specific probes obtained from strain CE-3. The RFLP patterns obtained with the *nodB* and *nodC* probes had the same signal in two of the three restriction enzyme pattern (Table 3), which strongly suggests that in all of these strains *nodB* and *nodC* are found together. In contrast, the RFLP pattern obtained with the *nodA* probe never coincided with the *nodB* and *nodC* RFLP patterns (Table 3), indicating that in all of these strains the *nodA* gene is separated from *nodB* and *nodC* genes.

## DISCUSSION

We report here that in *R. leguminosarum* bv. phaseoli CE-3, the unique and functional *nodA* gene is separated by 20 kb from the *nodBC* genes. This arrangement apparently is a general feature of the *R. leguminosarum* bv. phaseoli type I strains.

In a previous work (7), we found that the cosmid pSM991.25 harbors two essential regions for nodulation; region I showed similarity to plasmid pKSK5, which harbors the *nodABC* genes, but we were not able to find any similarity to region II with this plasmid. Further experiments have shown that the identity does exist, and this conclusion was finally confirmed by nucleotide sequence data analysis (Fig. 2 and 3).

Strain UBP102 harbors a homogenotized *nodA* mutation in pSym. This strain had a Nod<sup>-</sup> phenotype. When we complemented strain UBP102 with its respective wild-type region in *trans*, the Nod<sup>+</sup> phenotype was restored, demonstrating that the altered nodulation phenotype is caused only by the introduced mutation. On the other hand, a homogenotized *nodC* insertion in pSym and mutations in the *nodB* gene harbored in cosmid pSM991.25 in strain CFN-2001 also cause a Nod<sup>-</sup> phenotype (7). Thus, these *nodABC* genes are unique and essential for nodulation in strain CE-3.

Nucleotide sequence analysis of the genes found in both regions describes a completely different organization of common *nod* genes in strain CE-3 (Fig. 1) compared with

TABLE 3. *nodA*, *nodB*, and *nodC* RFLPs of different *R. leguminosarum* bv. phaseoli type I strains

Strain <sup>a</sup>	Hybridizing fragment size (kb) <sup>b</sup>								
	<i>Eco</i> RI			<i>Hind</i> III			<i>Sst</i> I		
	<i>nodA</i>	<i>nodB</i>	<i>nodC</i>	<i>nodA</i>	<i>nodB</i>	<i>nodC</i>	<i>nodA</i>	<i>nodB</i>	<i>nodC</i>
CE-3	3.5	<u>6.9</u>	<u>6.9</u>	4.8	9.1	15.1	1.0	<u>5.0</u> 1.4	<u>4.9</u>
Bra-8	3.6	<u>4.2</u>	<u>4.2</u>	5.2	2.4	15.1	1.0	<u>5.6</u>	<u>5.6</u>
Viking-1	4.7	<u>5.6</u>	<u>5.6</u>	6.4	12.6	15.1	1.0	<u>5.6</u>	<u>5.6</u>
Nitragin-8251	3.8	<u>7.2</u>	<u>7.2</u>	5.4	8.7	15.1	1.0	<u>5.0</u> 1.4	<u>4.9</u>
CFN-3	3.5	<u>5.7</u>	<u>5.9</u>	3.5	8.5	15.1	1.0	<u>5.6</u>	<u>5.6</u>

<sup>a</sup> See Table 1 for descriptions.

<sup>b</sup> Determined by Southern blot hybridization of total DNA digested with *Eco*RI, *Hind*III, and *Sst*I and probed with *nodA*, *nodB*, and *nodC* *R. leguminosarum* bv. phaseoli CE-3 probes. Underlined numbers indicate that the same *Eco*RI or *Sst*I fragments hybridized when the *nodB* or *nodC* probe was used in each strain.

that reported for all of the strains from different genera described up to now, including a strain from the *R. leguminosarum* bv. phaseoli type II group (52). Nevertheless, the molecular weights and derived peptide sequences of the products from these genes are very similar to those found for the NodABC products from other species (Table 2).

Upstream of the *nodB* and *nodC* genes are two very short ORFs. Both ORFs are preceded by a *nod* box and have putative Shine-Dalgarno sequences, but we do not know whether they are translated. The mutations in this region conferred a Nod<sup>-</sup> phenotype when harbored in cosmid pSM991.25 in a pSym<sup>-</sup> background, but this phenotype could be due to a polarity over the genes localized downstream these two ORFs. ORF1 has no identity or similarity to any *nod* gene reported. Further analysis must be done to establish the functionality of these sequences.

In other species in which the *nodABC* genes form an operon, the *nodA* translation stop codon overlaps the *nodB* initiation codon, as found here for the proposed ORF2 stop codon, which overlaps the *nodB* initiation codon.

In strain CE-3, the distance from the *nodB* stop codon to any of the putative ATG codons of *nodC* is more than 100 nucleotides. In contrast, this distance is 20 to 30 nucleotides in other rhizobia (15, 38, 45, 46, 50). There are no putative promoters or terminators in this long sequence. It seems very likely that ORF1, ORF2, *nodB*, and *nodC* could be transcribed as an operon.

There is some identity between nucleotide sequences localized in regions I and II (Fig. 4A and B). These identities are between ORF2 and the *nodA* gene and between a sequence localized downstream of the *nodA* and *nodB* genes. Moreover, these identities are also found, and in some cases are more extended, with the common *nod* genes from other species; for instance, ORF2 has the most extended identity (64%) to the *nodA* gene from *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Downie; GenBank number Y00548), while the most extended identity found from the *nodB*-like sequences, downstream of the *nodA* gene, is to the *R. meliloti* 41 *nodB* gene (50). We sequenced only 400 nucleotides downstream of the *nodA* gene, and we do not know whether the identity to *nodB* extends beyond this point. Nevertheless, in the last 100 nucleotides of this region we did not find any *nodB*-like motif, and this is the zone where we have found two putative ORFs still open at the end of the reported sequence. An insertion at this point (pRp22) (7) does not cause any altered nodulation phenotype. Thus, we know that in this 400-nucleotide region there is neither a functional *nodB* gene nor any other essential nodulation genes. We

have also found a *nod* box-like sequence within the *nodA* coding region (Fig. 4C). Although this sequence is not a perfect *nod* box, it precedes the *nodB*-like zones. The particular organization of the common *nod* genes in strain CE-3 could be the result of a complex rearrangement which occurred in a previous structure of these genes. Whatever its cause, it should have occurred before the diversification of the *R. leguminosarum* bv. phaseoli type I strains, as this organization seems to be a general phenomenon in this group of rhizobia, as suggested by our *nodABC* RFLP analysis (Table 3).

Both the *nodA* and ORF1-ORF2-*nodB*-*nodC* cistrons show *nod* boxes upstream of these genes (Fig. 4C). The distances from the *nod* boxes to the *nodA* and ORF1 initiation codons are 74 and 30 nucleotides, respectively. Both are shorter distances than those found in other *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species, in which the distance between the *nod* box and the initiation codon of the first ORF found at the common *nod* operon is between 150 and 200 bases (30, 46, 48). Both *nod* boxes are similar to the consensus sequence. Nevertheless, they are less conserved with respect to the consensus sequence than are the *nod* boxes found at the 5' end of the *nodA* genes from diverse species.

Although the *nod* boxes in the two regions are different from one another, we could not find any differential expression of the *nodA* or *nodC* gene with the different inducers used. The two genes' general patterns of regulation seem to be similar when the fusions are harbored in multicopy plasmids in the wild-type strain CE-3 (Fig. 5). Expression of the *nodC-lacZ* fusion is in all cases lower than expression of the *nodA-lacZ* fusion. Thus, although the organization of the common *nod* genes is different in strain CE-3, the regulation seems not to be grossly affected. In consequence, it is probable that the same regulatory molecule(s) could be inducing or repressing the expression of these genes, giving as a final result a coordinated NodABC production, as found when these genes are organized as an operon. Nevertheless, we are still searching for a possible difference of regulation, exploiting the advantage of the natural separation of these genes in *R. leguminosarum* bv. phaseoli type I strains.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the U.S. National Academy of Sciences/National Research Council by means of grant BNF-MX-6877 from the Agency for International Development and by EEC grant CII-0105-MEX.

We thank J. Miranda and O. Santana for technical assistance, L. Segovia for help in computer analysis, and A. Covarrubias for critical review of the manuscript. M. V. was supported by a Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología fellowship.

## REFERENCES

- Bachem, C. W. B., E. Kondorosi, Z. Banfalvi, B. Horvath, A. Kondorosi, and J. Schell. 1985. Identification and cloning of nodulation genes from the wide host range *Rhizobium* strain MPIK-3030. *Mol. Gen. Genet.* 199:271-278.
- Banfalvi, Z., A. Nieuwkoop, M. Schell, L. Besl, and G. Stacey. 1988. Regulation of *nod* gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Gen. Genet.* 214:420-424.
- Boyer, H. W., and D. Roulland-Dussoix. 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41:459-472.
- Brom, S., E. Martínez, G. Dávila, and R. Palacios. 1988. Narrow and broad host-range plasmids of *Rhizobium* spp. strains that nodulate *Phaseolus vulgaris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1820-1823.
- Casadaban, M. J. 1975. Fusion of the *Escherichia coli lac* genes to the *ara* promoter: a general technique using bacteriophage Mu-1 insertions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:809-813.
- Casadaban, M. J. 1976. Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *E. coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J. Mol. Biol.* 104:541-555.
- Cevallos, M. A., M. Vázquez, A. Dávalos, G. Espín, J. Sepúlveda, and C. Quinto. 1989. Characterization of *Rhizobium phaseoli* Sym plasmid regions involved in nodule morphogenesis and host-range specificity. *Mol. Microbiol.* 3:879-889.
- Davis, E. O., and A. W. B. Johnston. 1990. Analysis of three *nodD* genes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*; *nodD1* is preceded by *nodE*, a gene whose product is secreted from the cytoplasm. *Mol. Microbiol.* 4:921-932.
- Davis, E. O., and A. W. B. Johnston. 1990. Regulatory functions of the three *nodD* genes of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Mol. Microbiol.* 4:933-941.
- Deveraux, J., P. Haeberli, and O. Smithies. 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* 12:387-395.
- Faucher, C., S. Camut, J. Denarié, and G. Truchet. 1989. The *nodH* and *nodQ* host range genes of *Rhizobium meliloti* behave as avirulence genes in *R. leguminosarum* bv. *viciae* and determine changes in the production of plant-specific extracellular signals. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2:291-300.
- Figurski, D. H., and D. R. Helinski. 1979. Replication of an origin containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided *in trans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:1648-1652.
- Fisher, R. F., T. T. Egelhoff, J. T. Mulligan, and S. R. Long. 1988. Specific binding of proteins from *Rhizobium meliloti* cell-free extracts containing NodD to DNA sequences upstream of inducible nodulation genes. *Genes Dev.* 2:282-293.
- Fisher, R. F., and S. R. Long. 1989. DNA footprint analysis of the transcriptional activator proteins NodD1 and NodD3 on inducible *nod* gene promoters. *J. Bacteriol.* 171:5492-5502.
- Goethals, K., M. Gao, K. Tomekpe, M. Van Montagu, and M. Holsters. 1989. Common *nodABC* genes in *Nod* locus 1 of *Azorhizobium caulinodans*: nucleotide sequence and plant-inducible expression. *Mol. Gen. Genet.* 219:289-298.
- Gottfert, M., B. Horvath, E. Kondorosi, R. Putnoky, F. Rodríguez-Quiñones, and A. Kondorosi. 1986. At least two *nodD* genes are necessary for efficient nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J. Mol. Biol.* 191:411-426.
- Hong, G. F., J. E. Burn, and A. W. B. Johnston. 1987. Evidence that DNA involved in the expression of nodulation (*nod*) genes in *Rhizobium* binds to the product of the regulatory gene *nodD*. *Nucleic Acids Res.* 15:9677-9690.
- Hooykaas, P. J. J., P. M. Klapwijk, M. P. Nutt, R. A. Schilperoort, and A. Rorsch. 1977. Transfer of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid to avirulent agrobacteria and to *Rhizobium ex planta*. *J. Gen. Microbiol.* 98:477-484.
- Jacobs, T. W., T. T. Egelhoff, and S. R. Long. 1985. Physical and genetic map of a *Rhizobium meliloti* nodulation region and nucleotide sequence of *nodC*. *J. Bacteriol.* 162:469-476.
- John, M., J. Schmidt, U. Wieneke, H. D. Krüssmann, and J. Schell. 1988. Transmembrane orientation and receptor-like structure of the *Rhizobium meliloti* common nodulation protein NodC. *EMBO J.* 7:583-588.
- Johnson, D., L. Evans Roth, and G. Stacey. 1989. Immunogold localization of the *nodC* and *nodA* proteins of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 171:4583-4588.
- Kondorosi, E., J. Gyuris, J. Schmidt, M. John, E. Duda, B. Hoffman, J. Schell, and A. Kondorosi. 1989. Positive and negative control of *nod* gene expression in *Rhizobium meliloti* is required for optimal nodulation. *EMBO J.* 8:1331-1340.
- Kosslak, R. M., R. Bookland, J. Barkel, H. E. Paaren, and E. R. Appelbaum. 1987. Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common *nod* genes by isoflavones isolated from *Glycine max*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7428-7432.
- Lerouge, P., P. Roche, C. Faucher, F. Mallet, G. Truchet, J. C. Promé, and J. Denarié. 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature (London)* 344:781-784.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Martínez, E., M. A. Pardo, R. Palacios, and M. A. Cevallos. 1985. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *J. Gen. Microbiol.* 131:1779-1786.
- Miller, J. H. 1972. *Experiments in molecular genetics*, p. 433. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Mulligan, J. T., and S. R. Long. 1985. Induction of *Rhizobium meliloti nod* expression by plant exudate requires *nodD*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:6609-6613.
- Nieuwkoop, A. J., Z. Banfalvi, N. Deshmene, D. Gerhold, M. G. Schell, K. M. Sirotkin, and G. Stacey. 1987. A locus encoding host range is linked to the common nodulation genes of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 169:2631-2638.
- Noel, K. D., A. Sánchez, L. Fernández, J. Leemans, and M. A. Cevallos. 1984. *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5. *J. Bacteriol.* 158:148-155.
- Palacios, R., C. Quinto, H. de la Vega, M. Flores, L. Fernández, M. Hernández, T. Ballado, and G. Soberón. 1983. General organization of nitrogen fixation genes in *Rhizobium phaseoli*, p. 164-168. In A. Pühler (ed.), *Molecular genetics of bacteria-plant interactions*. Springer Verlag KG, Berlin.
- Piñero, D., E. Martínez, and R. K. Selander. 1988. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2825-2832.
- Ramakrishnan, N., R. K. Prakash, S. Shantaram, N. M. Duteau, and A. G. Atherly. 1986. Molecular cloning and expression of *Rhizobium fredii* USDA 193 nodulation genes: extension of host range for nodulation. *J. Bacteriol.* 168:1087-1095.
- Ratet, P., J. Schell, and F. J. de Bruijn. 1988. Mini-Mulac transposons with broad-host-range origins of conjugal transfer and replication designed for gene regulation studies in Rhizobiacea. *Gene* 63:41-52.
- Rolfe, B. G. 1988. Flavones and isoflavones as inducing substances of legume nodulation. *Biofactors*. 1:3-10.
- Rolfe, B. G., and P. M. Gresshoff. 1988. Genetic analysis of legume nodule initiation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39:297-319.
- Rossen, L., A. W. B. Johnston, and J. A. Downie. 1984. DNA sequence of the *Rhizobium leguminosarum* nodulation genes *nodAB* and *C* required for root hair curling. *Nucleic Acids Res.* 12:9497-9508.
- Rossen, L., C. A. Shearman, A. W. B. Johnston, and J. A. Downie. 1985. The *nodD* gene of *Rhizobium leguminosarum* is autoregulatory and in the presence of plant exudate induces the

- nodABC* genes. EMBO J. 4:3369-3373.
40. Rostas, K., E. Kondorosí, B. Horvath, A. Simoncsits, and A. Kondorosí. 1986. Conservation of extended promoter regions of nodulation genes in *Rhizobium*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:1757-1761.
  41. Sánchez, F., C. Quinto, M. Vázquez, H. Spaink, C. A. Wijffelman, M. A. Cevallos, A. de las Peñas, F. Campos, J. Padilla, and M. Lara. 1988. The symbiotic association of *Phaseolus vulgaris* and *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, p. 370-375. In R. Palacios and D. P. S. Verma (ed.), Molecular genetics of plant-microbe interactions. Proceedings of the 4th International Symposium on Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. APS Press, Minnesota.
  42. Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467.
  43. Schlaman, H. R. M., H. P. Spaink, R. J. H. Okker, and B. J. J. Lugtenberg. 1989. Subcellular localization of the *nodD* gene product in *Rhizobium leguminosarum*. J. Bacteriol. 171:4686-4693.
  44. Schmidt, J. R., R. Wingender, M. John, U. Wieneke, and J. Schell. 1988. *Rhizobium meliloti nodA* and *nodB* genes are involved in generating compounds that stimulate mitosis of plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8578-8582.
  45. Schofield, P. R., and J. M. Watson. 1986. DNA sequence of *Rhizobium trifolii* nodulation genes reveals a reiterated and potentially regulatory sequence preceding *nodABC* and *nodFE*. Nucleic Acids Res. 14:2891-2903.
  46. Scott, K. F. 1986. Conserved nodulation genes from the non-legume symbiont *Bradyrhizobium* sp. (Parasponia). Nucleic Acids Res. 14:2905-2919.
  47. Simon, R., U. Priefer, and A. Pühler. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. Biotechnology 1:784-791.
  48. Spaink, H. P., R. J. H. Okker, C. A. Wijffelman, E. Pees, and B. J. J. Lugtenberg. 1987. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. Plant Mol. Biol. 9:29-37.
  49. Stormo, G. D., T. D. Schneider, and L. M. Gold. 1982. Characterization of translational initiation sites in *E. coli*. Nucleic Acids Res. 9:2971-2996.
  50. Török, I., E. Kondorosí, T. Stepkowski, J. Posfai, and A. Kondorosí. 1984. Nucleotide sequence of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. Nucleic Acids Res. 12:9509-9524.
  51. van Brussel, A. A. N., S. A. J. Zaat, H. C. J. Canter-Cremers, C. A. Wijffelman, E. Pees, T. Tak, and B. J. J. Lugtenberg. 1986. Role of plant root exudate and Sym plasmid-localized nodulation genes in the synthesis by *Rhizobium leguminosarum* of TSR factor which causes thick and short roots on common vetch. J. Bacteriol. 165:517-522.
  52. Vargas, C., L. J. Martínez, M. Megías, and C. Quinto. 1990. Identification and cloning of nodulation genes and host specificity determinants of the broad host-range *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* strain CIAT899. Mol. Microbiol. 4:●●●-●●●.
  53. Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC vectors. Gene 33:103-119.
  54. Zaat, S. A. J., C. A. Wijffelman, H. P. Spaink, A. A. N. van Brussel, R. J. H. Okker, and B. J. J. Lugtenberg. 1987. Induction of the *nodA* promoter of *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1 by plant flavanones and flavones. J. Bacteriol. 169:198-204.

## RESULTADOS Y DISCUSION ADICIONALES

Una de las preguntas que se ha generado del estudio de los genes comunes de nodulación en la cepa CE3 es cómo se regula la expresión de los mismos. En otros sistemas se han descrito de una a tres copias funcionales del gene nodD, cuyo producto es el activador de la expresión del regulón de nodulación. En los casos donde se ha descrito más de una copia, el producto de cada una de ellas tiene propiedades que los distinguen de los otros como la sensibilidad a diferentes flavonoides. En R. meliloti NodD1 y NodD2 activan la expresión del regulón nod en presencia del flavonoide adecuado mientras que NodD3 requiere de un segundo producto codificado por el gene syRM para ejercer su efecto activador. Además, la activación mediada por NodD3 y SyRM es independiente de la presencia de flavonoides (ver Introducción).

En la cepa CE3 se han descrito tres zonas de hibridización con un probador para nodD (Cevallos y col., op. cit.). Sabemos que una de ellas está presente en el cósmido pSM991.25 en un fragmento de EcoRI de 5.5 kb y que probablemente contiene un gene funcional, ya que se analizó la capacidad de activación de la expresión de una fusión del promotor de nodA de R. leguminosarum bv. viciae con lacZ (plásmido pMP154, Zaat y col., 1987) en presencia de cósmidos derivados del pSM991.25 que contenían diversas inserciones lacZ en dicho fragmento.

Ambas construcciones, el pMP154 y los diferentes cósmidos, se introdujeron en la cepa CFN2001 (cepa pSim<sup>-</sup>) y se probó la expresión de cada una de las combinaciones en medio con X-gal en presencia y en ausencia de genisteína (440 nM). Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 4.

Los cósmidos pRp3 y pRp4 contienen inserciones que no permiten la activación de la expresión de la fusión nodA::lacZ contenida en el pMP154, mientras que los cósmidos pRp6, pRp7, pRp8.1-2 son capaces de activar la expresión de la fusión de nodA, por lo que concluimos que en la zona localizada entre las inserciones de los cósmidos pRp3 y pRp4 y posiblemente pRp5, se encuentra por lo menos un gene necesario para la activación de nodA (Vázquez y de las Peñas, datos no publicados). Como se ha mencionado, en este fragmento es donde se encuentra una zona de similitud con nodD, sin embargo el fenotipo observado podría ser ocasionado por la mutación de nodD o bien por la mutación en un gene similar a syrM de *R. meliloti*. La hipótesis de la presencia de un locus similar a syrM en este fragmento está basada en que la regulación de la expresión de fusiones de lacZ con nodA ó nodC en presencia del fragmento que hibridiza con nodD en cósmidos es totalmente diferente a la regulación que presentan estos genes en ausencia de dicho fragmento: 1) en ausencia del fragmento en el cósmido (Fig. 5) y en presencia del plásmido simbiótico (pSim), la expresión de nodA y de nodC de la cepa CE3 es inducible en presencia de flavonoides; 2) en

presencia del fragmento de 5.5 kb (Fig. 5), tanto las fusiones en nodA como en nodC de la cepa CE3 se expresan a muy altos niveles en ausencia de inductores (que es el mismo fenotipo que se encuentra con la fusión de nodA::lacZ de R. leguminosarum bv. viciae) y se mantienen en estos niveles en presencia de genisteína y de exudados de raíces de frijol, en presencia o en ausencia del pSim. Este es un fenotipo similar al encontrado en R. meliloti en cepas que contienen únicamente nodD3 y syrM.

Por lo tanto si en la CE3 se encontraran loci similares a syrM y a nodD3 en el fragmento EcoRI de 5.5 kb, la mutación en cualquiera de los dos produciría un fenotipo de carencia de expresión en ausencia del pSim, similar al encontrado en el experimento de detección de la expresión del promotor de nodA de R. leguminosarum bv. viciae. La funcionalidad de las otras dos copias de nodD detectadas en esta cepa por hibridización no ha sido determinada, pero probablemente exista por lo menos otra copia funcional de nodD que sea la responsable de conferir inducibilidad de la expresión de los genes nod comunes en presencia de inductores.

Hemos mencionado que en presencia del fragmento EcoRI de 5.5 kb, la expresión de fusiones nodA::lacZ ó nodC::lacZ es muy alta en ausencia de inductores y no es afectada por la presencia de genisteína o de exudados de raíz en un fondo pSim<sup>-</sup> (Fig. 5). Sin embargo, la adición de naringenina ocasiona una represión del 30-40% en la expresión de nodC con respecto a la

basal alta encontrada en ausencia de inductor, mientras que en la expresión de nodA no se presenta este efecto y los niveles en presencia de naringenina se mantienen altos al igual que en ausencia del inductor. Este efecto de represión por naringenina no se observa cuando la fusión nodC::lacZ se introduce en la cepa silvestre donde la expresión es inducible (Fig. 5) (de las Peñas y Vázquez, datos no publicados). Por otro lado en este último fondo silvestre la regulación de la expresión de nodA y de nodC no presenta diferencias.

Estos datos sugieren que, al menos en algunas circunstancias, pudiera existir una regulación diferencial de la expresión de nodA y nodBC. A pesar de que el efecto de represión descrito se ha observado al añadir únicamente naringenina obtenida comercialmente, recientemente se ha determinado que los tres inductores principales aislados de exudados de raíces de frijol son naringenina, genisteína y probablemente eriodictiol (M. A. Hungria, comunicación personal). Por lo tanto, la inducción de la expresión causada por los exudados de raíz es el resultado del efecto de más de un flavonoide, y la alteración del balance de los mismos en el exudado, podría ocasionar patrones de regulación diferentes. De hecho los exudados de raíces que han estado en presencia de la bacteria que las nodula, poseen una actividad de inducción de genes nod incrementada en relación a exudados estériles (van Brussel y col., 1990). Además las cajas nod encontradas en el

extremo 5' de nodA y de nodBC no son idénticas entre sí y por lo tanto podrían interactuar diferencialmente con distintos reguladores. Para explorar la posibilidad de la regulación diferencial en estos dos cistrones nos interesa determinar si en el fondo genético silvestre la expresión de una fusión nodC::lacZ homogenotizada en el pSim es reprimida por naringenina, ya que una fusión nodA::lacZ homogenotizada en el mismo es inducible con este flavonoide. Con estos objetivos se construyeron la cepa UBP102 (homogenotización en el pSim de la fusión nodA::lacZ) y la cepa UBP103 (homogenotización de una fusión nodC::lacZ). Actualmente se está llevando a cabo la medición de la expresión de ambas fusiones, pero como los datos obtenidos son aún preliminares no los discutiré aquí. Sin embargo, ya sabemos que la cepa UBP103 (nodC<sup>-</sup>) es incapaz de nodular.

El cósmido pSM991.25 es un derivado por la delección de 18 kb del cósmido aislado originalmente, llamado pSM991. Con respecto a la existencia de más reguladores de la expresión de los genes nod, A. de las Peñas (datos no publicados), determinó que en estas 18 kb existen uno o más factores que median un bloqueo de la expresión de la fusión nodA::lacZ de R. leguminosarum bv. viciae (pMP154), ya que en presencia del pSM991 esta fusión se expresa 10 veces menos que en presencia del pSM991.25, aunque se mantiene el patrón de niveles basales altos de expresión en ausencia del inductor. El único otro

sistema donde se ha descrito un elemento negativo de regulación es en la cepa AK41 de R. meliloti (Kondorosi y col., op. cit.) y hasta el momento no sabemos si el (los) posibles elementos negativos de regulación en la cepa CE3 pudiera(n) ser similares a éste.

Por toda la información mencionada anteriormente, se puede suponer que en la cepa CE3 existen más genes involucrados en la regulación de la expresión de los genes nod que los contenidos en el cósmido pSM991.25, ya que con éstos últimos no se obtiene la regulación normal (inducible) encontrada por ejemplo en la fusión nodA::lacZ homogenotizada en el pSim en el fondo silvestre (UBP102).

Otro aspecto interesante ha sido el análisis de la capacidad de nodulación de derivados por delección del pSM991 diferentes del pSM991.25. Se aislaron dos cósmidos presentados en la Figura 5. El primero de ellos contiene únicamente los fragmentos EcoRI que contienen a los genes nodA (3.5 kb), nodB y nodC (6.8 kb). La cepa CFN2001 (pSim<sup>-</sup>) con este cósmido es incapaz de nodular raíces de frijol. El segundo cósmido aislado contiene los fragmentos con los genes nodA (3.5 kb), nodB y nodC (6.8 kb) y el fragmento con el o los genes necesarios para la activación de la expresión de nodA, nodB y nodC (5.5 kb). La cepa CFN2001 con este cósmido es capaz de nodular las raíces de frijol (Vázquez, datos no publicados). Este cósmido por lo tanto, es la región más pequeña del pSim que contiene la

información necesaria para la nodulación de raíces de frijol aislada hasta el momento. Un punto interesante aquí es que esta región debe contener los genes de especificidad de nodulación (ver Introducción) necesarios para hacer una señal bacteriana de nodulación reconocida por frijol, similar a la descrita en *R. meliloti* (NodRm1) (Fig. 2).

Faucher y col. y Lerouge y col., (op. cit.) han propuesto que los productos de nodABC están involucrados en la síntesis de un factor de deformación de pelos radiculares de arvejas (HadV o NodRm2) y que la conversión de este factor en uno específico de alfalfa (HadA o NodRm1) requiere de nodH y de nodQ. Con la caracterización de la estructura de NodRm1 (Lerouge y col., op. cit.) se ha facilitado el análisis y la caracterización de varios genes de nodulación específicos. De esta forma, se propone actualmente que nodA, nodB, nodC y probablemente nodM están involucrados en la síntesis del esqueleto del tetrasacárido de N-acetil-glucosamina (J. Denarié, comunicación personal, Fig. 2); nodP y nodQ tienen actividad de ATP sulfurilasa y generan una forma activada de sulfato que es transferida al extremo reductor del precursor de NodRm1 por una sulfotransferasa que probablemente esté codificada por nodH (Fig. 2). nodL puede ser una acetiltransferasa que une un grupo acetilo en tres de los azúcares, ya que las mutantes nodL<sup>-</sup> hacen NodRm1 no acetilado. nodG, nodF y nodE están involucrados en la unión de la cadena

N-acil-ácido graso en el extremo no reductor de la molécula (J. Denarié, comunicación personal, Fig. 2).

Ya que las mutantes en nodH, nodP, nodQ, nodF y nodE producen compuestos similares a NodRm1, se han podido purificar y por lo tanto se ha podido deducir la función del gene mutado. Sin embargo las mutantes en nodA, nodB ó nodC no producen ningún compuesto que deforme los pelos radicales y dado que las mutantes en estos genes son incapaces de nodular, se ha propuesto que por lo menos nodA y nodB están involucrados en la síntesis del esqueleto de NodRm1. Sin embargo no hay que olvidar que en R. meliloti nodABC forman un operón y por lo tanto el análisis de mutantes en estos genes como por ejemplo en nodA, conlleva un efecto de polaridad sobre los genes nodB y nodC. Por otro lado se ha caracterizado un compuesto similar a NodRm1 en la cepa de amplio espectro de nodulación, Rhizobium sp. NGR234 y se determinó que en esta cepa los compuestos que forman el esqueleto son pentasacáridos con modificaciones similares a las encontradas en NodRm1 (Price y col., 1990). Finalmente se ha propuesto que NodC funcione como un receptor de señales de la bacteria a la planta o viceversa y sin embargo el gene se encuentra en el operón junto con nodA y nodB.

Hasta el momento no se sabe si la producción de esta molécula es a través de una vía biosintética o catalítica, ni si el producto de alguno de los tres genes se requiere secuencialmente para la acción de los otros dos.

En diversas cepas de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* biotipo I, hemos encontrado que nodA está separado de nodB y de nodC y en *R. loti* ya existe un ejemplo donde nodB está separado de nodA y nodC (D. B. Scott, comunicación personal y Collins-Emerson y col., 1990). ¿Esto tiene algún significado biológico? Tratando de aprovechar las ventajas que ofrece este sistema per se en la cepa CE3, en cuanto a que una mutante en nodA no es polar sobre los genes nodB y nodC, se probó la capacidad de nodulación de la cepa UBP102 (nodA<sup>-</sup>, Nod<sup>-</sup>) coinoculada con la cepa UBP103 (nodC<sup>-</sup>, Nod<sup>-</sup>). Estas dos cepas juntas fueron incapaces de nodular raíces de frijol, lo cual nos abre las siguientes opciones: 1) ninguna de las dos cepas está sintetizando ningún compuesto activo similar a NodRml, al igual que las mutantes nodA<sup>-</sup> en *R. meliloti* donde sí hay polaridad, 2) alguna de las dos lo está sintetizando (UBP103, NodC<sup>-</sup>), pero se está quedando adentro de la célula por la falta de un exportador (como podría ser NodC) y aunque la otra cepa sí lo esté sintetizando no hay posibilidad de complementación, 3) se está sintetizando y exportando algún compuesto precursor similar a algún precursor de NodRml, pero por falta del o los pasos finales de síntesis no es activo. Si el producto necesario para llevar a cabo éstos pasos no es exportado por la cepa que sí lo produjera no hay posibilidad de complementación.

Un enfoque para tratar de determinar la función de estos genes sería la caracterización bioquímica de los compuestos

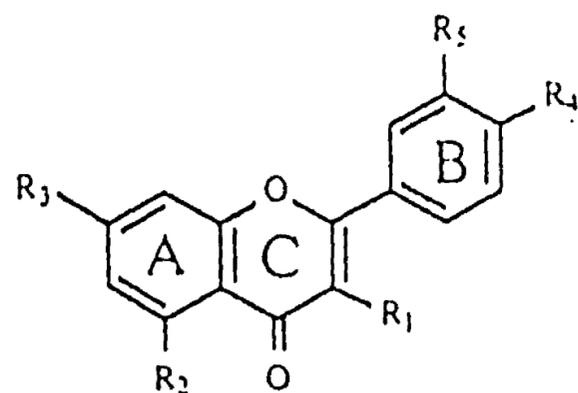
similares a NodRml producidos por cada una de estas mutantes, ya que el descubrimiento de la función de NodAB y C es central en la comprensión del establecimiento de la simbiosis.

## CONCLUSIONES

1. El gene nodA no forma un operón con los genes nodB y nodC en la cepa CE3.
2. En esta cepa nodA está separado aproximadamente 18 kb de los genes nodB y nodC.
3. nodB y nodC probablemente están formando un operón.
4. Arriba de nodB se encuentran dos marcos abiertos de lectura, ORF1 y ORF2, que si es el caso también forman un operón con nodB y nodC. Su funcionalidad es desconocida.
5. En los extremos 5' de nodA y de ORF1, ORF2, nodB y nodC se encuentran secuencias similares a la caja nod consenso, que no son idénticas entre sí.
6. Abajo de nodA existen regiones nucleotídicas similares a nodB, aunque estas secuencias no forman un gene funcional.
7. En la secuencia codificadora de nodA, existe una región similar a una caja nod que está precediendo a las zonas de homología con nodB encontradas abajo de nodA.
8. La secuencia nucleotídica de ORF2 es similar a algunas regiones de nodA.
9. nodA está separado de los genes nodB y nodC en otras cuatro cepas de *R. leguminosarum* bv. phaseoli biotipo I, y por lo tanto ésta puede ser una característica general para todas las cepas de este biotipo.
10. La organización de los genes nod comunes en este grupo de

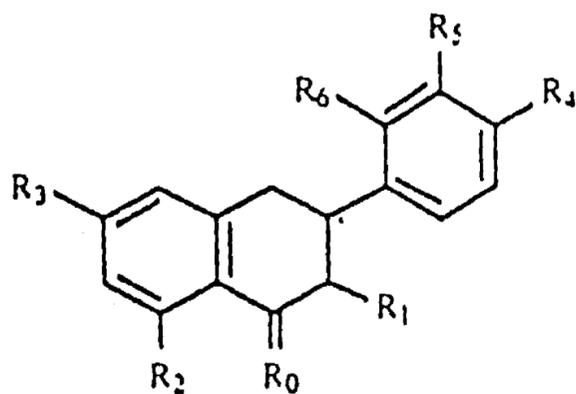
bacterias, probablemente sea el resultado de un rearrreglo genómico ocurrido antes de la diversificación del biotipo I.

11. El análisis de la comparación de la expresión de nodA y de nodC en plásmidos multicopia en el fondo genético silvestre no indica que pueda haber expresión diferencial de ambos cistrones.
12. El cósmido 991.25 no contiene todos los genes necesarios para la regulación normal de la expresión de los genes nod encontrada en la cepa silvestre.



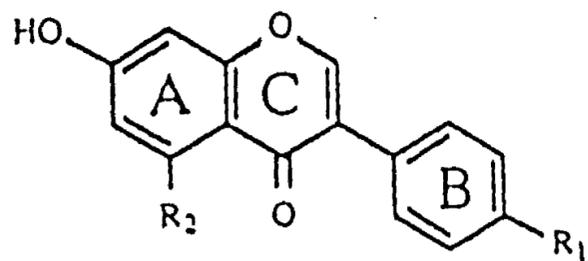
**Flavonas:**

7,4'Dihidroxi flavona	$R_3, R_4 = OH$
Apigenina	$R_2, R_3, R_4 = OH$
Kempferol	$R_1, R_2, R_3, R_4 = OH$
Luteolina	$R_2, R_3, R_4, R_5 = OH$
Taxifolina	$R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 = OH$



**Flavanonas**

7,4'Dihidroxi flavanona	$R_0 = O$ $R_3, R_4 = OH$
Naringenina	$R_0 = O, R_2, R_3, R_4 = OH$
Hesperetina	$R_0 = (\text{enlace sencillo})OCH_3$ $R_2, R_3, R_5 = OH$



**Isoflavonas**

Daidzeína	$R_1 = OH$
Genisteína	$R_1, R_2 = OH$

Figura 1. Estructuras de compuestos fenólicos vegetales que afectan la expresión de genes nod (modificada de Rolfe, op. cit.)



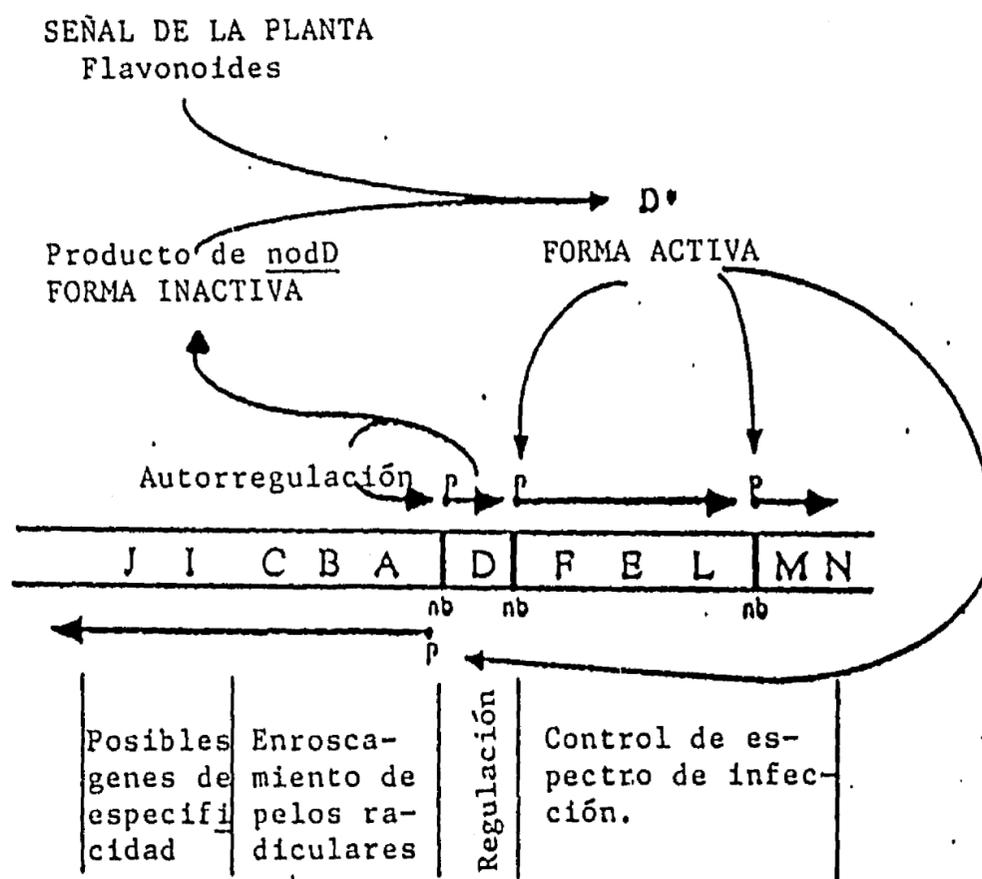
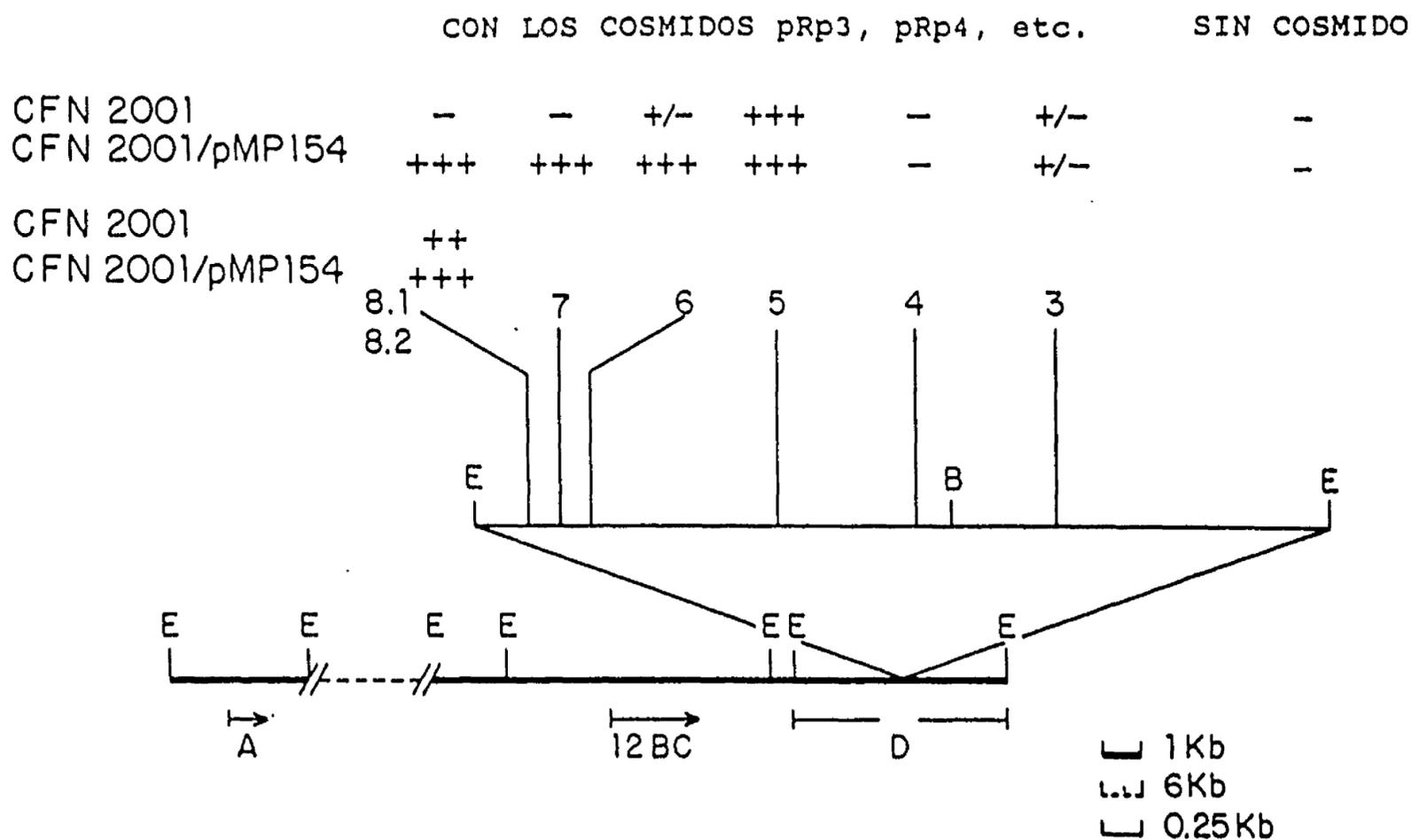


Figura 3. Modelo de regulación de la expresión de algunos genes nod en R. leguminosarum bv. trifolii (modificada de Rolfe, op. cit.). nb: caja nod

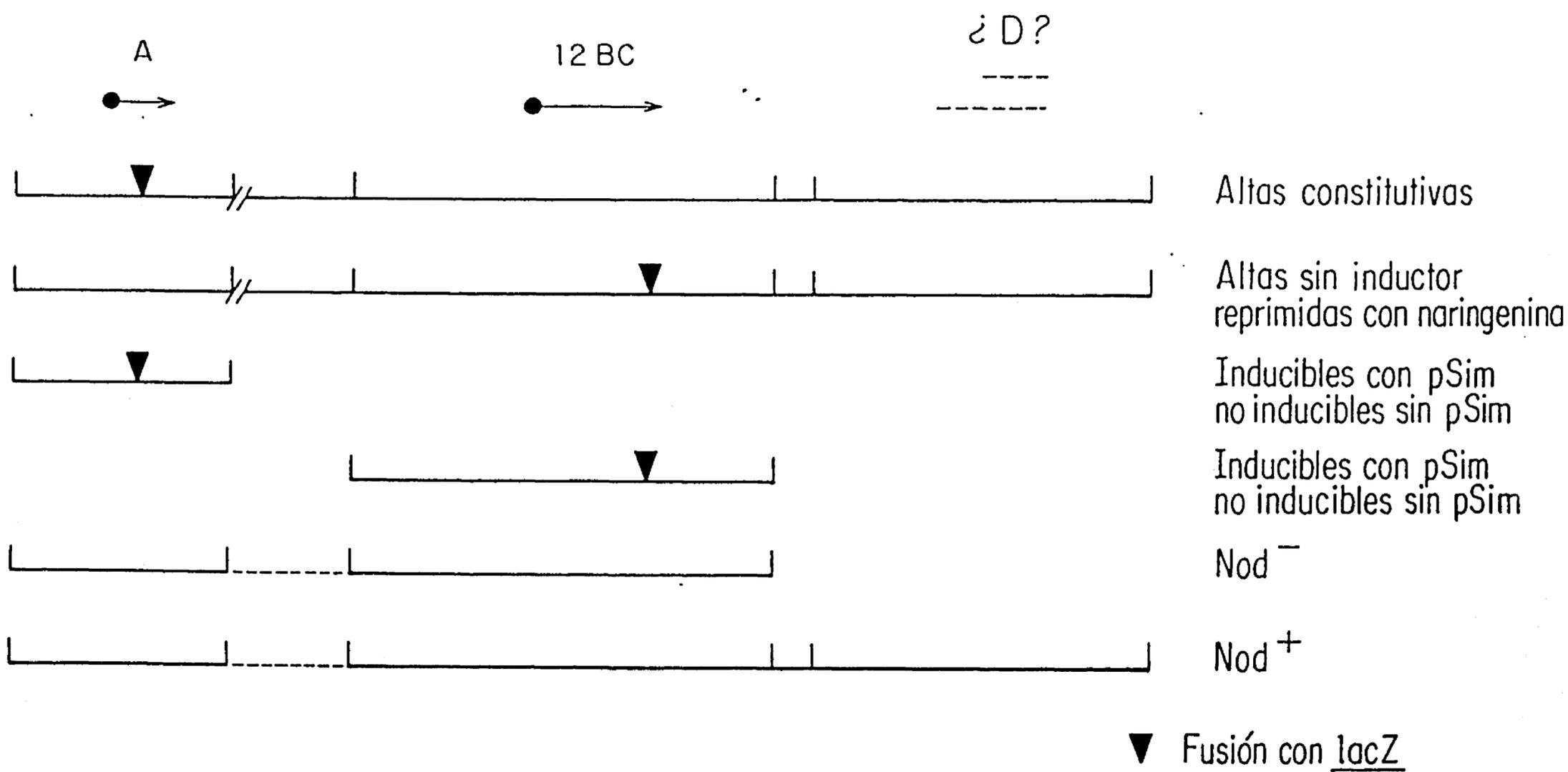
E X P R E S I O N D E l a c Z



**Figura 4.** Expresión de  $\beta$ -galactosidasa del pMP154 y de fusiones en el fragmento EcoRI de 5.5 kb del pSM991.25. El cósmido con diferentes inserciones lacZ (pRp3, pRp4, etc.) se introdujo en la cepa CFN2001 (pSim<sup>-</sup>) y en la cepa CFN2001/pMP154 (pMP154: promotor de nodA de R. leg. bv. viciae fusionado con lacZ de E. coli).

En la cepa CFN2001, la actividad de  $\beta$ -galactosidasa proviene de la expresión de las inserciones en los diferentes cósmidos (pRp3, pRp4, etc.) en el fragmento EcoRI de 5.5 kb.

En la cepa CFN2001/pMP154 la actividad de  $\beta$ -galactosidasa proviene de las inserciones contenidas en los diferentes cósmidos y de la fusión pnodA::lacZ.



**Figura 5.** Fenotipo de nodulación y expresión de  $\beta$ -galactosidasa de fusiones en diferentes cósmidos derivados del pSM991.

- Al-Mallah M, MR Darvey, EC Cockig. 1987. Enzymatic treatment of clover root hair removes a barrier to Rhizobium-host specificity. *Biotechnology* 5, 1319-1322.
- Banfalvi Z, A Nieuwkoop, M Schell, L Best y G Stacey. 1988. Regulation of nod gene expression in Bradyrhizobium japonicum. *Mol. Gen. Genet.*, 214, 420-424.
- Banfalvi Z y A Kondorosi. 1989. Production of root hair deformation factors by Rhizobium meliloti nodulation genes in Escherichia coli: HsnD (NodH) is involved in the plant host-specific modification of the NodABC factor. *Plant Mol. Biol.*, 13, 1-12.
- Barnett MJ y SR Long. 1990. DNA sequence and translational product of a new nodulation regulatory locus: SyrM has sequence similarity to NodD proteins. *J. Bacteriol.*, 172, 3695-3700.
- Bassam BJ, MA Djordjevic, JW Redmond, M Batley y BG Rolfe. 1988. Identification of a nodD dependent locus in the Rhizobium strain NGR234 activated by phenolic factors secreted by soybeans and other Legumes. *Mol. Plant Microbe Interact.* 1, 161-168.
- Borthakur D, CE Barber, MJ Daniels, JA Downie y AWB Johnston. 1986. *Mol. Gen. Genet.* 203, 320-323.
- Burn JE, L Rossen y AWB Johnston. 1987. Four classes of mutations in the nodD gene of Rhizobium leguminosarum biovar viciae that affect its ability to autoregulate and-or activate other nod genes in the presence of flavonoid inducers. *Genes Dev.*, 1, 456-464.
- Burn JE, WD Hamilton, JC Wootton y AWB Johnston. 1989. Single and multiple mutations affecting properties of the regulatory gene nodD of Rhizobium. *Mol. Microbiol.*, 3, 1567-1577.
- Canter Cremers HCJ, HP Spaink, AHM Wijffjes, E Pees, CA Wijffelman, RJH Okker y BJJ Lugtenberg. 1989. Additional nodulation genes on the Sym plasmid of Rhizobium leguminosarum bv. viciae. *Plant Mol. Biol.*, 13, 163-174.
- Cervantes E, SB Sharma, F Maillet, J Vasse, G Truchet y C Rosenberg. 1989. The Rhizobium meliloti host range nodQ gene encodes a protein which shares homology with translation, elongation and initiation factors. *Mol. Microbiol.*, 3, 745-755.
- Chen H, M Batley, J Redmond y BG Rolfe. 1985. Alteration of the effective nodulation properties of a fast-growing broad host range Rhizobium due to changes in exopolysaccharide synthesis. *J. of Plant Physiol.*, 120, 331-349.

-Collins-Emerson JM, EA Terzaghi y DB Scott. 1990. Nucleotide sequence of Rhizobium loti nodC. Nucl. Ac. Res., 18, 1388.

-Davis EO, IJ Evans, y AWB Johnston. 1988. Identification of nodX, a gene that allows Rhizobium leguminosarum bv. viciae strain TOM to nodulate Afghanistan peas. Mol. Gen. Genet., 212, 531-535.

-Dazzo FB, RI Hollingsworth, JE Sherwood, M Abe, EM Hrabak, AE Gardiol, HS Pankratz, KB Smith y M Yang. 1985. En Nitrogen Fixation Research Progress (HJ Evans, PJ Bottomley y WE Newton, eds.) pp. 239-245.

-Dazzo FB, RI Hollingsworth, S Philip-Hollingsworth, M Robeles, T Olen, J Salzwedel, M Djordjevic y B Rolfe. 1988. Recognition process in the Rhizobium trifolii-white clover symbiosis. En Nitrogen Fixation: 100 Years After. (H Bothe, FJ de Bruijn y WE Newton eds.) p.431.

-Dazzo F, RI Hollingsworth, JL Salzwedel, S Philip Hollingsworth, M Robeles, TA Olen, L Apenzeller, S Wang, I Toro, A Squartini, F Anderson, J Chen, KA Chapman, J Maya Flores, LC Cargill, D Baker, MA Djordjevic y B Rolfe. 1988. Signal recognition responses in the Rhizobium trifolii-white clover symbiosis. En Molecular Genetics of Plant Microbe Interactions. R Palacios y DPS Verma eds. págs. 35-40.

-de Maagd RA, AHM Wijfjes, HP Spaink, JE Ruiz-Sainz, CA Wijffelman, RJH Okker y BJJ Lugtenberg. 1989. nodO, a new nod gene of the Rhizobium leguminosarum biovar viciae Sym plasmid pRL1JI, encodes a secreted protein. J Bacteriol., 171, 6764-6770.

-Debellé F, C Rosenberg, J Vasse, F Maillet, E Martínez, J Denarié y G Truchet. 1986. Assignment of symbiotic developmental phenotypes to common and specific nodulation (nod) genetic loci of Rhizobium meliloti. J. Bacteriol., 168, 1075-1086.

-Debellé F y SB Sharma. 1986. Nucleotide sequence of Rhizobium meliloti RCR2011 genes involved in host-specificity nodulation. Nucl. Ac. Res., 14, 7453-7472.

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

-Djordjevic MA, JW Redmond, M Batley y BG Rolfe. 1987. Clovers secrete specific phenolic compounds which either stimulate or repress nod gene expression in Rhizobium trifolii. EMBO J., 6, 1173-1179.

-Downie JA. 1989. The nodL gene from Rhizobium leguminosarum is homologous to the acetyl transferases encoded by lacA and cysE. Mol. Microbiol., 3, 1649-1651.

-Downie JA, y BP Surin. 1990. Either of two nod gene loci can complement the nodulation defect of a nod deletion mutant of Rhizobium leguminosarum bv. viciae. Mol. Gen. Genet., 222, 81-86.

-Dusha I, Z Györgypal, N Iyer, y A Kondorosi. 1990. Regulation of early nodulation functions by combined nitrogen. En 5th Int. Symp. on the Mol. Gen. of Plant-Micr. Int. Interlaken, Suiza.

-Economou A, FKL Hawkins, JA Downie y AWB Johnston. 1989. Transcription of rhiA, a gene on Rhizobium leguminosarum bv. viciae Sym plasmid, requires rhiR and is repressed by flavanoids that induce nod genes. Mol. Microbiol., 3, 87-93.

-Economou A, WDO Hamilton, AWB Johnston y JA Downie. 1990. The Rhizobium nodulation gene nodO encodes a  $Ca^{2+}$ -binding protein that is exported without N-terminal cleavage and is homologous to haemolysin and related proteins. EMBO J., 9, 349-354.

-Evans IJ y JA Downie. 1986. The nodI gene product of Rhizobium leguminosarum is closely related to ATP-binding bacterial transport proteins; nucleotide sequence analysis of the nodI and nodJ genes. Gene 43, 95-101.

Faria SM de, GT Hay y JI Sprent. 1988. Entry of rhizobia into roots of Mimosa scabrella Bentham occurs between epidermal cells. J Gen Microbiol., 134, 2291-2296.

-Faucher C, F Maillet, J Vasse, C Rosenberg, AAN van Brussel, G Truchet y J Denarié. 1988. Rhizobium meliloti host range nodH gene determines production of an alfalfa-specific extracellular signal. J Bacteriol., 170, 5489-5499.

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

-Fisher RF y SR Long. 1989. DNA footprint analysis of the transcriptional activator protein NodD1 and NodD3 on inducible nod gene promoters. J. Bacteriol., 171, 5492-5502.

-Geiger O., HP Spaink y EP Kennedy. 1990. NodF protein carries a 4'phosphopantetheine. En 5th Int. Symp. on the Mol. Genet. of Plant Micr. Int. Interlaken, Suiza.

-Göttfert M, P Grob y H Hennecke. 1990a. Proposed regulatory

pathway encoded by the nodV and nodW genes determinants of host specificity in Bradyrhizobium japonicum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 2680-2684.

-Göttfert M, D Holzhäuser y H Hennecke. 1990b. An unusual common nod gene cluster in Bradyrhizobium japonicum: genetic characterization of nodS, nodU and two nodD copies. En 5th Int. Symp. on the Mol. Genet. of Plant Micr. Int. Interlaken, Suiza.

-Halverson LJ y G Stacey. 1986. Effect of lectin on nodulation by wild type Bradyrhizobium japonicum and a nodulation-defective mutant. Appl. Environ. Microbiol. 51, 753-760.

-Hartwig UA, CA Maxwell, CM Joseph y DA Phillips. 1989. Interactions among flavonoids, nod gene inducers released from alfalfa seeds and roots. Plant Physiol., 91, 1138-1142.

-Hartwig UA. CA Maxwell, CM Joseph y DA Phillips. 1990. Chrysoeriol and luteolin released from alfalfa seeds induce nod genes in Rhizobium meliloti. Plant Physiol., 92, 116-122.

-Henikoff S, GW Haughn, JM Calvo y JC Wallace. 1988. A large family of bacterial activator proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 6602-6606.

-Hirsch AM, TV Bhuvanewari, JG Torrey y T. Bisseling. 1989. Early nodulin genes are induced in alfalfa root outgrowths elicited by auxin transport inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 1244-1248.

-Honma MA y FM Ausubel. 1987. Rhizobium meliloti has three functional copies of the nodD symbiotic regulatory gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 8558-8562.

-Horvath B, E Kondorosi, M John, J Schmidt, I Torok, Z Gyorgypal, I Barabas, U Wieneke, J Schell y A Kondorosi. 1986. Organization, structure and symbiotic function of Rhizobium meliloti nodulation genes determining host-specificity for alfalfa. Cell 46, 335-342.

-Horvath B, CWB Bachem, J Schell y A Kondorosi. 1987. Host-specific regulation of nodulation genes in Rhizobium is mediated by a plant-signal, interacting with the nodD product. EMBO J 6, 841-848.

-Jacobs M y PH Rubbery. 1988. Naturally occurring auxin transport regulators. Science 241, 346-349.

-Jarvis BDW, LJH Ward y EA Slade. 1989. Expression by soil bacteria of nodulation genes from Rhizobium leguminosarum bv. trifolii. Appl. Environ. Microbiol., 55, 1426-1434.

- John M, J Schmidt, U Wienecke, Krüssmann HD y J Schell. 1988. Transmembrane orientation and receptor-like structure of the Rhizobium meliloti common nodulation protein NodC. EMBO J, 7, 583-588.
- Kaijalainen S y K Lindstrom. 1989. Restriction fragment polymorphism analysis of Rhizobium galegae strain. J Bacteriol., 171, 5561-5566.
- Kondorosi E, J Gyuris, J Schmidt, M John, E Duda, B Hoffman, J Schell y A Kondorosi. 1989. Positive and negative control of nod gene expression in Rhizobium meliloti is required for optimal nodulation. EMBO J 8, 1331-1340.
- Lamb JW, JA Downie y AWB Johnston. 1985. Cloning of the nodulation (nod) genes of Rhizobium phaseoli and their homology to Rhizobium leguminosarum nod DNA. Gene 34, 367-370.
- Lerouge P, P Roche, C Faucher, F Maillet, G Truchet, JC Promé y J Denarié. 1990. Symbiotic host-specificity of Rhizobium meliloti is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. Nature (London) 344, 781-784.
- Long SR. 1989a. Rhizobium-Legume Nodulation: Life Together in the Underground. Cell 56, 203-214.
- Long SR. 1989b. Rhizobium Genetics. Ann. Rev. Genet., 23, 483-506.
- Marie C y JA Downie. 1990. Biochemical characterization of the NodM and NodL proteins of Rhizobium leguminosarum bv. viciae. En 5th Int. Symp. on the Mol. Gen. of Plant Micr. Int. Interlaken, Suiza.
- Martínez E, D Romero y R Palacios. 1990. The Rhizobium Genome. Critical Reviews in Plant Sciences., 9, 59-93.
- Maxwell CA, UA Hartwig, CM Joseph y DA Phillips. 1989. A chalcone and two related flavonoids released from alfalfa roots induce nod genes of Rhizobium meliloti. Plant Physiol., 91, 842-847.
- McIver MA, MA Djordjevic, JJ Weinman, GL Bender y BG Rolfe. 1989. Extension of host range of Rhizobium leguminosarum bv. trifolii caused by point mutations in nodD that result in alterations in regulatory function and recognition of inducer molecules. Mol. Plant Micr. Interact. 3, 97-106.
- McKhann HI, M Jacobs, S Stine y AM Hirsch. 1990. Naturally-occurring NPA-like compounds in Rhizobium meliloti culture

filtrate and alfalfa seed exudate. En 5th International Symposium on the Mol. Gen. of Plant-Micr. Int. Interlaken, Suiza.

-Mulligan JT y SR Long. 1989. A family of activator genes regulates expression of Rhizobium meliloti nodulation genes. Genetics, 122, 7-18.

-Parniske M, B Ahlborn, R Kape, P Schmidt y D Werner. 1990. Flavonoid changes in the rhizosphere of soybean: effects on bradyrhizobial symbiotic behaviour. 5th Int. Symp. on the Mol. Genet. of Plant-Micr. Int. Interlaken, Suiza.

-Peters NK, JW Frost y SR Long. 1986. A plant flavone, luteolin, induces expression of Rhizobium meliloti nodulation genes. Science, 233, 977-980.

-Pierre M, U Haumann, M Cren, A Kondorosi y E Kondorosi. 1990. Identification of a nod gene repressor in R. meliloti 41. En 5th Int. Symp. on the Mol. Genet. of Plant-Micr. Int. Interlaken, Suiza.

-Price NPJ, A Lewin y WJ Broughton. 1990. Nod-factors produced by Rhizobium sp. NGR234. En 5th Int. Symp. on the Mol. Genet. of Plant-Micr. Int. Interlaken, Suiza.

-Quispel A. 1988. En Nitrogen Fixation: Hundred Years After. Hellriegel and Wilfarth's discovery of (symbiotic) nitrogen fixation hundred years ago. Bothe, de Bruijn and Newton, eds., págs. 3-12.

-Recourt K, AAN van Brussel, AJM Driessen y BJJ Lugtenberg. 1989. Accumulation of a nod gene inducer, the flavonoid naringenin, in the cytoplasmic membrane of Rhizobium leguminosarum bv. viciae is caused by the pH-dependent hydrophobicity of naringenin. J Bacteriol., 171, 4370-4377.

-Recourt K, AAN van Brussel, JW Kijne, J Schripsema y BJJ Lugtenberg. 1990. Inoculation of Vicia sativa with Rhizobium leguminosarum biovar viciae increases the number of nod gene inducing flavonoids secreted by the roots of the host plant. 8th Int. Cong. on Nitr. Fix. Knoxville, Tennessee, EUA.

-Redmond JW, M Batley, MA Djordjevic, RW Innes, PL Kuempel y BG Rolfe. 1986. Flavones induce expression of nodulation genes in Rhizobium. Nature 323, 632-635.

-Richardson AE, M Djordjevic, BG Rolfe y RJ Simpson. 1988. Effects of pH, Ca and Al on the exudation from clover seedlings of compounds that induce the expression of nodulation genes in Rhizobium trifolii. Plant and Soil. 109, 37-47.

-Rolfe BG. 1988. Flavones and isoflavones as inducing substances of legume nodulation. *BioFactors* 1, 3-10.

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

-Schlaman HRM, HP Spaink, RJH Okker y BJJ Lugtenberg. 1989. Subcellular localization of the nodD gene product in Rhizobium leguminosarum. *J. Bacteriol.*, 171, 4686-4693.

-Schmidt J, M John, U Wienecke, HDK Krüssman y J Schell. 1986. Expression of the nodulation gene nodA in Rhizobium meliloti and localization of the gene product in the cytosol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 9581-9585.

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

Schofield PR, AH Gibson, WF Dudman y JM Watson. 1987. Evidence for genetic exchange and recombination of Rhizobium symbiotic plasmids in soil population. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 2942-2947.

-Schwedock J y SR Long. 1989. Nucleotide sequence and protein products of two new nodulation genes of Rhizobium meliloti, nodP and nodQ. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 2, 181-194.

-Schwedock J y SR Long. 1990. ATP sulphurylase activity of the nodP and nodQ gene products of Rhizobium meliloti. *Nature (London)* 348, 644-647.

-Scott KF. 1986. Conserved nodulation genes from the non-legume symbiont Bradyrhizobium sp. (Parasponia). *Nucl. Ac. Res.* 14, 2905-2919.

-Segovia L, D Piñero, R Palacios y E Martínez-Romero. 1991. Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic Rhizobium leguminosarum. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 000-000. En prensa.

Smit G, JW Kijne y BJJ Lugtenberg. 1987. Involvement of both cellulose fibrils and a  $Ca^{2+}$  dependent adhesin in the attachment of Rhizobium leguminosarum to pea root hair tips. *J Bacteriol.*, 169, 4294-4301.

-Spaink HP, CA Wijffelman, E Pees, RJH Okker y BJJ Lugtenberg. 1987. Rhizobium nodulation gene as a determinant of host

specificity. Nature 328, 337-340.

-Spaink HP, CA Wijffelman, RJH Okker y BJJ Lugtenberg. 1989. Localization of functional regions of the Rhizobium nodD product using hybrid nodD genes. Plant Mol. Biol., 12, 59-73.

-Spaink HP, J Weinman, MA Djordjevic, CA Wijffelman, RJH Okker y BJJ Lugtenberg. 1989. Genetic analysis and cellular localization of the Rhizobium host specificity-determining Node protein. EMBO J 8, 2811-2818.

-Spaink HP, O Geiger, V Reinhold, BJJ Lugtenberg y EP Kennedy. 1990. The biochemical function of Rhizobium leguminosarum involved in the production of host specific signal molecules. En 5th Int. Symp. on the Mol. Genet. of Plant Micr. Int. Interlaken, Suiza.

-Sprent JI. 1989. Which steps are essential for the formation of functional legume nodules? New Phytol., 11, 129-153.

-Stanfield SW, L Ielpi, D O'Brochta, DR Helinski y GS Ditta. 1988. The ndvA gene product of Rhizobium meliloti is required for  $\beta$ 1-2 glucan production and has homology to the ATP-binding export protein HlyB. J Bacteriol., 170, 3523-3530.

-Surin BP y JA Downie. 1988. Characterization of the Rhizobium leguminosarum genes nodLMN involved in efficient host-specific nodulation. Mol. Microbiol., 2, 173-183.

-Surin BP, JM Watson, WDO Hamilton, A Economou y JA Downie. 1990. Molecular characterization of the nodulation gene nodT from two biovars of Rhizobium leguminosarum. Mol. Microbiol., 4:245-252.

-Taller B. 1990. Cytokinin production by rhizobia. En 5th Int. Symp. on the Mol. Genet. of Plant Micr. Int. Interlaken, Suiza.

-Therisod H y EP Kennedy. 1987. The function of acyl-carrier protein in the synthesis of membrane derived oligosaccharides does not require its phosphopantetheine prosthetic group. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 8235-8238.

-Tran Thanh Van M, P Toubart, A Cousson, AG Darvill y col. 1985. Manipulation of the morphogenetic pathway of tobacco explants by oligosaccharins. Nature 314, 615-617.

-van Brussel AAN, K Recourt, E Pees, H Spaink, T Tak, CA Wijffelman, JW Kijne y BJJ Lugtenberg. 1990. A biovar specific signal of Rhizobium leguminosarum bv. viciae induces increased nodulation gene-inducing activity in root exudate of Vicia sativa subsp. nigra. J. Bacteriol., 172, 5394-5401.

-Vance GP, MA Egli, SM Griffith y SS Miller. 1988. Plant regulated aspects of nodulation and nitrogen fixation. *Plant Cell and Environment.*, **11**, 413-427.

-Vargas C, LJ Martínez, M Megías y C Quinto. 1990. Identification and cloning of nodulation genes and host specificity determinants of the broad host-range Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli strain CIAT899. *Mol. Microbiol.* **4**, 1899-1910.

-Watson RJ. 1989. Molecular genetics of Rhizobium meliloti symbiotic nitrogen fixation. *Biotech. Adv.*, **7**, 31-45.

-Young JPW y AWB Johnston. 1989. The Evolution of Specificity in the Legume-Rhizobium Symbiosis. *Trends in Ecology and Evolution* **4**, 341-349.

-Zaat SAJ, Wijffelman CA, HP Spaink, AAN van Brussel, RJH Okker y BJJ Lugtenberg. 1987. Induction of the nodA promoter of Rhizobium leguminosarum Sym plasmid pRL1JI by plant flavanones and flavones. *J. Bacteriol.*, **169**, 198-204.

-Zaat SAJ, J Schripsema, CA Wijffelman, AAN van Brussel y BJJ Lugtenberg. 1989. Analysis of the major inducers of the Rhizobium nodA promoter from Vicia sativa root exudate and their activity with different nodD genes. *Plant Mol. Biol.*, **13**, 175-188.