

11281  
4.  
Lej



Universidad Nacional Autónoma de México

Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno  
Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas

Participación del gene *nolL* de *Rhizobium etli*  
en la acetilación de los factores de nodulación.

Tesis que para obtener el grado de  
Doctora en Ciencias  
presenta

Adriana de la Concepción Corvera Poiré



Cuernavaca, Mor., agosto de

1999

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

274804



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.

**A Mauricio.**

**A Papá y Mamá.**

## AGRADECIMIENTOS.

A Mauricio, muchas gracias por todo el amor, respeto, confianza, apoyo y ayuda que me das día con día.

A Papá y Mamá, por haber sido siempre un gran ejemplo, por enseñarme el valor del estudio y por darme siempre la libertad para seguir por mi propio camino.

A la Güera, Marcela, Beto, Xavier y Jorge porque cada uno de ustedes me ha dado mucho cariño y muchos ratos felices.

A Walter, Marisa, Wai-Lan y Ale, porque hacen que la familia sea cada vez más divertida y contribuyen a nuestra felicidad.

A Pamela y Beto, por todo lo que habremos de compartir.

A Abuelita Pilar, por tantos juegos que compartiste conmigo. Porque siempre has sido una abuela maravillosa.

A Benito, Alicia, Güeli, el Güero, Ivonne, Fernanda, Santiago, Malú, Franzo papá, Franzo, Javier, Al, Ali, Regina y Jimena, por ser mi nueva familia, no sólo de nombre, también de corazón.

A Mariana, por ayudarme a ser libre...¡por enseñarme a ser feliz!

A Maritere, Samia, Sol, Luz, Susi, Cristina y Carmen, porque su amistad me hace muy feliz.

A Tere y Roberto, porque siempre han sido como unos padres para mí.

A Roberto, por haber sido como un hermano.

A la UNAM, por todos estos años de educación gratuita.

Al CIFN, por haberme dado la oportunidad de estudiar aquí.

A David, por ser siempre un gran maestro y amigo, por las largas horas de discusión de hemos tenido y que habremos de tener.

A Susi, Esperanza, Mario Rocha y Mario Soberón, mi comité tutorial, porque me enseñaron mucho y fueron muy pacientes conmigo.

A Luis Cárdenas, Carmen Gómez, Alicia González, Miguel Lara, Carmen Quinto y Valeria Souza, por leer y criticar esta tesis.

A Xavier Corvera y a Julio Martínez por ayudarme con la estadística.

A Alma y a Lolita, porque me ayudaron a hacer todos los trámites necesarios para llegar hasta aquí.

A Mary y Enrique, porque gracias a ustedes el laboratorio está siempre limpio.

A todos mis amigos del CIFN e IBT, especialmente a los de mi laboratorio, porque gracias a ustedes la vida diaria es muy agradable, porque me han ayudado y aconsejado siempre que han podido y porque comparten sus sonrisas conmigo.

Este trabajo fue realizado en el Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno de la Universidad Nacional Autónoma de México y fué dirigido por el Dr. David René Romero Camarena.

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM me permitieron realizar mis estudios de maestría y doctorado al otorgarme becas de manutención durante el tiempo que duraron mis estudios. El programa PADEP de la UNAM me ayudó también con los apoyos 030389 y 030329 para la realización mi investigación.

## RESUMEN.

Los factores de nodulación (factores Nod) de *Rhizobium etli* y de *R. loti* llevan un grupo 4-O-acetil-L-fucosilo en el extremo reductor. Con base en análisis de secuencia, se dijo que la proteína NodL de *R. loti* participa en la 4-O-acetilación del residuo de fucosa de los factores Nod como una acetil-transferasa (Scott, D. B., Young, C. A., Collins-Emerson, J. M., Terzaghi, E. A., Rockman, E. S., Lewis, P. A., and Pankhurst, C. E. 1996. *Mol. Plant-Microbe Int.* 9: 187-197). Reforzamos esta hipótesis con el estudio de la producción de factores Nod de una cepa mutante de *R. etli nolL::Km*. Los factores Nod producidos por esta cepa mutante fueron analizados por cromatografía y espectrometría de masas; estos análisis mostraron que (los factores Nod) carecen del sustituyente acetil-fucosilo, teniendo un grupo fucosilo en su lugar. La acetil-fucosilación fué restaurada gracias a la complementación de la cepa con un gene *nolL* silvestre. Estos resultados indican que el gene *nolL* determina la 4-O-acetilación del residuo de fucosa de los factores Nod.

El análisis del polipéptido NodL predicho nos sugiere que se trata de una proteína transmembranal y que pertenece a la familia de transacilasasa integrales de membrana (Slauch, J. M., Lee, A. A., Mahan, M. J., and Mekalanos, J. J. 1996. *J. Bacteriol.* 178:5904-5909). NodL de *R. loti* también fué propuesta como un posible transportador; nuestros resultados muestran que NodL no determina una secreción diferencial de factores Nod desde el interior de la célula.

También realizamos ensayos con plantas, éstos nos indicaron que la acetilación de la fucosa es una condicionante para que *R. etli* tenga una nodulación eficiente de algunos cultivares de frijol (*Phaseolus vulgaris*), así como de un huésped alternativo (*Vigna umbellata*).

## ABSTRACT.

The nodulation factors (Nod factors) of *Rhizobium etli* and *R. loti* carry a 4-O-acetyl-L fucosyl group at the reducing end. It has been claimed, based on sequence analysis, that NolL from *R. loti* participates in the 4-O-acetylation of the fucosyl residue of the Nod factors, as an acetyl-transferase (Scott, D. B., Young, C. A., Collins-Emerson, J. M., Terzaghi, E. A., Rockman, E. S., Lewis, P. A., and Pankhurst, C. E. 1996. *Mol. Plant-Microbe Int.* 9: 187-197). Further support for this hypothesis was obtained by studying the production of Nod factors in a *R. etli nolL::Km* mutant. Chromatographic and mass spectrometry analysis of the Nod factors produced by this strain showed that they lack the acetyl-fucosyl substituent, having a fucosyl group instead. Acetyl-fucosylation was restored upon complementation with a wild-type *nolL* gene. These results indicate that the *nolL* gene determines 4-O-acetylation of the fucosyl residue in Nod factors.

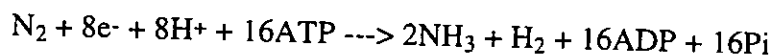
Analysis of the predicted NolL polypeptide suggests a transmembranal location and that it belongs to the family of integral membrane transacylases (Slauch, J. M., Lee, A. A., Mahan, M. J., and Mekalanos, J. J. 1996. *J. Bacteriol.* 178:5904-5909). NolL from *R. loti* was also proposed to function as a transporter; our results show that NolL does not determine a differential secretion of Nod factors from the cell.

We also performed plant assays which indicate that acetylation of the fucose conditions efficient nodulation by *R. etli* of some *Phaseolus vulgaris* cultivars, as well as of an alternate host (*Vigna umbellata*).



## INTRODUCCIÓN.

Todos los seres vivos son capaces de convertir el amoníaco en compuestos orgánicos nitrogenados. Sin embargo, solamente algunas bacterias son capaces de reducir el nitrógeno atmosférico a amoníaco. Este proceso de reducción del nitrógeno molecular por acción de microorganismos se conoce como fijación biológica de nitrógeno (FBN). La FBN se lleva a cabo gracias a la acción de una enzima sensible a oxígeno llamada nitrogenasa (Campbell 1987; Sprent y Sprent 1990). La reacción final de reducción de nitrógeno a amoníaco es (revisado en Udvardi y Day 1997):



Los microorganismos fijadores de nitrógeno comprenden algunas arqueobacterias (como *Methanococcus*) y una gran cantidad de eubacterias: bacterias del suelo que fijan nitrógeno en vida libre (como *Klebsiella*), cianobacterias (como *Nostoc*), y bacterias que fijan nitrógeno en asociación simbiótica con plantas. Estas asociaciones simbióticas ocurren entre bacterias del género *Frankia* con plantas actinorrízicas y bacterias rhizobáceas con plantas leguminosas y *Parasponia* (Sprent y Sprent 1990). De la asociación *Rhizobium*-leguminosa, hablaremos en esta revisión.

Una gran cantidad de bacterias de los géneros *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*, que en general llamaremos *Rhizobium*, forman asociaciones simbióticas con diversas plantas leguminosas (revisado en Fisher y Long 1992). El resultado de esta asociación, es la formación de estructuras diferenciadas, en la raíz de la leguminosa, llamadas nódulos. Gracias al ambiente microaeróbico del nódulo, la bacteria es capaz de fijar nitrógeno (Campbell 1987; Sprent y Sprent 1990).

Para que la simbiosis se establezca, es necesario que la bacteria sea capaz de sobrevivir en su entorno y detectar la presencia de la planta e infectarla. La detección e infección de una planta

requiere de un intercambio coordinado de señales entre la bacteria y la planta misma (revisado en Caetano-Anollés y Gresshoff 1991, y en Fisher y Long 1992). La planta huésped libera a la rizósfera sustancias que funcionan como quimioatrayentes, como estimuladores del crecimiento y/o como inductores de la expresión de genes bacterianos necesarios para la nodulación (genes *nod*, *nol* y *noe*; en conjunto llamados genes *nod*). La bacteria, en cambio, sintetiza compuestos llamados factores de nodulación que causan diversos cambios en la raíz de la planta, entre otros, los cambios morfológicos que son el punto de partida para lograr la infección (Fig. 1) y la nodulación. Los (iso)flavonoides, que son algunos de los compuestos que funcionan como activadores de genes *nod*, son secretados por las distintas plantas cuando el nitrógeno combinado en el suelo es escaso (Coronado et al. 1993). Estos flavonoides presentan diversas modificaciones en sus esqueletos o en sus grupos laterales. De igual manera, los factores de nodulación pueden presentar sustituciones huésped-específicas. De la naturaleza y posición de estas sustituciones en el esqueleto de oligoquitina depende la respuesta de la planta (revisado en Fisher y Long 1992).

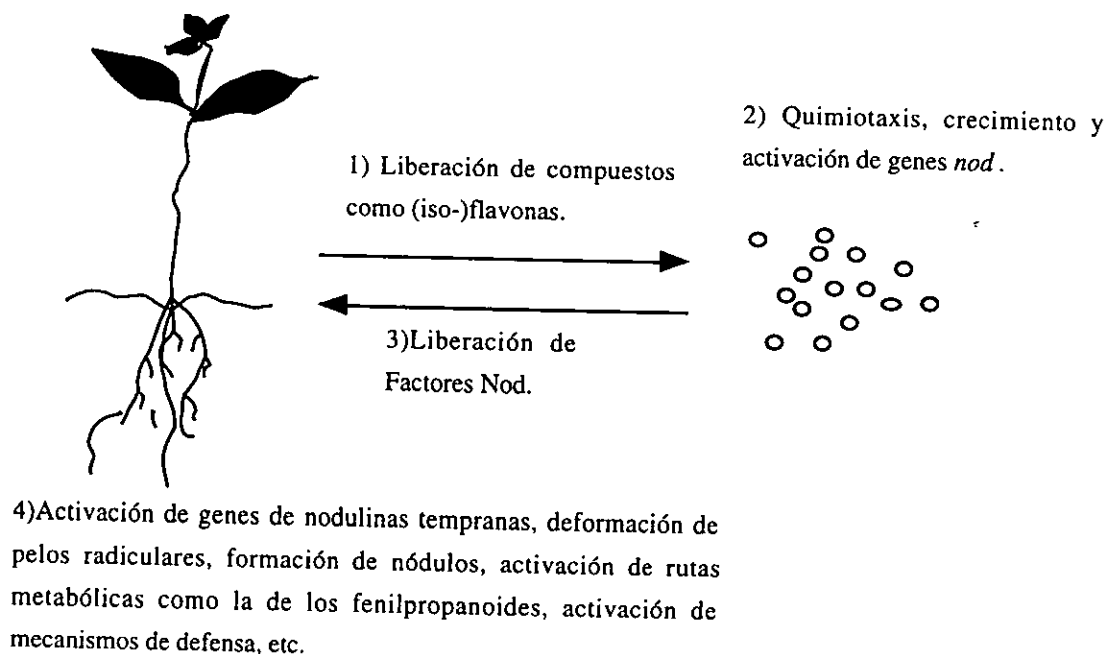


Fig.1. Esquema general de comunicación química planta leguminosa-*Rhizobium* y algunas de sus consecuencias.

## Formación de nódulos.

Las bacterias, en general, son quimiotácticas hacia diversos compuestos exudados por las raíces de las plantas, como azúcares, aminoácidos y betaínas. Adicionalmente, las leguminosas exudan (iso)flavonoides que son fuertes quimioatrayentes para las rhizobaeas (revisado en Brewin 1991). Algunos de estos (iso)flavonoides provocan un incremento en el crecimiento bacteriano (revisado en Fisher y Long 1992) y, junto con betaínas, glucósidos y ácidos aldónicos, inducen la activación de los genes *nod* (Smit 1992; Gagnon e Ibrahim 1998; revisado en Fisher y Long 1992). Se ha visto también, que el ácido jasmónico es capaz de estimular la expresión de los genes *nod* y ejercer un efecto sinérgico en conjunto con flavonoides (Rosas et al. 1998). La presencia de *Rhizobium* en el medio afecta la composición de los exudados radiculares de manera que comienzan a secretarse, principalmente, aquellos compuestos con capacidad inductora de los genes *nod*. Estos compuestos son exudados de la región que se encuentra justo detrás del meristemo apical, que es la zona más susceptible a la infección por *Rhizobium* (Lauson et al. 1996).

Así, las bacterias son atraídas hacia la raíz y se adhieren a ella. Esta adhesión es un paso importante que forzosamente antecede a la invasión de células radiculares. Las fibras de celulosa producidas por *Rhizobium* parecen ser importantes para el anclaje de la bacteria a la superficie mucilaginosa de la raíz; este anclaje puede reforzarse por proteínas dependientes de calcio como las ricadhesinas (revisado en Brewin 1991, y en Pueppke 1996).

Se ha visto que la quimiotaxis de la bacteria a los exudados de la raíz es un factor importante en el inicio de la interacción planta-bacteria. Igualmente ocurre con la motilidad y capacidad de adhesión de la bacteria a la superficie radicular. Alteraciones en cualquiera de estas capacidades retrasan la nodulación (revisado en Dowling y Broughton 1986, en Martínez et al. 1990, y en Triplett y Sadowsky 1992).

Una fotosíntesis activa por parte de la planta huésped y un ambiente en el que el nitrógeno

combinado es muy pobre, son requisitos indispensables para que se lleve a cabo una nodulación eficiente (Kondorosi et al. 1998). Estos requisitos son sumamente importantes ya que la concentración de fotosintatos que la planta aporte a la bacteria durante la simbiosis, mantendrá ó limitará la fijación de nitrógeno (revisado en Udvardi y Day 1997) y un ambiente rico en nitrógeno combinado inhibe la nodulación. Las altas concentraciones de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  inhiben a nivel de división de células corticales y formación de hilos de infección (Heidstra et al. 1997b) e incluso pueden frenar la respuesta de la bacteria, inhibiendo la expresión de genes *nod*. Los nitratos, a su vez, inhiben la acumulación de lectinas, aunque esta inhibición puede variar dependiendo de cada especie de planta (i.e. inhiben la acumulación de lectinas en plantas de trébol, pero no en chícharo; Kijne 1992).

Al entrar las bacterias y las raíces de las plantas en contacto físico, la bacteria se adhiere a la superficie radicular (revisado en Pueppke 1996). Rápidamente, los pelos radiculares comienzan a ramificarse, deformarse y enrollarse, lo que provoca la formación de una invaginación de la membrana celular que será el punto de entrada para las bacterias, el inicio del hilo de infección (Fig. 2). En el córtex externo, los factores de nodulación inducen la formación de rearrreglos citoplásmicos que llevan a la formación de “puentes” que forman una ruta que normalmente es seguida por el hilo de infección (Van Brussel et al. 1992; revisado en Brewin 1991, en Vijn et al. 1993 y en Pueppke 1996). Estos “puentes citoplásmicos” son formados también por estructuras similares al fragmoplasto, en células del córtex que entran al ciclo celular, pero se quedan detenidas en  $G_2$  (Albrecht et al. 1999). Así pues, el hilo de infección es una estructura tubular, formada por las células vegetales, que llevará a las bacterias hasta el meristemo nodular, donde serán “liberadas” y se diferenciarán a bacteroides. Los bacteroides se liberan por invaginación de la membrana vegetal, lo que forma la membrana peribacteroidal; en conjunto, el bacteroide y la membrana forman el simbiosoma. El meristemo o primordio nodular se forma por rápidas divisiones celulares, también como respuesta a los factores de nodulación, en el córtex externo ó interno, dependiendo de si se formarán nódulos determinados o indeterminados (revisado en Brewin 1991, en Van Rhijn y Vanderleyden 1995, y en Pueppke 1996). Además de las respuestas a nivel de epidermis y córtex, los factores de nodulación también inducen respuestas a nivel de periciclo y haces vasculares (Bisseling et al. 1997; revisado en Dénarié et al. 1996, y en Pueppke 1996), lo

que culminará en la formación de un nódulo totalmente vascularizado; esta inducción podría ser directa o indirecta, ya que existen ciertas evidencias que apoyan la existencia de un compuesto o “factor del estele” que podría estar involucrado en el desarrollo de los haces vasculares del nódulo (revisado en Schultze et al. 1994). En estudios recientes, se ha identificado a la uridina como un factor del estele, el cual, incrementa la proliferación celular (inducida hormonalmente) en el córtex de explantes, en posiciones similares a las de los primordios nodulares (Smit et al. 1995).

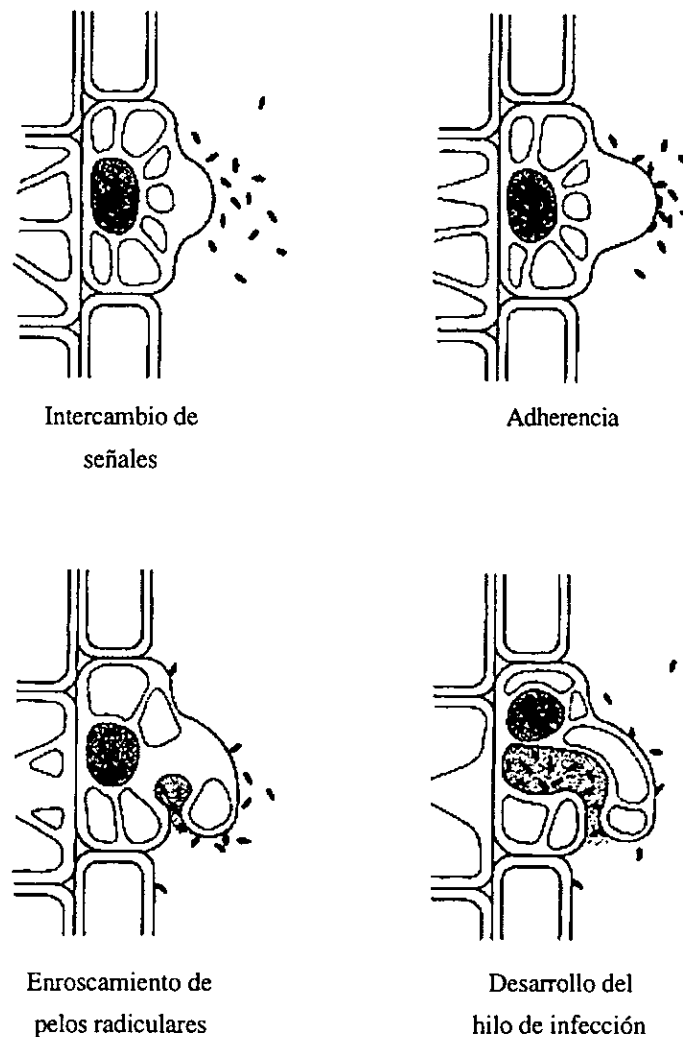


Fig. 2. Estadios tempranos en la infección de leguminosas por *Rhizobium*, a través de hilos de infección (Tomado de Kijne 1992).

Los nódulos indeterminados (Fig. 3a) se forman en el córtex interno de la raíz y se caracterizan por tener un meristemo apical activo no invadido (lo que le da una forma cilíndrica), una zona de invasión, una zona de desarrollo de simbiosomas, una zona de alta fijación de nitrógeno, donde los bacteroides están completamente maduros, y una zona de senescencia (revisado en Brewin 1991).

Los nódulos determinados (Fig. 3b) se caracterizan por ser esféricos y con un meristemo determinado. En este caso, las bacterias que invaden los nódulos se diferencian de manera sincrónica (revisado en Brewin 1991).

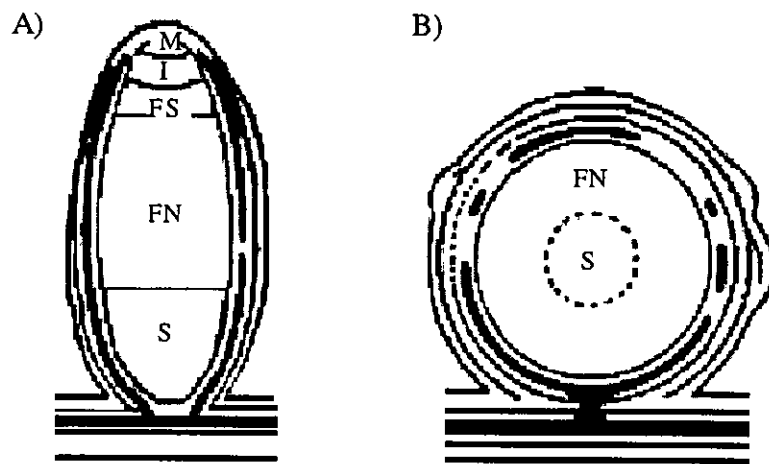


Fig. 3. Estructura general de un nódulo indeterminado (A) y de un nódulo determinado (B), mostrando las zonas meristémica (M), de invasión (I), de formación de simbiosomas (FS), de fijación de nitrógeno activa (FN) y de senescencia (S). (Tomado de Hirsch 1992).

Los bacteroides diferenciados se caracterizan porque no se dividen, tienen una forma alargada, sus membranas se adelgazan y se juntan de manera que entran en contacto una con la otra. La composición proteica de las membranas varía y hay una disminución marcada de la cantidad de lipo- y exopolisacáridos de su superficie. Los bacteroides activos en fijación de nitrógeno presentan un citoplasma heterogéneo con zonas de alta densidad electrónica ricas en ribosomas y/o polisomas, y zonas de baja densidad con fibras de DNA (Vasse et al. 1990; revisado en Lugtenberg 1992). Fisiológicamente, los bacteroides son osmóticamente más sensibles que las bacterias no diferenciadas, acumulan poli- $\beta$ -hidroxibutirato y su viabilidad está ligeramente disminuida. La cadena respiratoria que se encuentra activa es exclusiva de este estadio de diferenciación y el ciclo de asimilación de amonio no se induce. Sin embargo, las células no carecen de nitrógeno (Werner 1992; revisado en Udvardi y Day 1997).

La infección a través de hilos no es la única forma de lograr la simbiosis, diversas bacterias comienzan la infección a través de puntos de ruptura (crack entry) ó abriéndose paso entre las células radiculares. Algunas bacterias inducen, como ya mencionamos, rápidas divisiones celulares, otras aprovechan aquellas células que se están dividiendo o las que están formando raíces laterales, para lograr la infección (revisado en Brewin 1991, y en Van Rhijn y Vanderleyden 1995).

En unas cuantas especies de leguminosas, como *Sesbania rostrata*, la nodulación puede ocurrir en el tallo además de en la raíz. La infección en el tallo ocurre en puntos específicos (en primordios de raíces adventicias), por un mecanismo similar al de "crack entry". Los nódulos de estas plantas presentan características intermedias entre las de los nódulos determinados y los indeterminados, o pueden formar un tipo especial de nódulos en forma de collar (revisado en Boivin et al. 1997).

A nivel celular, los factores de nodulación provocan rápidos cambios en la polaridad de las membranas (Ehrhardt et al. 1992). Estos cambios son directamente dependientes del tipo de modificaciones del esqueleto del factor de nodulación (Felle et al. 1995). Los cambios de polaridad provocan alcalinización del medio (Staehelin et al. 1994), cambios en el flujo de calcio a través de

la membrana (Baron y Zambryski 1995), así como en la concentración de calcio alrededor del núcleo y la vacuola (Ehrhardt et al. 1996; Cárdenas et al. 1998). Los factores de nodulación inducen también la activación del ciclo celular en células ya diferenciadas (Meskiene et al. 1997; revisado en Baron y Zambryski 1995) y rearrreglos en el citoesqueleto de actina y tubulina (Cárdenas et al. 1998; Timmers et al. 1998) .

En general, tras la inducción con factores de nodulación, la planta aumenta la producción de flavonoides y de lectinas excretadas al medio, ya que se activa la vía de los fenilpropanoides como parte de una respuesta de defensa de la planta (revisado en Baron y Zambryski 1995). Las lectinas, se han relacionado con la adherencia y agregación de la bacteria en la raíz y con el reconocimiento de los propios factores de nodulación (Díaz et al. 1995; revisado en Van Rhijn y Vanderleyden 1995) y con la estimulación de la división celular (Brewin y Kardailski 1997). También se desencadena otro tipo de mecanismo de defensa, caracterizado por un aumento en la concentración de quitinasas y por la degradación de factores Nod por una serie de hidrolasas sustrato específicas (Stahelin et al. 1995). Hasta ahora, se han identificado sitios específicos de unión a quitooligosacáridos en membranas de células en suspensión de arroz (Shibuya et al. 1993) y jitomate (Baureithel et al. 1994). Aunque los receptores de la planta para factores de nodulación aún no se han caracterizado, ya se han encontrado sitios de alta afinidad por factores de nodulación en raíz (Bono et al. 1995) y en la fracción microsomal de células de *Medicago* (Niebel et al. 1997): sitios capaces de discriminar entre moléculas con distintos grupos acilos, entre moléculas acetiladas y no acetiladas, y entre moléculas con esqueletos de glucosaminas de diferente longitud (Gressent et al. 1999). Asimismo, existen evidencias de que proteínas G están involucradas en el mecanismo de transducción de las señales de los factores de nodulación (Pingret et al. 1998)

La forma de infección y el tipo de nódulos depende de la planta. Es ésta la que posee la información genética que determinará el tipo de nódulo que se formará en respuesta al estímulo bacteriano (Van Brussel et al. 1992). Desde que comienza la infección y durante toda la simbiosis, la planta expresa una serie de genes, que en muchos casos son nódulo específicos, llamados nodulinas. Las nodulinas tempranas son aquellas que se expresan durante los primeros estadios del establecimiento de la simbiosis y están íntimamente ligadas a los procesos de reconocimiento e



infección, la formación del primordio nodular y su diferenciación a un nódulo maduro. *ENOD12* y *ENOD5*, por ejemplo, son algunos de los genes de nodulinas expresadas tempranamente a nivel de epidermis (revisado en Heidstra y Bisseling 1996); éstas codifican para proteínas ricas en prolina que se piensa forman parte de la pared celular (revisado en Schultze y Kondorosi 1998). *ENOD40* se expresa en células del córtex y el periciclo y codifica para un pequeño polipéptido (10 a 13 aa.) que parece actuar como un regulador del crecimiento (tipo fitohormona) (Crespi et al. 1998; Johanson et al. 1998; Schell et al. 1998). Las nodulinas tardías son aquellas que se expresan después de la maduración del nódulo y durante la fijación de nitrógeno. Entre las nodulinas tardías destaca la nodulina 26 que forma un canal iónico en la membrana peribacteroidal y, probablemente, se encarga de el transporte de malato, la principal fuente de carbono del bacteroide (citado en Assman 1995).

### **Los factores de nodulación.**

Los factores de nodulación son sintetizados y secretados por la acción conjunta de una serie de genes bacterianos; algunos de éstos son comunes (equivalentes) a todas las especies y otros muchos son específicos de una especie o hasta de una cepa. La expresión de estos genes se regula principalmente por acción de la proteína NodD. Esta proteína reconoce los inductores secretados por las leguminosas y responde a ellos de manera diferencial. Los extremos N-terminal de las distintas proteínas NodD poseen un motivo hélice-vuelta-hélice que determina el pegado a DNA y están mucho más conservados que los extremos C-terminal (revisado en Fisher y Long 1992, y en Schlaman et al. 1992).

El extremo carboxilo de NodD está poco conservado y es tal vez el principal encargado de reconocer al inductor (revisado en Fisher y Long 1992), aunque la especificidad se atribuye a la estructura terciaria de la proteína (revisado en Van Rhijn y Vanderleyden 1995). Se cree que el inductor provoca un cambio conformacional en la proteína nodD, lo que le permite funcionar como activador de los genes *nod* (revisado en Van Rhijn y Vanderleyden 1995).

La proteína activadora NodD, en su forma dimérica, se une a secuencias conservadas llamadas cajas *nod* (Rostas et al. 1986) e induce un doblez en el DNA que, probablemente, sirve para hacer más eficiente la apertura de la hélice para la transcripción (revisado en Fisher y Long 1993). Además de interactuar con la RNA polimerasa, NodD interactúa con GroELc para activar la transcripción (Ogawa y Long 1995). La mayor parte de los genes para la síntesis y secreción de los factores de nodulación son activados por NodD, aunque algunos carecen de una caja *nod* evidente. También depende de la activación por NodD, una gran cantidad de genes cuya función específica no se conoce, pero que están involucrados en la eficiencia de la nodulación y en la capacidad de nodular especies o cultivares específicos de plantas (revisado en Pueppke 1996).

La estructura general de los factores de nodulación de todas las especies de rhizobáceas es la misma: Un esqueleto de *N*-acetil-D-glucosamina, unidas por enlaces  $\beta$ -1,4 y *N*-aciladas en el extremo no reductor (Fig. 4, tabla I). Estos compuestos han sido purificados a partir de sobrenadantes de cultivos (factores de nodulación secretados) y/o de membranas celulares (donde pueden acumularse en grandes cantidades, como se reportó para *R. meliloti* y *R. trifolii*; Cedergren et al. 1995; Orgambide et al. 1995), fraccionados por cromatografía y analizados, principalmente, por espectrometría de masas (Roche et al. 1991a; Spaink et al. 1992). Dependiendo de la especie, los factores de nodulación varían en la longitud del esqueleto de quitina, la longitud e insaturaciones del grupo acilo y las sustituciones en los extremos reductor y no reductor de la molécula (Fig. 4, tabla I). De estas variaciones depende, en parte, el rango de huésped de cada cepa (revisado en Dénarié et al. 1994, y en Bladergroen y Spaink 1998). Se ha demostrado, que las diferentes sustituciones sobre el esqueleto de oligoquitina protegen al factor de nodulación de la acción hidrolítica de las quitinasas de la planta (Stahelin et al. 1994).

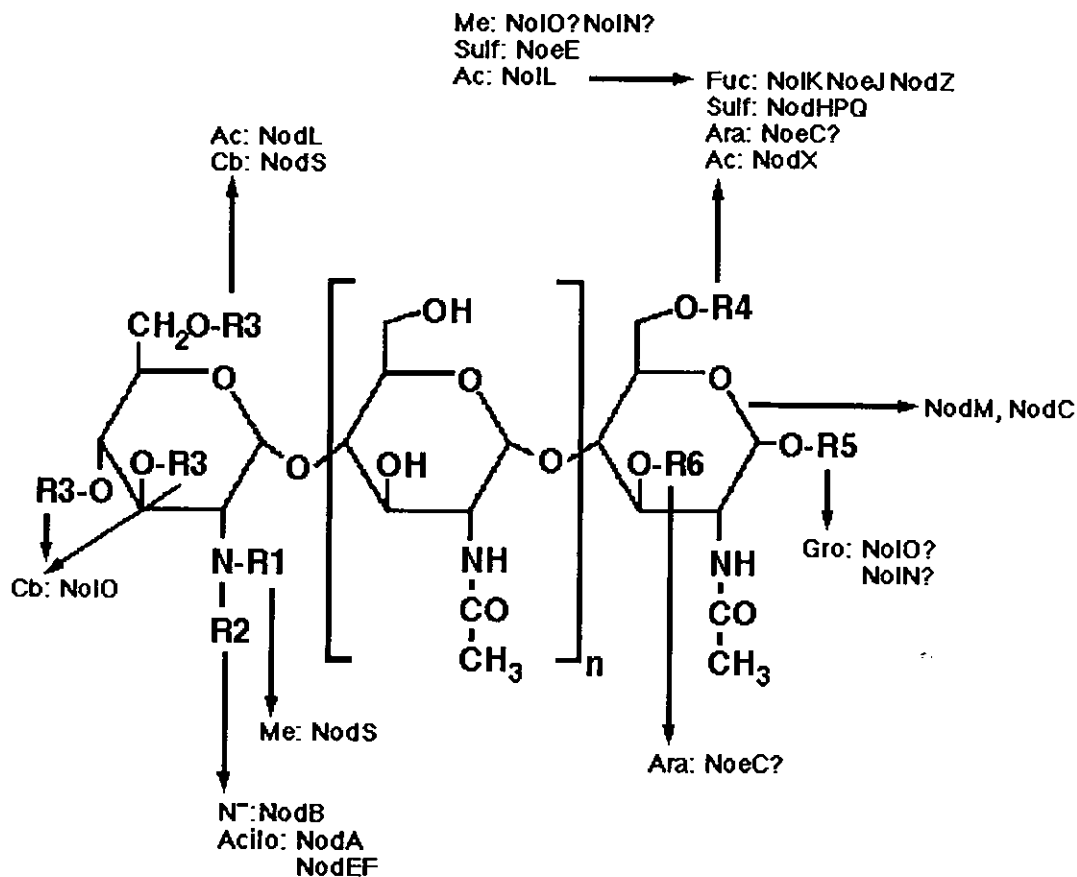


Fig.4. Estructura general de los factores de nodulación producidos por las distintas especies de rizobáceas y algunas de las proteínas asociadas a su síntesis (ver Tabla I). Abreviaturas: Ac=acetil, Ara=arabinosil,Cb=carbamil, Fuc=fucosil, Gro=glicerol, Me=metil, N<sup>-</sup>=grupo amino libre, Sulf=sulfato.

Tabla I: Grupos sustituyentes de los diferentes factores de Nodulación.

Especie	R1	R2	R3	R4	R5	R6	n	Cita (notas)
<i>R. meliloti</i> ( <i>Sinorhizobium</i> )	H	C16:0, C16:1, C16:2, C16:3, C18:0, C18:1, C18:4, C18-C26 (w-1)OH	H, Ac(O-6, O-3 ú O-4)	S	H	H	1,2,3	Lerouge et al. 1990; Roche et al. 1991a; Demont et al. 1993, 1994.
<i>R. leg. bv. viciae</i>	H	C18:1, C18:4	H, Ac(O-6)	H	H	H	2,3	Spaink et al. 1991.
<i>R. leg. bv. viciae</i> cepa TOM	H	C18:1, C18:4	Ac(O-6)	H, Ac(O-6)	H	H	2,3	Firmin et al. 1993.
<i>R. leg. bv. trifolii</i>	H	C18:0, C18:1, C18:3, C20:3, C20:4	Ac(O-6)	H	H	H	1,2,3	Van der Drift et al. 1996.
<i>R. loti</i> ( <i>Mesorhizobium</i> )	Me	C18:0, C18:1	H, Cb(O-4)	AcFuc, Fuc	H	H	3	López-Lara et al. 1995a.
<i>R. loti</i> cepa NZP2213 ( <i>Mesorhizobium</i> )	H,Me	C16:0, C16:1, C18:0, C18:1 OH-C18:1, C20:0, C20:1, C22:1	H, Cb(O-4)	AcFuc, Fuc	H	H	0,1,2,3	Olsthoorn et al. 1998. (Presentan un sustituyente a-1,3-fucosa en la glucosamina proximal al extremo no reduc- tor)
<i>R. etli</i>	Me	C18:0, C18:1	H, Cb(O-4)	AcFuc, Fuc	H	H	3	Cárdenas et al. 1995; Poupot et al. 1995.
<i>R. tropici</i>	H,Me	C18:0, C18:1, C18:2, C16:0, C16:1, C20:0, C20:1.	H	H, S	H	H	2,3	Poupot et al. 1993; Folch-Mallol et al. 1996.
<i>R. tropici</i> CIAT899	Me	C18:1	H	-	-	-	4+Man	Folch-Mallol et al. 1996.
<i>R. fredii</i>	H	C16:0, C16:1, C18:0, C18:1	H	MeFuc, Fuc	H,Fuc	H	1,2,3	Bec-Ferté et al. 1994, 1996; Gil-Serrano et al. 1997. (Se han observado pentámeros donde el azúcar central es una glucosa)

<i>R. huakii</i>	H	C18:4?	H	H	H	H	H	3	Promé et al. 1998. (El grupo N-acetilo del ex-tremo reductor puede estar sustituido por un grupo N-glicoilo)
<i>R. galegae</i>	H	?	Cb(O-6)	H	H	H	H	2,3	Promé et al. 1998. (En su mayoría 3-O-acetilados en el antepenúltimo residuo de glucosamina)
<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	Me	C16:0, C18:1	Cb(O-6 y O-3 ú O-4), H, Ac(O-6)	MeFuc, MeSFuc, AcMeFuc	H	H	H	3	Price et al. 1992.
<i>Rhizobium</i> sp. GRH2	H,Me	C16:0, C18:0, C18:1, C20:1	H	H, S	H	H	H	2,3,4	López-Lara et al. 1995b.
<i>Rhizobium</i> sp. ORS1001	Me	C18:0, C18:1	Cb	H, S	H	H	H	3	Lorquin et al. 1997b.
<i>B. japonicum</i>	H	C18:1, C16:0, C16:1	H, Ac(O-6)	MeFuc	H	H	H	3	Sanjuan et al. 1992; Carlsson et al. 1993.
<i>B. elkanii</i>	H,Me	C16:0, C18:1	H, Ac(O-6), Cb (1 ó 2)	MeFuc, Fuc	H, Gro	H	H	2,3	Carlsson et al. 1993; Sittokermans et al. 1996.
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (Acacia)	Me	?	Cb (1 ó 2)	MeFuc, MeSFuc	H	H	H	3	Boivin et al. 1997.
<i>A. caulinodans</i>	H,Me	C16:0, C18:0, C18:1	Cb(O-6)	H, Fuc, D-Ara	H	H, Ara	H, Ara	2,3	Mergaert et al. 1993, 1996, 1997a.
<i>S. saheli</i> y <i>S. teranga</i> bv. <i>sesbanie</i>	Me	C16:0, C18:0, C18:1	H, Cb	D-Ara, H, L-Fuc	H	H, Ara	H, Ara	2,3	Boivin et al. 1997; Lorquin et al. 1997a.
<i>S. teranga</i> bv. <i>acaciae</i>	Me	C16:0, C18:0, C18:1	Cb	H, S	H	H	H	3	Lorquin et al. 1997b.

Abreviaturas:

A.=*Azorhizobium*; B.=*Bradyrhizobium*; S.=*Sinorhizobium*; R.=*Rhizobium*; leg.=*leguminosarum*.  
 Ac=acetil; AcFuc=4-O-Acetilfucosil; AcMeFuc=3-O-acetil-2-O-metilfucosil; Ara=arabinosil; Cb=carbamil; Fuc=fucosil; Gro=glicerol;  
 Man=manosa; Me=metil; MeFuc=2-O-metilfucosil; MeSFuc=4-O-sulfo-2-O-metilfucosil; S=sulfato; C16:0=ácido palmítico, C18:0=ácido  
 esteárico; C18:1=ácido vaccénico, C18:2=ácido octadecadienoico, C18:3=ácido octadecatrienoico, C18:4=ácido octadecatetraenoico.

Los genes involucrados en la nodulación han sido identificados por diferentes métodos genéticos, como pérdida ó ganancia de función y respuesta específica a inducción por flavonoides, ó por similitud a nivel de secuencia de DNA y/o proteínas (revisado en Martínez et al. 1990, y en Pueppke 1996). Generalmente, después de la identificación de un nuevo gene de nodulación en alguna especie de *Rhizobium*, el fragmento de DNA correspondiente al gene es utilizado como detector en experimentos de hibridación en sistemas heterólogos (revisado en Pueppke 1996). La función de muchos de estos genes ha sido probada experimentalmente, sin embargo, la función de otros sólo se ha deducido con base en la similitud que comparte a nivel de secuencia de aminoácidos con otras proteínas previamente descritas.

Pueppke (1996), propone una clasificación de los genes de nodulación de acuerdo al efecto simbiótico que causan sus mutantes, en:

-Genes requeridos para la nodulación: su inactivación provoca un fenotipo Nod<sup>-</sup>.

-Genes con efectos cuantitativos: su inactivación provoca retraso en la nodulación, formación de un menor número de nódulos o nodulación de un número menor de plantas.

-Genes que modulan el rango de huésped: su inactivación altera el número de especies y/o cultivares que pueden ser nodulados.

Algunas de las proteínas codificadas por los genes de nodulación hasta ahora identificados y su posible función, son:

Proteína	Función	Referencia
NodA	N-acil transferasa. Transfiere un grupo acilo al sitio deacetilado por NodB.	Atkinson et al. 1994; Mergaert et al. 1995; Debellé et al. 1996; Ritsema et al. 1996.
NodB	Quito-oligosacárido deacetilasa. Deacetila el extremo no reductor del esqueleto de N-acetil glucosamina.	John et al. 1993.
NodC	N-acetilglucosamil transferasa, asociada a membrana interna, sintetiza el esqueleto de glucosaminas formado por enlaces $\beta$ -1,4. Determinante de la longitud del esqueleto.	Geremia et al. 1994; Kamst et al. 1995, 1997.
NodD	Regulador tipo LysR de los genes <i>nod</i> . Interactúa con las flavonas específicas del hospedero y se une a las cajas <i>nod</i> para activar la transcripción, junto con GroELC y la RNA polimerasa. <i>nodD</i> se expresa constitutivamente y se auto-regula. En algunas especies, está reiterado. En otras puede funcionar como regulador negativo de los genes <i>nodABC</i> .	Van Rhijn et al. 1994; Fellay et al. 1998; revisado en Schlaman et al. 1992.
NodE	$\beta$ -cetoacil sintasa. Sintetiza ácidos grasos poli-insaturados. Su dominio central de 42 pb, determina el tipo de insaturación.	Spaink et al. 1989, 1991; Demont et al. 1993; Megias et al. 1993; Bloemberg et al. 1995b.
NodF	Proteína acarreadora del grupo acilo que sintetiza NodE. Se demostró que el residuo Ser35 es esencial para su funcionamiento.	Geiger et al. 1991; Demont et al. 1993; Megias et al. 1993; Ritsema et al. 1994.
NodG	$\beta$ -cetoacil reductasa, deshidrogenasa ó 3-oxoacil reductasa. Posiblemente involucrada en la síntesis de ácidos grasos.	Demont et al. 1993
NodH	Sulfotransferasa. Junto con NodPQ se encarga de la sulfatación del factor Nod	Roche et al. 1991b; Megias et al. 1993; Ehrhardt et al. 1995.
NodI	Proteína citoplásmica de unión a ATP, junto con NodJ se encarga de la secreción de los factores de Nod.	Vázquez et al. 1993; Spaink et al. 1995; Cárdenas et al. 1996; Fernández-López et al. 1996.
NodJ	Proteína membranal que interactúa con NodI para secretar los factores Nod.	Vázquez et al. 1993; Spaink et al. 1995; Cárdenas et al. 1996; Fernández-López et al. 1996.
NodK	Función desconocida. Descrita en diversas especies de <i>Bradyrhizobium</i> . Similar a NodY.	Scott 1986; Dobert et al. 1994.
NodL	6-O-acetil transferasa. Acetila el extremo no reductor del factor Nod, utilizando acetil-CoA como donador. Actúa preferentemente sobre un esqueleto de quitina con un grupo amino libre en el extremo no reductor.	Baev y Kondorosi 1992; Bloemberg et al. 1995a.
NodM	D-glucosamina sintasa. Sintetiza las glucosaminas necesarias para la formación del factor Nod.	Baev et al. 1991, 1992; Baev y Kondorosi 1992.

NodN	Posible acetil-glucosamina-1-fosfato uridil transferasa, necesaria para la formación de UDP- <i>N</i> -acetil-glucosamina. Influye en la eficiencia de producción de factores Nod.	Baev et al. 1991, 1992; Baev y Kondorosi 1992; Carlson et al. 1994.
NodO	Proteína secretada capaz de complementar mutantes <i>nodEF</i> . Probablemente se integra a membrana de células vegetales, formando poros catión-selectivos, permeables a Ca <sup>2+</sup> , provocando un incremento en la [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cit</sub> y dando inicio a las cascadas de regulación y/o los mecanismos de transducción de señales mediadas Ca <sup>2+</sup> .	Downie et al. 1994; Finnie et al 1998; citado en Assman 1995.
NodP	ATP-sulfurilasa. Junto con NodQ activa el sulfato que ha de transferirse al esqueleto del factor Nod.	Schwedock y Long 1990, 1992; Roche et al. 1991b; Megias et al. 1993; Laeremans et al. 1996.
NodQ	ATP-sulfurilasa, APS cinasa, interactúa con NodP para activar el grupo sulfato que será transferido al extremo reductor del factor Nod.	Schwedock y Long 1990, 1992; Roche et al. 1991B; Megias et al. 1993; Laeremans et al. 1996.
NodR	Involucrada en especificidad. Es parte del operón <i>nodEFRL</i> en <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> .	McIver et al. 1993.
NodS	S-adenosil metionin-metil transferasa. Se encarga de la N-metilación de los factores Nod en su extremo no reductor. Funciona sobre compuestos deacetilados y no acilados.	Geelen et al. 1993, 1995; Jabbouri et al. 1995; Mergaert et al. 1995.
NodT	Proteína de membrana externa, tal vez involucrada en la secreción del factor Nod.	Rivilla et al. 1995, Hernández-Mendoza et al. 1998.
NodU	6-O-Carbamil transferasa, carbamila la glucosamina no reductora del factor Nod.	Jabbouri et al. 1995.
NodV	Sensor de la familia del sistema de dos componentes. Posiblemente fosforila a NodW. Regulador de la expresión de los genes <i>nod</i> .	Göttfert et al. 1990.
NodW	Activador de la familia del sistema de dos componentes. Indispensable para la activación de algunos de los genes <i>nod</i> en conjunción con NodD1 y las flavonas de la planta. NodW puede fosforilarse.	Göttfert et al. 1990; Sanjuan et al. 1994; Loh et al. 1997.
NodX	Acetil transferasa, se encarga de la 6-O-acetilación del factor Nod en el extremo reductor.	Firmin et al. 1993; Downie et al. 1994.
NodY	Función desconocida. En <i>B. japonicum</i> antecede a <i>nodA</i> , su expresión es dependiente de NodD1 y NodW.	Luka et al. 1993.
NodZ	Fucosil transferasa que transfiere un residuo de fucosa al extremo reductor del factor Nod.	Stacey et al. 1994; López-Lara et al. 1996; Mergaert et al. 1996; Quesada-Vincens et al. 1997; Quinto et al. 1997.



NolA	Regulador negativo de la transcripción de genes <i>nod</i> . Posible regulador tipo MerR con un dominio hélice-vuelta-hélice de unión a DNA. En <i>B. japonicum</i> se han identificado tres isoformas.	Dockendorff et al. 1994; Garcia et al. 1996; Stacey 1998.
NolB	Función desconocida. En <i>R. fredii</i> es necesaria para nodular soya. En <i>Rhizobium sp.</i> NGR234 se expresa, pero la cepa es incapaz de nodular soya. <i>NolB</i> no tiene una caja <i>nod</i> asociada, sin embargo su expresión depende de NodD.	Meinhardt et al. 1993; Balatti et al. 1995; Freiberg et al. 1997; Pueppke et al. 1998.
NolC	Proteína cultivar específico de <i>R. fredii</i> , la secuencia de <i>nolC</i> es parecida a la de un gene de "heat-shock" aunque no parece estar involucrada en este tipo de respuesta	Krishnan y Pueppke 1992.
NolD	Posible regulador	Downie 1998.
NolE	Proteína secretada, función desconocida.	Davis y Johnston 1990.
NolFGHI	Proteínas de membrana, posiblemente ayudan en la secreción del factor Nod.	Baev et al. 1991; Saier et al. 1994.
NolJ	Función desconocida. La expresión de <i>nolJ</i> depende de activación por NodD aunque no tiene una caja <i>nod</i> asociada. Mutantes en <i>nolJ</i> presentan un retraso en la nodulación.	Boundy-Mills et al. 1994.
NolK	Posible 3,5-GDP-manosa-epimerasa ó 4-reductasa. Involucrada en uno de los últimos pasos de la síntesis de GDP-Fucosa.	Mergaert et al. 1996, 1997a, 1997b; Vinuesa et al. 1998.
NolL	Posible acetil-transferasa, involucrada en la acetilación del residuo de fucosa presente en el extremo reductor de algunos factores Nod.	Scott et al. 1996; Berck et al. 1999; Corvera et al. 1999.
NolM	Función desconocida. Su expresión es dependiente de NodD1 y NodW.	Luka et al. 1993; Ardourel et al, 1994.
NolN	Involucrado en la 2-O-metilfucosilación del factor Nod ó en la unión glicosídica de un glicerol y el extremo reductor.	Luka et al. 1993.
NolO	1)Involucrado en la 3,4-O-carbamilación del extremo no reductor del factor Nod ( <i>Rhizobium sp.</i> NGR234). 2)Involucrado en la unión glicosídica de un glicerol y el extremo reductor ó en la 2-O metilfucosilación del factor Nod ( <i>Bradyrhizobium japonicum</i> ).	Luka et al. 1993; Freiberg et al. 1997; Jabbouri et al. 1998.
NolP	Función desconocida.	Davis y Johnston 1990.
NolQ	Proteína huésped específica de <i>R. meliloti</i> , su pérdida retrasa la nodulación sobre cultivares específicos de <i>Medicago lupulina</i> .	Plazanet et al. 1995
NolR	Regulador negativo, tipo LysR, de la expresión de los genes <i>nod</i> .	Cren et al. 1995.
NolS	Proteína huésped específica de <i>R. meliloti</i> , su pérdida retrasa la nodulación sobre cultivares específicos de <i>Medicago</i> .	Plazanet et al. 1995.

NoITUV	Función desconocida. En <i>R. fredii</i> son necesarias para nodular soya. En <i>Rhizobium sp.</i> NGR234 se expresan, sin embargo, la cepa es incapaz de nodular soya.	Meinhardt et al. 1993; Balatti et al. 1995; Freiberg et al. 1997.
NoIW	Proteína de la familia PulD de sistemas de secreción, cultivar específica de <i>R. fredii</i> , necesaria para nodular soya. <i>noIW</i> se expresa constitutivamente.	Meinhardt et al. 1993; Kovács et al. 1995; Freiberg et al. 1997.
NoIX	Posiblemente involucrada con la secreción de los factores Nod. Proteína cultivar específica, su expresión depende de NodD, de la inducción por flavonoides y del status nutricional del medio, pero que no tiene una caja- <i>nod</i> asociada. Similar a <i>hrpF</i> de <i>Xanthomonas campestris</i> (participa en patogenicidad).	Meinhardt et al. 1993; Bellato et al. 1997; Huguet 1997; Pueppke et al. 1998.
NoIYZ	Función desconocida. Mutantes en estos genes tienen un efecto marginal en la nodulación.	Dockendorff et al. 1994.
NoeA	Posible metil-transferasa. Proteína huésped específica. Mutaciones en <i>noeA</i> no provocan cambios en la estructura de los factores Nod.	Ardourel et al. 1995.
NoeB	Posiblemente asociada a membrana. Proteína huésped específica. Mutaciones en <i>noeB</i> no provocan cambios en la estructura de los factores Nod.	Ardourel et al. 1995.
NoeC	Involucrado en la arabinosilación de factores Nod; posiblemente transmembranal.	Mergaert et al. 1996.
NoeD	Posible regulador negativo de la nodulación, genotipo específico. Una mutante <i>noeD<sup>-</sup></i> de <i>B. japonicum</i> sintetiza una mayor cantidad de factores Nod acetilados.	Lohrke et al. 1998.
NoeE	Sulfotransferasa específica para la sulfatación de residuos de fucosa en los factores Nod. Para funcionar requiere que el esqueleto del factor esté acilado.	Freiberg et al. 1997; Hanin et al. 1997; Quesada-Vincens, 1998.
NoeF	Función desconocida. Mutantes en <i>noeF</i> tienen problemas para competir por la nodulación.	Smith et al. 1998.
NoeH	Posiblemente involucrado en la arabinosilación de los factores Nod.	Gao et al. 1998.
NoeI	Involucrada en la 2-O-metilación del residuo de fucosa del factor Nod.	Freiberg et al. 1997.
NoeJ	Posible manosa-1-P-guanilil transferasa necesaria para la síntesis de un residuo activo de fucosa.	Freiberg et al. 1997; Vinuesa et al. 1998.
NoeK	Fosfomanomutasa, necesaria para la nodulación.	Freiberg et al. 1997.
NoeL	GDP-D-Manosa deshidratasa, necesaria para la nodulación.	Freiberg et al. 1997.
SyrB	Regulador negativo de SyrM.	Barnett y Long 1997.
SyrM	Regulador tipo LysR. Activa a genes <i>nod</i> flavonoide-independientes. En varias especies regula la expresión de <i>nodD3</i> . También regula la expresión de genes de la vía de los EPS activando a <i>syrA</i> .	Barnett y Long 1990; Kondorosi et al. 1991; Swanson et al. 1993; Hanin et al. 1998.

NoeG. Este nombre no ha sido asignado (W. Broughton, comunicación personal).

## **Los factores de Nodulación como determinantes de la infección.**

Los factores de nodulación son, sin duda, la señal determinante de la infección. La aplicación de factores de nodulación puros a raíces de leguminosas específicas, provoca la deformación de los pelos radiculares, su ramificación y enroscamiento (Relic' et al. 1993), mitosis de células del córtex y hasta la formación de nódulos vacíos, dependiendo de la concentración del factor Nod aplicado (revisado en Schultze et al. 1994). Cepas *nodABC*<sup>-</sup> coinoculadas con factores de nodulación purificados son capaces de nodular y fijar nitrógeno y adquieren el rango de huésped de la cepa de la cual se aislaron los factores Nod (Relic' et al. 1993, 1994). Cepas *nodA*<sup>-</sup> de *Azorhizobium caulinodans* coinoculadas con cepas LPS<sup>-</sup> son capaces de infectar a la planta huésped y formar nódulos. Sin embargo, estos nódulos (únicamente invadidos por la cepa *nodA*<sup>-</sup>) son anormales, lo que sugiere que es necesaria una producción continua de factores de nodulación durante la infección e invasión del nódulo, para completar el programa de desarrollo nodular en *Sesbania rostrata* (D'Haeze et al. 1998).

Estudios recientes en que se introdujeron diversos compuestos al interior de células vegetales radiculares de *Vicia sativa*, por técnicas de bombardeo genético, demuestran que un oligosacárido *O*-acetilado es suficiente para inducir la respuesta de división celular en las células corticales. La evidencia favorece un modelo en que el sustituyente acilo es necesario para que los factores de nodulación sean transportados al interior de las células vegetales (Schlaman et al. 1997).

## **Otros genes involucrados en la nodulación.**

La expresión de los genes de nodulación y la secreción de los factores Nod a la rizósfera no son los únicos determinantes para que la nodulación se lleve a cabo exitosamente. Para ello, es necesaria también la expresión de los genes bacterianos *exo*, *lps* y *ndv*, involucrados en la síntesis de *exo*- y lipopolisacáridos, y  $\beta$ -glucanos, respectivamente. Mutaciones en estos genes alteran el

proceso de infección de tal manera que pueden causar la formación de nódulos vacíos.

Los exopolisacáridos (EPS) y los lipopolisacáridos (LPS) son importantes para la supervivencia de la bacteria en la rizósfera. Ambos son necesarios para la infección y formación de nódulos: cepas EXO<sup>-</sup> y/o LPS<sup>-</sup>, comienzan la formación de hilos de infección pero todos ellos son abortados, por lo que se les ha relacionado con la liberación de las bacterias del hilo de infección hacia el primordio nodular (revisado en García-de los Santos y Brom 1997) y con el inicio y desarrollo mismo del hilo de infección (Dazzo et al. 1991; Cheng y Walker 1998; Van Workum et al. 1998). Se cree también que protegen a la bacteria de las respuestas de defensa de la planta (Eisenschenk et al. 1994; Niehaus et al. 1998a; revisado en Baron y Zambryski 1995). Se ha propuesto que los genes *exo* y *lps* podrían ser importantes en la especificidad (Van Workum et al. 1998). Algunas mutantes LPS<sup>-</sup> de *R. meliloti*, por ejemplo, son capaces de nodular plantas de *Medicago sativa* pero no de *M. truncatula* (Niehaus et al. 1998b). A su vez, los genes *ndv* se han relacionado con el desarrollo eficiente de los nódulos (Bhagwat et al. 1995).

La concentración de los polisacáridos de membrana, es también importante. Un exceso de succinoglicanos, por ejemplo, interfieren negativamente con la colonización (Cheng y Walker 1998).

La importancia de cada uno de estos polisacáridos puede depender de la especie y de la cepa. En *Bradyrhizobium japonicum*, por ejemplo, se han estudiado diversas mutantes EPS<sup>-</sup> y/o KPS<sup>-</sup> (polisacáridos capsulares). Algunas de estas mutantes desarrollan nódulos normales (aunque tardíamente), otras en cambio presentan deficiencias en la invasión de las células vegetales y en el inicio del desarrollo del nódulo (Eggleston et al. 1996). Los polisacáridos de membrana también son importantes dependiendo del tipo de nódulo que determine la planta; en términos generales, los EPS son indispensables durante la formación de nódulos indeterminados y los LPS durante la formación de nódulos determinados (revisado en Hirsch 1992).

Recientemente, se propuso un modelo en el que los EPS de bajo peso molecular (succinoglicanos), los LPS y los KPS podrían estar funcionando como señales reguladoras de

diversas respuestas de las plantas huésped. El modelo propone la existencia de sustancias inductoras que provocan la respuesta de defensa de la planta (tal vez originadas en la bacteria ó liberadas de la planta por una enzima bacteriana: ¿fragmentos de pared celular?) y los diversos polisacáridos funcionan como supresores de esta respuesta para lograr la nodulación (Niehaus et al. 1998a; Pühler 1998; York et al. 1998; Fig. 5). Una segunda hipótesis propone que los polisacáridos de membrana permiten acelerar el proceso de enroscamiento de pelos radiculares y de infección y que esto permite evitar la respuesta de defensa de la planta (Van Workum et al. 1998).

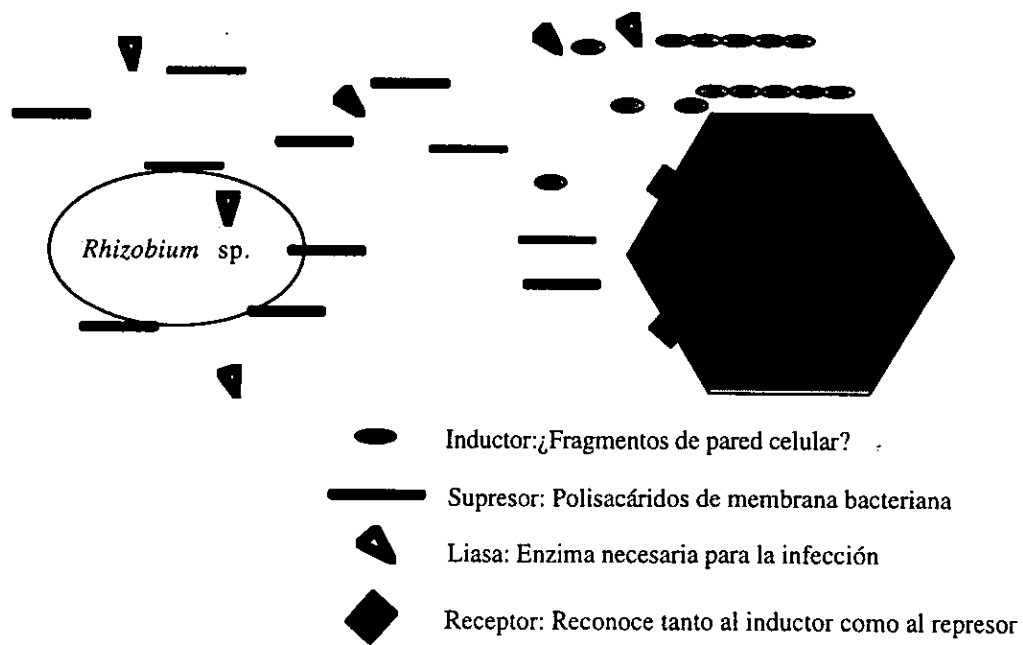


Fig. 5. Modelo de inducción y supresión de la respuesta de defensa de la planta, mediada por polisacáridos de membrana, para lograr la infección de la planta (Tomado de Niehaus et al, 1998a)

## Los factores de nodulación como reguladores del desarrollo.

Los factores de nodulación de las rhizobaeas son en general señales químicas que desencadenan una serie de respuestas de desarrollo en la superficie y en el córtex de la raíz de las plantas leguminosas (revisado en Pueppke 1996). Estas señales químicas se han llegado a comparar con las oligosacarinas (Stokkermans et al. 1995), que son pequeños polímeros de azúcares involucrados en la regulación del crecimiento, desarrollo y respuesta de defensa de la planta. Se ha propuesto que los factores de nodulación mimetizan a las oligosacarinas (revisado en Dénarié et al. 1996). ¿Es esta una estrategia para iniciar la nodulación regulando también las respuestas de defensa de la planta?

Es posible que los factores de nodulación interactúen con las hormonas de las plantas, directa o indirectamente, perturbando su balance para inducir la organogénesis del nódulo (revisado en Hirsch y Fang 1994, y en Schultze et al. 1994). Factores Nod purificados inducen, en distintas plantas, deformación de pelos radiculares, movilización del núcleo hacia la región basal de la célula y formación de puentes citoplásmicos o prehilos de infección, división de células corticales y hasta la formación de nódulos vacíos (Bono et al. 1995; Stokkermans et al. 1995; Noel et al. 1996); además de inducir la producción de ácido indolacético (revisado en Schultze et al. 1994). El etileno, en grandes cantidades, inhibe la nodulación; sin embargo, en concentraciones normales da información posicional para la división de las células corticales que formarán el nódulo (Heidstra et al. 1997a). El ácido jasmónico, como mencionamos anteriormente, es una fitohormona capaz de estimular la expresión de los genes *nod* (Rosas et al. 1998).

Se ha visto también que los inhibidores del transporte de auxinas y citocininas inducen a la formación de pseudonódulos (revisado en Hirsch y Fang 1994, y en Van Rhijn y Vanderleyden 1995). La inhibición del transporte de auxinas hacia el meristemo radicular lleva a la acumulación de estas hormonas en el sitio donde se formará un nuevo nódulo (Mathesius et al. 1998). La adición de citocininas a las raíces de plantas, en un medio pobre en nitrógeno, provoca respuestas de división cortical, activación de genes de nodulinas tempranas y deposición de amiloplastos, de

una manera similar a la inoculación con cepas de *R. meliloti* (Bauer et al. 1996). También se ha observado que cepas *nod-* que expresan constitutivamente al gene *tzs* (que codifica para una enzima catalizadora del paso limitante en la biosíntesis de las citocininas que ocurren naturalmente en la bacterias), son capaces de provocar la formación de estructuras tipo nódulo (Cooper y Long 1994). Estos datos sugieren que es indispensable un desbalance conjunto de auxinas y citocininas para lograr el desarrollo de un nódulo completo durante la interacción *Rhizobium*-leguminosa.

El efecto inhibitorio de los nitratos sobre la nodulación puede suprimirse parcialmente añadiendo al medio ácido indol-acético, lo que sugiere que los nitratos provocan un desbalance hormonal en las plantas (Kijne 1992). Estos datos, una vez más, nos indican que la concentración de hormonas vegetales es importante para lograr la nodulación.

Además de desencadenar el desarrollo del nódulo, los factores de nodulación son capaces de rescatar a células de zanahoria atrapadas en un estadio temprano del desarrollo embrionario (De Jong et al. 1993). Igualmente, son capaces de disminuir los requerimientos de auxinas y citocininas en protoplastos de tabaco, y estimular su crecimiento. La respuesta de los protoplastos depende del grupo acilo sustituyente en el extremo no reductor del factor de nodulación (Röhrig et al. 1995). Se ha propuesto que el grupo acilo es importante únicamente para el transporte de los factores de nodulación al interior de los tejidos vegetales, por lo que la capacidad de inducción de la respuesta de la planta podría deberse solamente a sus posibilidades de internalización (Schlaman et al. 1992; Bakkers et al. 1997).

Los factores de nodulación provocan diversas reacciones en plantas no leguminosas. Además de estimular el crecimiento en zanahoria y tabaco, los factores Nod o moléculas tipo factores Nod provocan rápidas depolarizaciones de membranas en células de arroz, inducen la producción de fitoalexinas (Shibuya et al. 1993) y provocan cambios en el pH de células en suspensión de jitomate (Staehelin et al. 1994).

Plantas transgénicas de tabaco, que expresan los genes *nodAB* presentan una alteración en su desarrollo y cambios en su morfología (revisado en Dénarié et al. 1996). A su vez, la adición de

cinetinas a la superficie radicular de plantas de tabaco, provoca la formación de pseudonódulos (citado en Cooper y Long 1994).

Es por todo esto que se ha propuesto que los factores de nodulación son moléculas tipo hormonas que pueden ser consideradas como reguladores generales del crecimiento en plantas (Röhrig et al. 1995).

La inoculación de semillas de canola y lechuga con diversas cepas de *Rhizobium* mostró que hay un aumento en el crecimiento de las plantas inoculadas con respecto a las no inoculadas. Este efecto se ha relacionado con la producción de hormonas vegetales (Noel et al. 1996) y no con la producción de factores de nodulación, aunque no se realizaron pruebas directas para descartar su participación.

### **Moléculas que se han relacionado con los factores de nodulación.**

Más allá de las plantas, se han encontrado varios genes involucrados en la síntesis de quitina y sus derivados. Las proteínas identificadas como las encargadas de la síntesis de esta quitina en diversos organismos, presentan un parecido importante, a nivel de secuencia, con proteínas NodC.

En *Streptococcus* hay síntesis de ácido hialurónico gracias a la proteína HasA. Se ha propuesto que pequeños oligosacáridos de quitina podrían servir como sustrato para la síntesis de ácido hialurónico (Semino et al. 1996).

En *Saccharomyces cerevisiae*, la quitina es importante en división celular ya que forma el septo primario que separa a las células madre e hija durante la gemación (Bulawa 1992).

En *Xenopus laevis*, se identificó la proteína DG42, que sintetiza oligosacáridos de quitina de 2 a 5 residuos de *N*-acetil glucosamina. DG42 es expresada en períodos cortos entre el final del estadio de blástula y hasta el final de la neurulación. Se produce a diferentes concentraciones a lo



largo del embrión lo que sugiere que podría jugar un papel importante en la ejecución del programa predeterminado de polaridad, más que en el establecimiento mismo de la polaridad (Semino y Robbins 1995; Semino et al. 1996; Bakkers et al. 1997).

En peces cebra, carpas y ratones también se han identificado genes homólogos a *DG42*. Estos genes se expresan entre los estadios de blástula y gástrula durante el desarrollo embrionario y codifican para una enzima necesaria para la síntesis de quitooligosacáridos (Semino et al. 1996; Bakkers et al. 1997). Los quitooligosacáridos producidos por los peces en etapas tardías de la gastrulación son capaces de producir una respuesta de alcalinización en células de la planta *Catharanthus roseus* (Bakkers et al. 1997).

Cuando se inyectan anticuerpos específicos para *DG42* a embriones de peces ó se expresa en ellos la proteína NodZ (que es capaz de fucosilar quitooligosacáridos), los esqueletos de quitina no se sintetizan ó son fucosilados; esto provoca deficiencias en el desarrollo de la cola de los peces (Bakkers et al. 1997).

Estos resultados en conjunto, nos indican que las moléculas de quitina y los oligosacáridos precursores de la quitina en general son importantes determinantes en el desarrollo. Parecería que estamos describiendo una estrategia conservada a lo largo de toda la historia evolutiva. Sin embargo, quedan aún muchas preguntas abiertas. No sabemos en realidad si los genes de bacterias son homólogos a los de eucariotes ó si nos estamos enfrentando a un fenómeno de convergencia evolutiva. Tampoco sabemos con exactitud si las diferencias estructurales entre los factores de nodulación y las moléculas de quitina descritas determinan grandes diferencias funcionales.

Aunque se han logrado muchos avances en el estudio de los factores de nodulación de las rhizobaceas, éstos siguen siendo un enigma en cuanto a su función bioquímica, a su acción específica sobre las distintas leguminosas y a su origen evolutivo. Tal vez, gracias a los estudios intensivos que se hagan sobre cada uno de los simbioses, podremos algún día contestar preguntas como ¿cuál es el papel bioquímico de cada una de las señales producidas por los simbioses?, ¿Son necesarios todos y cada uno de los sutituyentes en la molécula de quitina base de los factores de

nodulación?, ¿cuál es el origen evolutivo del nódulo? y ¿por qué la simbiosis con *Rhizobium* es (prácticamente) exclusiva de leguminosas?

## ANTECEDENTES ESPECÍFICOS Y OBJETIVOS.

*Rhizobium etli* fué definida como una especie nueva dentro del género en base a la secuencia de DNA de su gene 16S ribosomal. Las bacterias de esta especie fueron descritas como bastones flagelados, gram-negativos, aeróbicos. CFN42 fué designada la cepa tipo (Segovia et al. 1993).

*R. etli* CFN42 es una cepa capaz de establecer una relación simbiótica, efectiva en la fijación de nitrógeno, con *Phaseolus vulgaris* (Quinto et al. 1982), *Clianthus formosus*, *Crotalaria sericia*, *Desmanthus illinoensis*, *Gliricidia maculata*, *Phaseolus angularis*, *Sesbania exaltata*, *Vigna umbellata* y *Vigna unguiculata* (Hernández-Lucas et al. 1995). La información genética de *Rhizobium etli* CFN42 está dividida en siete replicones: un cromosoma y seis plásmidos denominados a (150 Kb), b (150 Kb), c (270 Kb), d (390 Kb), e (510 Kb) y f (630 Kb). De ellos, pb y pd son indispensables para la nodulación y la fijación de nitrógeno. pd posee la mayor parte de los genes *nod* y *nif* hasta ahora identificados y por ello se conoce como el plásmido simbiótico (pSym)(Brom et al. 1992; revisado en García de los Santos y Brom 1997).

El plásmido simbiótico de *R. etli* CFN42 ha sido mapeado. El mapa circular del pSym está compuesto por 85 bandas *BamHI* de diferentes tamaños y puede cubrirse en su totalidad por 16 cósmidos sobrelapantes (Fig. 6, Girard et al. 1991). La cepa CE3 es un derivado de CFN42 resistente al antibiótico espectinomicina (Noel et al. 1984) y, frecuentemente, es utilizada como un sinónimo de su cepa parental.

nodulación?, ¿cuál es el origen evolutivo del nódulo? y ¿por qué la simbiosis con *Rhizobium* es (prácticamente) exclusiva de leguminosas?

## ANTECEDENTES ESPECÍFICOS Y OBJETIVOS.

*Rhizobium etli* fué definida como una especie nueva dentro del género en base a la secuencia de DNA de su gene 16S ribosomal. Las bacterias de esta especie fueron descritas como bastones flagelados, gram-negativos, aeróbicos. CFN42 fué designada la cepa tipo (Segovia et al. 1993).

*R. etli* CFN42 es una cepa capaz de establecer una relación simbiótica, efectiva en la fijación de nitrógeno, con *Phaseolus vulgaris* (Quinto et al. 1982), *Clanthus formosus*, *Crotalaria sericia*, *Desmanthus illinoensis*, *Gliricidia maculata*, *Phaseolus angularis*, *Sesbania exaltata*, *Vigna umbellata* y *Vigna unguiculata* (Hernández-Lucas et al. 1995). La información genética de *Rhizobium etli* CFN42 está dividida en siete replicones: un cromosoma y seis plásmidos denominados a (150 Kb), b (150 Kb), c (270 Kb), d (390 Kb), e (510 Kb) y f (630 Kb). De ellos, pb y pd son indispensables para la nodulación y la fijación de nitrógeno. pd posee la mayor parte de los genes *nod* y *nif* hasta ahora identificados y por ello se conoce como el plásmido simbiótico (pSym)(Brom et al. 1992; revisado en García de los Santos y Brom 1997).

El plásmido simbiótico de *R. etli* CFN42 ha sido mapeado. El mapa circular del pSym está compuesto por 85 bandas *BamHI* de diferentes tamaños y puede cubrirse en su totalidad por 16 cósmidos sobrelapantes (Fig. 6, Girard et al. 1991). La cepa CE3 es un derivado de CFN42 resistente al antibiótico espectinomicina (Noel et al. 1984) y, frecuentemente, es utilizada como un sinónimo de su cepa parental.

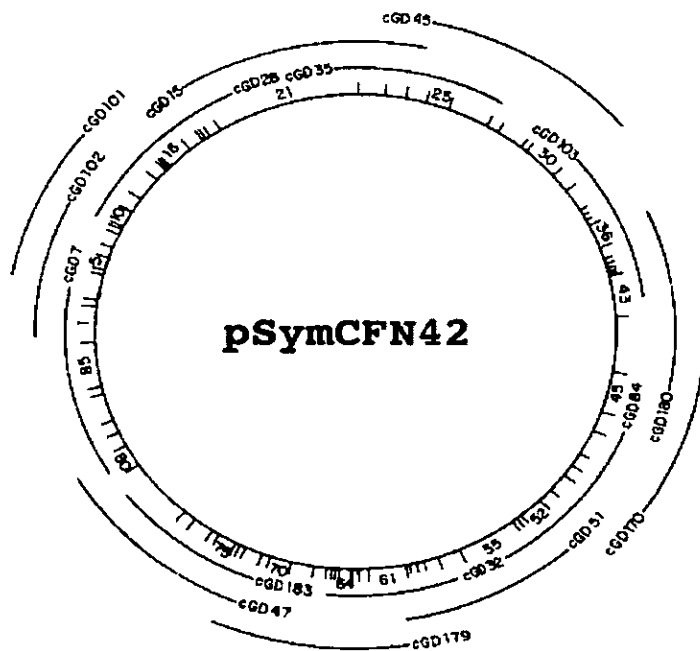


Fig. 6. Mapa físico circular del plásmido simbiótico de *Rhizobium etli* CFN42 (sitios de restricción *Bam*HI simbolizados por líneas radiales al círculo, formando en total 85 bandas) y de los 16 cósmidos (cGD; arcos externos) que lo cubren. (Tomado de Girard et al., 1991).

## Los factores de nodulación de *R. etli* CE3 y los genes *nod* involucrados en su producción y secreción.

*R. etli* CE3 responde a la inducción por flavonoides (como genisteína y naringenina; Vázquez et al. 1991) produciendo factores de nodulación. Estos factores Nod son pentasacáridos de *N*-acetil-D-glucosamina, sustituidos en el extremo no reductor por un grupo *N*-metilo, un grupo *N*-acilo (ácido esteárico ó ácido *cis*-vaccénico) y, frecuentemente, por un grupo carbamilo en C4. En su extremo reductor, los factores de nodulación de CE3 presentan un sustituyente fucosilo ó 4-*O*-acetil-fucosilo sobre C6 (Cárdenas et al. 1995; Poupot et al. 1995; Fig.7).

La mayoría de los genes que codifican para la producción de factores de nodulación en *R. etli* CE3 se encuentran, como ya mencionamos, en el pSym. Hasta ahora, sólo se ha descrito un gene *nod* fuera de este replicón: *nodT*. El gene *nodT* está reiterado en CE3, una de las copias es cromosomal y la otra se encuentra en pc. Se ha propuesto que *nodT* podría estar involucrado en la secreción de los factores de nodulación; sin embargo, aún no hay datos concluyentes al respecto (Hernández-Mendoza et al. 1998). En el pSym de CE3 se encuentran tres copias del gene regulador *nodD* y los genes *nodA*, *nodB*, *nodC*, *nodI*, *nodJ*, *nodS*, *nodU* (tal vez incompleto), *nodZ*, *nolE*, *nolL*, *nolO* y *nolP* (Girard et al. 1991; Villalobos et al. 1994; Girard et al. 1996; G. Dávila y P. Bustos, comunicación personal; C. Quinto, comunicación personal; este trabajo).

Por homología de secuencias, se infiere que las proteínas NodABC se encargan de la síntesis del esqueleto de oligoquitina *N*-acilado, NodS es el encargado de *N*-metilar el extremo no reductor y NodZ de fucosilar el extremo reductor de la molécula. Dado que la carbamilación de los factores de nodulación se lleva a cabo en el carbono 4, se cree que NodO se encarga de este paso y que NodU no es funcional. Sabemos que NodIJ están encargados de la secreción de los factores de nodulación (Vázquez et al. 1993; Cárdenas et al. 1996). La función de los genes *nolE* y *nolP* es desconocida (Davis y Johnston 1990). El gene *nolL* y la proteína para la cual codifica, son objeto de estudio en este trabajo.

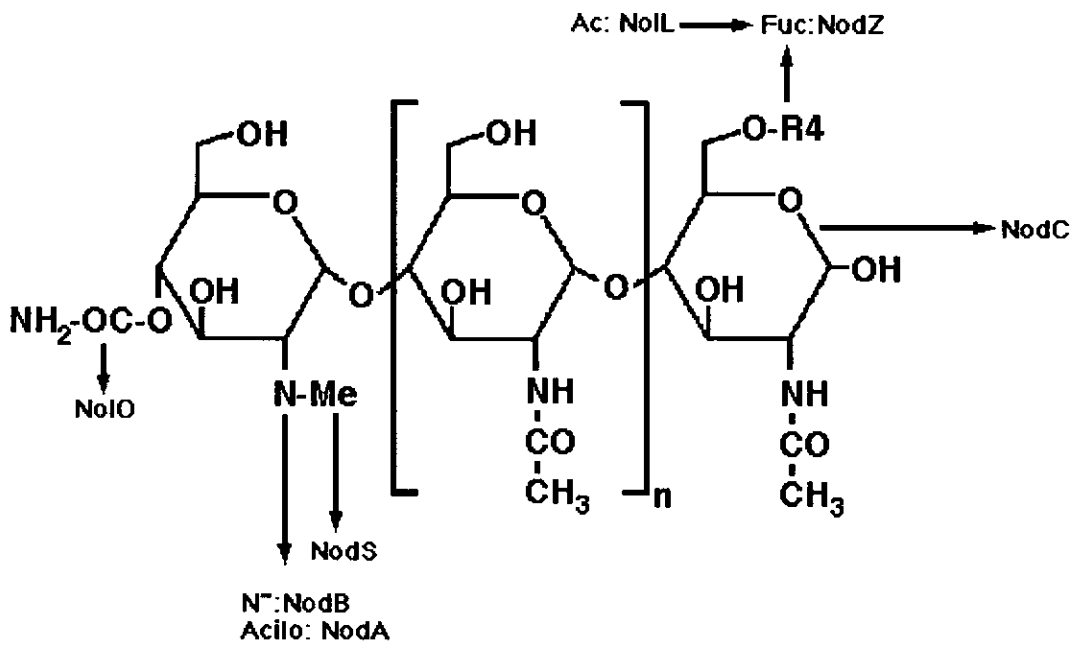


Fig.7. Estructura general de los factores de nodulación producidos por *Rhizobium etli* CE3 y las proteínas asociadas a su síntesis. Abreviaturas: Ac=acetil, Fuc=fucosil, Me=metil, N<sup>-</sup>=Grupo amino libre; n=3.

Este estudio se inició como un intento por caracterizar fenotípicamente a una cepa derivada de CE3 cuyo pSym se reorganizó (cepa CFNX250). El resultado del reorganización fue la generación de un pSym híbrido que lleva 170 Kb del pSym silvestre (la zona *nod-nif* conocida, bandas *BamHI* 82 a 27) cointegradas con *pa* (Corvera 1994).

El nuevo pSym, llamado pGM1, confiere a CFNX250 la capacidad de nodular y fijar nitrógeno en plantas de frijol, *Phaseolus vulgaris* L. Más aún, observamos que la cepa CFNX250 nodula al frijol cv. Negro Jamapa con la misma cinética que la cepa silvestre CE3, es decir, ambas cepas nodulan a la planta en el mismo tiempo y forman, en promedio, el mismo número de nódulos. Sin embargo, la cepa CFNX250 presenta una alteración en su perfil de producción de factores de nodulación, i. e. una cromatografía en capa fina de los compuestos producidos por CFNX250 (en respuesta a genisteína) muestra que la cepa sintetiza un menor número de factores de nodulación (al menos uno) que la cepa silvestre CE3 (Corvera 1994). Este dato nos pareció muy interesante por dos razones: En primer lugar porque pGM1 conserva todos los genes *nod*, que hasta entonces habían sido identificados en el pSym de CE3 y, en segundo lugar, porque alteraciones en el tipo y concentración de factores Nod producidos, frecuentemente disminuyen la capacidad competitiva de una cepa (revisado en Tripplet y Sadowsky 1992).

Así pues, nos trazamos el objetivo de rastrear la región, ausente en CFNX250, involucrada en la producción de los factores de nodulación silvestres de CE3. Una vez identificada esta región, analizamos cómo afectaba a los factores de nodulación, determinamos que involucraba un solo gene y asignamos a éste una posible función. Así mismo, observamos su influencia sobre el rango de huésped de la cepa e iniciamos estudios sobre su regulación y su distribución en la especie.

Los resultados de este trabajo se publicaron en el artículo: "The *nolL* gene from *Rhizobium etli* determines nodulation efficiency by mediating the acetylation of the fucosyl residue in the nodulation factor. Corvera, A., D. Promé, J.-C. Promé, E. Martínez-Romero y D. Romero. 1999. Mol. Plant-Microbe Interac. 12:236-246"

# The *nolL* Gene from *Rhizobium etli* Determines Nodulation Efficiency by Mediating the Acetylation of the Fucosyl Residue in the Nodulation Factor

Adriana Corvera,<sup>1</sup> Danielle Promé,<sup>2</sup> Jean-Claude Promé,<sup>2</sup> Esperanza Martínez-Romero,<sup>1</sup> and David Romero<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Biología Molecular de Plásmidos Bacterianos, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos, 62271, México; <sup>2</sup>Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale, Spectrometrie de Masse et Signaux Biologiques, Centre National de la Recherche Scientifique, 205 Route de Narbonne 31077, Toulouse Cedex, France

Accepted 3 December 1998.

The nodulation factors (Nod factors) of *Rhizobium etli* and *R. loti* carry a 4-O-acetyl-L-fucosyl group at the reducing end. It has been claimed, based on sequence analysis, that NodL from *R. loti* participates in the 4-O-acetylation of the fucosyl residue of the Nod factors, as an acetyl-transferase (D. B. Scott, C. A. Young, J. M. Collins-Emerson, E. A. Terzaghi, E. S. Rockman, P. A. Lewis, and C. E. Pankhurst. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9:187-197, 1996). Further support for this hypothesis was obtained by studying the production of Nod factors in an *R. etli nolL::Km* mutant. Chromatographic and mass spectrometry analysis of the Nod factors produced by this strain showed that they lack the acetyl-fucosyl substituent, having a fucosyl group instead. Acetyl-fucosylation was restored upon complementation with a wild-type *nolL* gene. These results indicate that the *nolL* gene determines 4-O-acetylation of the fucosyl residue in Nod factors. Analysis of the predicted NodL polypeptide suggests a transmembrane location and that it belongs to the family of integral membrane transacylases (J. M. Schlauch, A. A. Lee, M. J. Mahan, and J. J. Mekalanos. *J. Bacteriol.* 178:5904-5909, 1996). NodL from *R. loti* was also proposed to function as a transporter; our results show that NodL does not determine a differential secretion of Nod factors from the cell. We also performed plant assays that indicate that acetylation of the fucose conditions efficient nodulation by *R. etli* of some *Phaseolus vulgaris* cultivars, as well as of an alternate host (*Vigna umbellata*).

---

Symbiotic relationships between bacteria of the genera *Allo-rhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, and *Sinorhizobium* (collectively called Rhizobia) with leguminous plants are established in response to a chemical communication between the plant and the bacterium.

Corresponding author: David Romero; Telephone: (52 73) 17 58 67; Fax: (52 73) 17 55 81; E-mail: dromero@cifn.unam.mx

Nucleotide and/or amino acid sequence data are to be found at the GenBank data base as accession number AF047684.

Leguminous plants secrete, among other compounds, flavonoid and iso-flavonoid molecules that act as specific activators for the biosynthesis in the bacteria of specific signal compounds, the so-called nodulation factors (Nod factors) (Fisher and Long 1992; Spaink 1995; Dénarié et al. 1996). These Nod factors can also activate several plant genes and unravel a series of responses and cellular changes that determine the development of specialized structures called nodules (Relić et al. 1993, 1994; Mylona et al. 1995). Inside the nodule, the bacteria are able to change their metabolism to fix nitrogen (Sprent and Sprent 1990; Mylona et al. 1995).

Although many studies have been done on the genetic elements involved in the synthesis and secretion of rhizobial Nod factors, information is still lacking on several of these determinants (for recent reviews see Carlson et al. 1994; Schultze et al. 1994; Spaink 1995; Van Rhijn and Vanderleyden 1995; Dénarié et al. 1996; Pueppke 1996). New species and specific strains secrete different chitolipooligosaccharidic molecules as Nod factors. Common elements between them are the chemical nature of the core molecules and that they are always N-acetylated on the nonreducing end (even though the length of the core and the acyl chain is not the same for different Nod factors). All these molecules have several substituent groups localized mainly on the reducing and nonreducing end glucosamines. The exact function of these substituents is not yet clear, although it has been hypothesized that they might protect the molecule against plant chitinases (Stachelin et al. 1994) and/or confer specificity for binding to plant receptors (reviewed in Dénarié et al. 1994; Bladergroen and Spaink 1998).

*Rhizobium etli* CE3 synthesizes and secretes chitopentamers of N-acetyl-D-glucosamine that are N-substituted at the nonreducing end with *cis*-vaccenic or stearic acid and a methyl group; they may or may not be carbamoylated on C4. At the reducing end, these molecules are 4-O-acetyl-fucosylated on C6 (Cárdenas et al. 1995; Poupot et al. 1995).

An initial step in the understanding of the biosynthesis of Nod factor molecules is the characterization of specific genes and the construction of mutant strains to study their phenotypes. Here, we describe the identification and characterization of *nolL*, a gene involved in 4-O-acetylation of the fucosyl



residue of the nodulation factor of *Rhizobium etli*. We establish that the predicted polypeptide may be a transmembranal acetyl-transferase, part of a family of integral membrane trans-acylases (IMTs; Slauch et al. 1996). We also show that a mutation in this gene has a quantitative effect on the total nodule number that can be formed by the strain on different *Phaseolus vulgaris* cultivars and on *Vigna umbellata*.

## RESULTS

### Production of nodulation factors is altered in a strain carrying a large deletion on the pSym.

We studied the nodulation factors produced and secreted by some strains of *R. etli* in the presence of genistein as an inducer. Compounds labeled with <sup>14</sup>C-glucosamine were analyzed qualitatively by direct-phase thin-layer chromatography (TLC), as described in Materials and Methods. Wild-type strain CE3 and strain CFNX250, containing a deleted pSym (pGM1, Fig. 1; see also Table 1), have different Nod factor profiles (Fig. 2A, arrows); it can be seen (Fig. 2A) that a fast-migrating compound is no longer produced by strain CFNX250. In order to identify the genetic determinants necessary for wild-type production of nodulation factors, we made sequential complementation assays of strain CFNX250 with plasmids pDEL270, pDEL217, cGD45, and cGD7 (Fig. 1).

Plasmid pDEL270, but not plasmid pDEL217, was able to complement strain CFNX250 for wild-type Nod factor pro-

duction (Table 2), as evaluated on TLC plates (data not shown). Cosmid clones cGD45 and cGD7 contain the information present in pDEL270 but absent in pDEL217 (Fig. 1); thus, they were used to delimit the genetic region proficient for complementation. Only cGD7 was able to complement CFNX250 for the wild-type phenotype (Table 2; and data not shown). Further subcloning of the cGD7 cosmid clone with restriction enzyme *Bam*HI led us to the identification of a 3.8-kb fragment—band 81 from the pSym CE3 (Girard et al. 1991), cloned in plasmid pRK7813 (Jones and Guttererson 1987), giving rise to plasmid pACP1—that is able to restore wild-type production of Nod factors on strain CFNX250 (Figs. 1 and 2A).

### Altered production of nodulation factors in strain CFNX250 is only due to the absence of the *nolL* gene.

Sequence analysis of the complementing fragment revealed the presence of an open reading frame with a high similarity to the previously described *nolL* gene (see below). To ascertain the participation of this gene in Nod factor production, a Km-interposon was introduced at the unique *Nhe*I site of the *nolL* gene (at 456 bp from the stop codon and at 526 bp from the end of the subclone), thus generating plasmid pACP3. Introduction of the Km cassette might result in the production of a shortened polypeptide (240 amino acids [aa] long). Wild-type phenotype for Nod factor production can be restored in strain CFNX250 with pACP1 (strain CFNX287; Fig. 2A) but

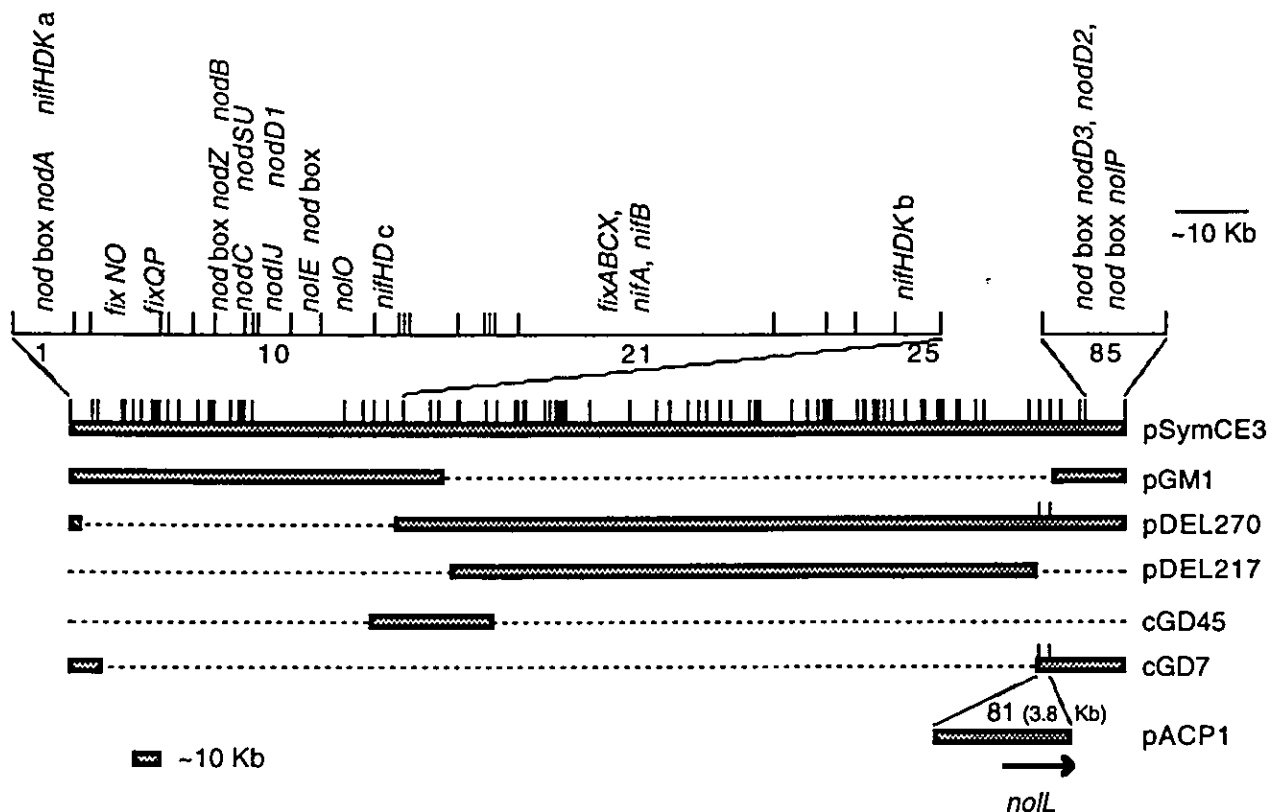


Fig. 1. Linear physical map of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CE3 (pSym CE3), showing *Bam*HI restriction sites (vertical lines; Girard et al. 1991). Enlarged zones show the approximate localization of the identified *nod* and *nol* genes and some of the *nif* and *fix* genes (numbers below the amplified maps indicate original number of some of the *Bam*HI bands; Girard et al. 1991, given only as reference). Stripped boxes below the map of pSym CE3 indicate conserved segments in pGM1, and in those plasmids used for complementation of strain CFNX250 for wild-type profile of nodulation factors. *Bam*HI sites indicated in the maps of pDEL270 and cGD7 indicate that these are the two clones that conserve band 81. Broken lines indicate sequences absent in the complementing clones. These maps were drawn after information compiled from Girard et al. (1991, 1996), Villalobos et al. (1994), and G. Dávila and P. Bustos, unpublished.

not in the presence of pACP3 (strain CFNX288; Fig. 2A). Further fragmentation of the 3.8-kb *Bam*HI band showed that a 2.8-kb *Eco*RI fragment (which, according to our prediction, results in a protein lacking only 44 aa) is not able to restore the wild-type production of Nod factors on strain CFNX250 (data not shown). These data demonstrate that the altered production of nodulation factors in CFNX250 is only due to the absence of the *nolL* gene in this strain.

To further verify the participation of *nolL* in Nod factor production in an otherwise wild-type background, the *nolL::Km* allele was introduced by homogenization onto a wild-type pSym. The fidelity of the desired marker exchange

was verified by Southern hybridization with *nolL*- and vector-specific probes (data not shown). The nodulation factors produced by this mutant strain (CFNX289) show the same pattern on TLC plates as those from strain CFNX250 (Fig. 2A). Wild-type phenotype can be restored when CFNX289 is complemented with pACP1, but not in the presence of pACP3 (not shown). Complementation assays with a 1.8-kb fragment of band 81 from the pSym CE3 (plasmid pACP5) that includes the whole *nolL* gene with its putative *nod*-box showed that it is able to complement both CFNX250 (strain CFNX296; Fig. 2A) and CFNX289 (strain CFNX295; Fig. 2A) for wild-type production of Nod factors.

Table 1. Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Reference
<i>Rhizobium etli</i>		
CFN42	Species type strain; carries six endogenous plasmids named a to f; pd is the symbiotic plasmid (pSym)	Quinto et al. 1982; Segovia et al. 1993
CE3	Sm <sup>r</sup> derivative of CFN42.	Noel et al. 1984
CFNX89	CE3 derivative cured of pSym	Brom et al. 1992
CFNX250	CE3 derivative, carrying a 220-kb deletion in the pSym (pGM1)	D. Romero, unpublished.
CFNX252	CFNX250/pDEL270	A. Eparvier and D. Romero, unpublished
CFNX254	CFNX250/pDEL217	A. Eparvier and D. Romero, unpublished
CFNX273	CFNX250/cGD7	A. Eparvier and D. Romero, unpublished
CFNX278	CFNX250/cGD45	A. Eparvier and D. Romero, unpublished
CFNX287	CFNX250 / pACP1	This study
CFNX288	CFNX250/ pACP3	This study
CFNX289	CE3 derivative, <i>nolL::Km</i>	This study
CFNX290	CFNX289 derivative carrying pACP1	This study
CFNX295	CFNX289 derivative carrying pACP5	This study
CFNX296	CFNX250 derivative carrying pACP5	This study
CFNX297	CE3 derivative carrying pACP6	This study
CFNX298	CE3 derivative carrying pBBMCS53	This study
CFNX299	CFNX89 derivative carrying pACP6	This study
CFN-1	Wild-type strain isolated from Guanajuato, México	Piñero et al. 1988
BRA-5	Wild-type strain isolated from Brazil	Piñero et al. 1988
TAL-182	Wild-type strain isolated from Hawaii, U.S.A.	Piñero et al. 1988
VIKING-1	Wild-type strain isolated from Belize	Piñero et al. 1988
NITRAGIN 8251	Wild-type strain isolated from U.S.A.	Piñero et al. 1988
CIAT-894	Wild-type strain isolated from Colombia	Piñero et al. 1988
CIAT-895	Wild-type strain isolated from Colombia	Piñero et al. 1988
KIM 5	Wild-type strain isolated from Kimberly, Idaho, U.S.A.	Josephson and Pepper 1984
127K81-3	Wild-type strain isolated from North Dakota, U.S.A.	Weaver et al. 1990
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	Host for recombinant plasmids, Nal <sup>r</sup>	Sambrook et al. 1989
BW21038	<i>pir</i> <sup>+</sup> host for Ori R6K plasmids, Cm <sup>r</sup>	Metcalf et al. 1996
HB101	Host for conjugation helper plasmid pRK2073	Sambrook et al. 1989
Plasmids		
pRK2073	Conjugation helper plasmid	Better and Helinski 1983
pRK7813	Tc <sup>r</sup> cloning vector	Jones and Gutterston 1987
pMOSBlueT	Cloning vector for polymerase chain reaction products	Amersham, Buckinghamshire, U.K.
pWM91	Ori R6K vector plasmid; carries the <i>sacRB</i> genes for positive selection	Metcalf et al. 1996
pBSL128	Vector plasmid carrying a Km-Ω element	Alexeyev et al. 1995
pBBR1MCS-5	Gm <sup>r</sup> cloning vector	Kovach et al. 1995
pWM5	Vector plasmid carrying a β-glucuronidase cassette	Metcalf and Wanner 1993
pBBMCS53	pBBR1MCS-5 derivative carrying the promoterless <i>gusA</i> gene from pWM5	L. Girard, unpublished
pACP1	<i>Bam</i> HI band 81 from the pSym CE3 subcloned in pRK7813	This study
pACP3	pACP1 with a Km cassette insertion (from pBSL128)	This study
pACP4	<i>Bam</i> HI band 81 from the pSym CE3 with the Km cassette subcloned in pWM91	This study
pACP5	1.8-kb fragment from band 81 from the pSym CE3 (including the <i>nolL</i> gene with its putative <i>nod</i> -box) subcloned in pRK7813	This study
pACP6	2.8-kb <i>Eco</i> RI fragment from band 81 from the pSym CE3, subcloned in pBBMCS53, forward direction	This study
cGD7	Cosmid vector 7 from the cosmid collection	Girard et al. 1991
cGD45	Cosmid vector 45 from the cosmid collection	Girard et al. 1991
pGM1	A pSym derivative containing 170 kb (the <i>nod-nif</i> region, bands 82–27), cointegrated into <i>pa. nifHa:: Km, Gm/Sp, Sm</i>	D. Romero, unpublished
pDEL270	A type I deleted pSym derivative retaining from band 25 to 85	Romero et al. 1995
pDEL217	A type IV deleted pSym derivative retaining from band 28 to 80	Romero et al. 1995

### Mass spectrometry analysis of the compounds produced by mutant strains.

To establish the chemical nature of the Nod factor component absent in strain CFNX250, strains CE3 and CFNX250 were grown in minimal medium in the presence of genistein. Butanol-extracted compounds from these cultures were purified by high-pressure liquid chromatography (HPLC) and then analyzed by liquid secondary ion mass spectrometry (LSIMS). Consistent with data from the literature (Cárdenas et al. 1995; Poupot et al. 1995), the spectrum of compounds produced by strain CE3 showed mainly two peaks at  $m/z$  1458.8 and 1501.9 (Fig. 3A). The former corresponds to a protonated pentamer of glucosamine, N-methylated and N-vaccenoylated on one end, N-acetylated on all other glucosamine residues and substituted by an acetylated fucosyl group. The latter bears an additional carbamoyl group. Examination of the fragmentation spectra (not shown) confirms that the carbamoyl group is at the nonreducing end, whereas the acetyl-fucosyl group is at the other end; we did not proceed further in a more precise localization of these substituents, since their localization has already been reported (Cárdenas et al. 1995; Poupot et al. 1995). The peak at  $m/z$  1416.7 is the nonacetylated, noncarbamoylated species. Its carbamoylated analog should be at  $m/z$  1459.8, that is, superimposed with the M+1 peak of the isotopic distribution of the main component. Finally, the peak at  $m/z$  1432.6 is an analog where the vaccenoyl group is replaced by a palmitoyl substituent, while the peak at  $m/z$  1480.8 is the sodium attachment to the main component.

In contrast, extracts from strain CFNX250 exhibited two main ions at  $m/z$  1416.8 and 1459.8 (Fig. 3B). These ions cor-

respond to the same M+H species as before but devoid of any *O*-acetyl group on the fucosyl moiety. These assignments were confirmed by an MS/MS experiment performed on each species, showing that the 42 U mass shift down, compared with the main peaks seen in Figure 3A, was located on the reducing end (spectra not shown). Some of the scarcely represented ions in both LSIMS spectra are sodium and potassium adducts and the palmitoyl analog. These results clearly show that CFNX250 is not able to synthesize Nod factors with a 4-*O*-acetyl substitution on the fucose. As we have already shown that the *nolL* gene is the only gene responsible for the altered production of Nod factors in strain CFNX250, it is clear that it is involved in acetylation.

Further evidence was obtained from an LSIMS analysis of strain CFNX289 (Fig. 3C). To avoid any elimination of Nod factors by a preliminary HPLC run, we made a spectrum from the crude extract, after forcing the formation of sodium ad-

Table 2. Plasmid content and Nod factor phenotype of wild-type CE3 and its derivatives

Strain	Relevant plasmid content	Nod factor bands seen on TLC plates <sup>a</sup>
CE3	pSymCE3	a + b
CFNX250	pGM1	b
CFNX252	pGM1+pDEL270	a + b
CFNX254	pGM1+pDEL217	b
CFNX278	pGM1+cGD45	b
CFNX273	pGM1+cGD7	a + b
CFNX287	pGM1+pACPI	a + b

<sup>a</sup> As defined in Figure 2. TLC = thin-layer chromatography.

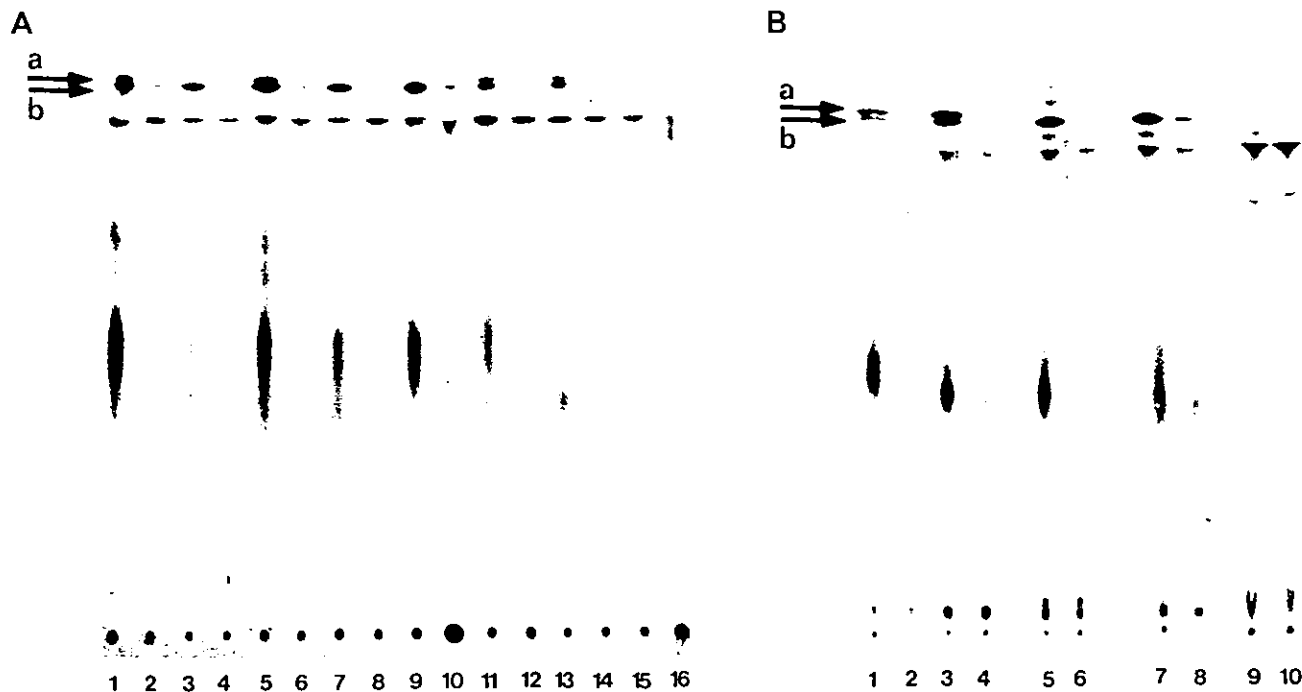


Fig. 2. Thin-layer chromatography (TLC) plates of nodulation factors (A and B, lanes 1, 2) secreted and (B) cell-extracted from CE3 and its derivatives. A, Lanes 1 and 2, strain CE3; lanes 3 and 4, CFNX250; lanes 5 and 6, CFNX287; lanes 7 and 8, CFNX288; lanes 9 and 10, CFNX289; lanes 11 and 12, CFNX295; lanes 13 and 14, CFNX296; lanes 15 and 16, CFNX89. B, Lanes 1 and 2, CE3 (secreted); lanes 3 and 4, CE3; lanes 5 and 6, CFNX289; lanes 7 and 8, CFNX250; lanes 9 and 10, CFNX89. Odd lane numbers: Compounds from cultures induced with genistein. Even lane numbers: compounds from uninduced cultures. Arrows indicate most abundant Nod factors produced by strain CE3: "a" produced by *nolL*<sup>+</sup> strains; "b" produced by both *nolL*<sup>+</sup> and *nolL*<sup>-</sup> strains.

ducts, thus inducing a 22 U mass shift, compared with the protonated species. This was necessary as the presence of several inorganic salts in the crude extract induced the formation of a wide variety of cation-adducted molecules. Similar to the spectrum from CFNX250's compounds, two major peaks at  $m/z$  1438.6 and 1481.5 were seen for the Nod factors produced by strain CFNX289 (Fig. 3C). These ions are the sodium adducts of the same species seen in Figure 3B. Other peaks corre-

sponded to the potassium adducts. Thus, the *nodL* gene is involved in acetylation of the fucosyl moiety of the Nod factors.

**Sequence analysis of the *nodL* gene.**

We sequenced 2 kb of the *Bam*HI band 81 (GenBank accession number AF047684) from the pSym CE3. Computer analysis of this sequence revealed an open reading frame of 1,176 bp, coding for a polypeptide of 392 aa. A BLAST search (Altschul

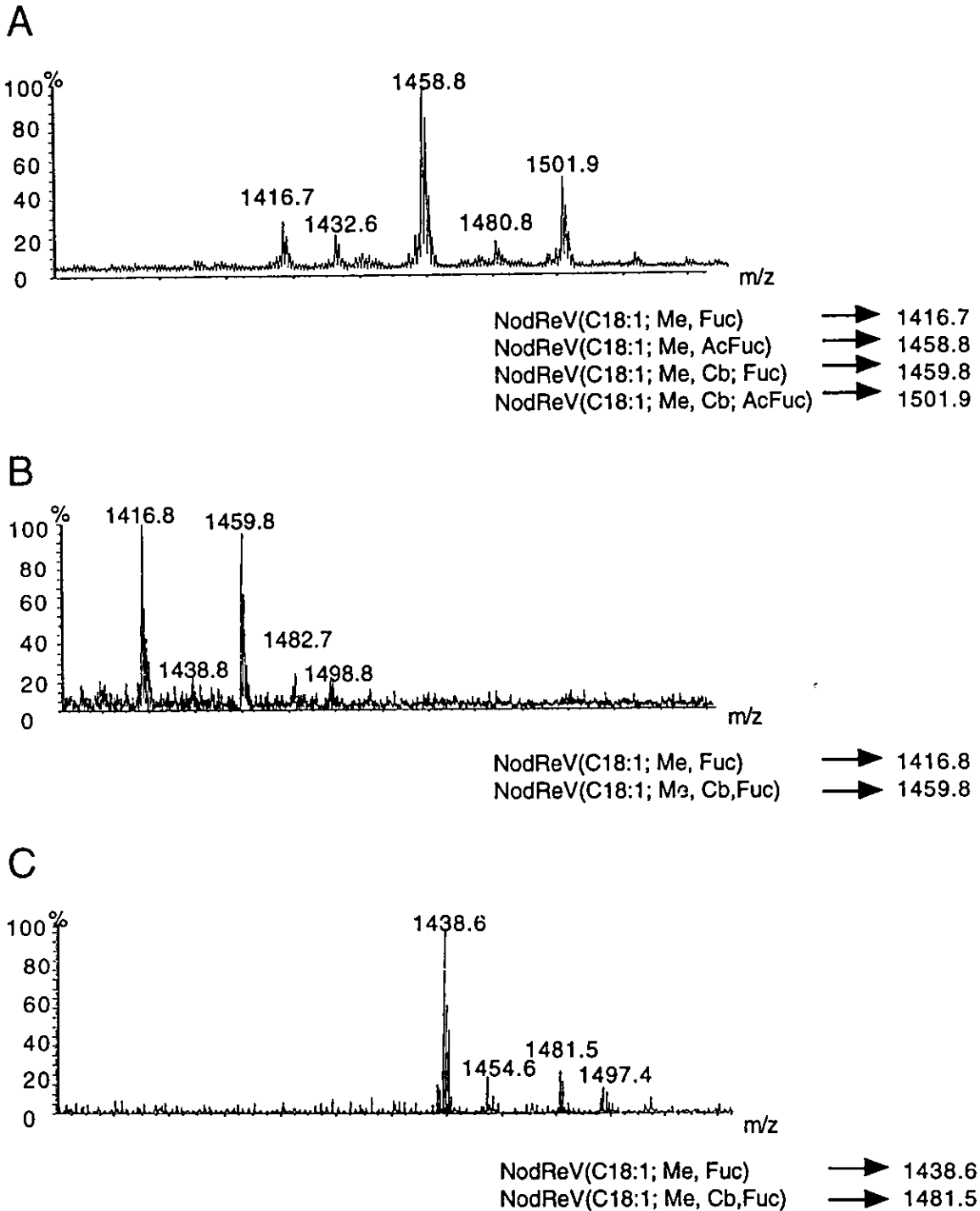


Fig. 3. Liquid secondary ion mass spectrometry (LSIMS) analysis and chemical structure of the main compounds produced, upon genistein induction, by strains (A) CE3, (B) CFNX250 (both in an acidified matrix), and (C) CFNX289 (after addition of sodium iodide). Minor peaks are described in text.

et al. 1990, 1997) showed that the *nolL* gene of *R. etli* has a high similarity with the *nolL* genes from *Rhizobium loti* (Scott et al. 1996) and *Rhizobium* sp. strain NGR234 (Freiberg et al. 1997). Both species also carry acetyl-fucose substituents on their Nod factors. At the protein level, the predicted NoIL protein from *R. etli* is 48.7% identical and 76.3% similar to its counterpart in *R. loti*, and 48% identical and 74.2% similar to its homolog in *Rhizobium* sp. strain NGR234. Weaker similarities were also observed with two acetyl-transferases: the Oac (also called GumF; accession numbers X78451 and U22511), and the GumG (accession number U22511) proteins from *Xanthomonas campestris*, and with a hypothetical protein from *Bacillus subtilis* (accession number Z99111).

We also used the Position-Specific Iterated-BLAST (PSI-BLAST) program, which constructs a position-specific score-matrix based on original alignments generated by BLAST; this matrix is then used for new searches, and is more sensitive to detect weak relationships that are often of great biological relevance (Altschul et al. 1997). Our results show that the NoIL protein has also significant sequence similarities (along the whole protein) with several acetyl- and acyl-transferases of the family of IMTs (Slauch et al. 1996). Among these are the Oac protein from *Shigella* phage SF6, the Lag1 protein from *Legionella pneumophila*, the NodX protein from *R. leguminosarum* bv. *viciae*, the Mpt protein of *Streptomyces thermotolerans*, the MdmB protein from *S. mycarofaciens*, and some hypothetical proteins from *Caenorhabditis elegans*. Some similarity is also seen with the ExoH protein from *Rhizobium meliloti* (a succinyl-transferase) and with several other transmembranal proteins with a variety of functions.

An alignment between the NoIL proteins and some proteins of the family of IMTs shows that they all share the first one of the two regions of homology previously detected among the members of the family; this region is the only one that was reported as conserved in the GumF protein (Slauch et al. 1996; Fig. 4). These structural similarities establish that the NoIL proteins are members of the family of IMTs.

#### The NoIL protein may be transmembranal.

An interesting feature of the NoIL protein from *R. etli* is that it has nine potential transmembranal  $\alpha$ -helices (predicted by the TMpred program, among others; Hofmann and Stoffel

1993; Fig. 5). It lacks an apparent leader peptide, thus it would be located in the inner membrane of the cell (as predicted by the PSORT program; Nakai and Kanehisa 1991). These characteristics are shared by the NoIL proteins from both *R. loti* and *Rhizobium* sp. strain NGR234 (data not shown), thus confirming that NoIL should be included within the proteins of the family of IMTs.

The high hydrophobicity of the NoIL proteins and their putative transmembranal location have led to speculations that the NoIL protein might be a transporter; thus, they were annotated initially as possible transport proteins (accession number 2498660 for *R. loti*, accession number 2498661 for *Rhizobium* sp. strain NGR234). To rule out this possibility, we extracted the nodulation factors accumulated inside the cell and visualized them on TLC plates (Fig. 2B). Results show that the nodulation factors synthesized and accumulated inside the cell (Fig. 2B) are the same kind of Nod factors that are secreted from the cell (Fig. 2B). These data demonstrate that mutant strains are not synthesizing acetylated compounds.

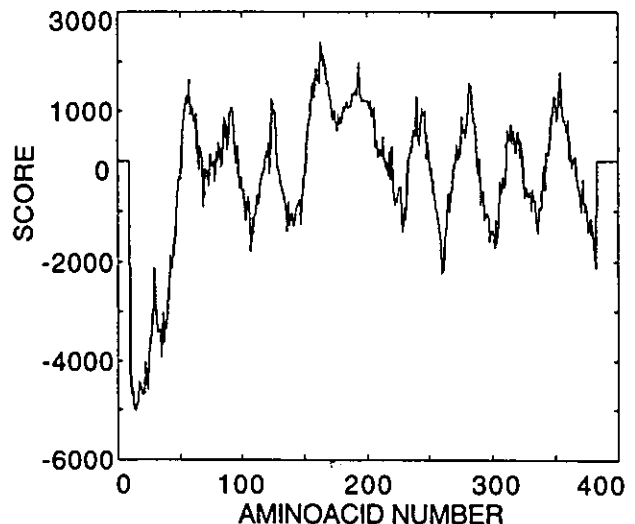


Fig. 5. Hydropathy profile of the predicted NoIL protein from *Rhizobium etli* CE3 (according to the TMpred program; prediction was done with a window of 21 to 33 amino acids per helix).

ExoZ	IGAAGVDVFFVISGFIMW	.....VISDRRSVTPVE	FIADRARRIVPVY
OafA	GGFIGVDVFFVISGFLMT	GIVLERVDHKGVLD.....	FYIARFLRIVPAL
NodX	FSAPGVAIFFLISGFLVT	.....DSYIRSSSAAS	FFVKRSLRIFPAL
Oac.SF6	AGGIAVIFFSISGYLIS	.....KSAIRSDSFID	FMAKRARRIFPAL
Lag1	FQSLAVNAFFWLSGFLIT	.....YHCITKKPY...TFAE	YMIDRFCRIYVIY
NoIL-NGR	IYMFHMPLFMAISGYLAS	.....GTILRTSFCR	AVGDRAVQLLIPM
NoIL-loti	IYMFHMPLFMAISGYLSS	.....GAILRKSFTQ	GVGERAMQLLLPM
NoIL-etli	IYMFHMPLFMAISGYLSR	.....SGLLGKSFQR	AIGDRALQLLVPT
GumF	AYSFHVPLFFLVSGWLAA	.....GYASRTTSL	QTITKQARGLLLP
GumG	AYSFHVPLFFVLVSGWVGE	.....RFGRRAFGR	KTVGKLARTLLIP
Consensus	-YMFHVPLFF- <u>ISG</u> -L--	-----	F-GDRALRILP--
Cons.FIMT	ngflgVdiFFvLSGfLma	-----	Fy-rRf-RIyP1-

Fig. 4. Consensus sequences between some members of the family of integral membrane trans-acylases (FIMT) and the NoIL proteins. Alignment was done with the PILEUP program and subsequent manual adjustment. Consensus both for the alignment and for the first conserved motif previously defined for the FIMT (Slauch et al. 1996) are shown (capital letters represent those amino acids conserved in both consensus sequences).

Our data show that the *NolL* protein does not determine a differential secretion from inside the cell, thus ruling out a possible role as a discriminating transporter between acetylated and nonacetylated molecules.

#### The *nolL* gene is not induced by genistein.

The *nolL* gene is transcribed clockwise with respect to the reported physical map of the pSym CE3 (Girard et al. 1991; and data not shown). We found a potential *nod*-box 489 bp upstream of the initial predicted methionine (not shown). The identified *nod*-box sequence presents the 3-bp inverted repeats that are part of the T-N<sub>11</sub>-A LysR type motif, which occurs twice in the sequence. These two motifs represent those sites where the NodD dimer may bind. The *nod*-box shows 10 mismatches when compared with the consensus sequence reported by Van Rhijn and Vanderleyden (1995). Sequence conservation suggests that the gene may be regulated by the NodD-flavonoid regulatory circuit. This observation could be in accordance with a previous report of strong transcriptional activity detected on band 81 upon induction with genistein (Girard et al. 1996). To test if *nolL* is responsive to genistein induction, we made a transcriptional fusion with the promoter region of the *nolL* gene and a promoterless *gusA* gene. The resulting plasmid (pACP6) was introduced in wild-type CE3. *Gus* expression assays were performed, as described in Materials and Methods, on strains grown in minimal medium in the presence and in the absence of genistein. We found that expression of the *gusA* gene is the same in both induced and uninduced cultures (data not shown). Thus, the expression of the *nolL* gene is independent of genistein induction.

#### Acetylation on the fucose is a determinant for an efficient nodulation.

Nodulation kinetics assays were performed on plants of common bean (*Phaseolus vulgaris*) cvs. Negro Jamapa, Canario 101, and L3-111-CM and on two alternative hosts for *R. etli* (Hernández-Lucas et al. 1995): rice bean (*Vigna umbellata*) and cowpea (*Vigna unguiculata*). A Student's *t* test statistical analysis ( $P = 0.01$ ; data not shown) shows that the mutant strain, CFNX289, forms a significantly lower number of nodules on *P. vulgaris* cv. L3-111-CM and on *V. umbellata* plants than the wild-type strain (Fig. 6B and C). In contrast, total nodule formation was unaltered on plants of *P. vulgaris* cvs. Negro Jamapa (Fig. 6A) or Canario 101, or on plants of *V. unguiculata* (data not shown).

Our data indicate that acetylation of the fucosyl residue is important for an efficient nodulation of some plant cultivars and of some species.

#### The *nolL* gene is also conserved in other strains of *R. etli*.

The *nolL* gene of *R. etli* CE3 may be widely distributed among the nodulating strains of the species. High-stringency hybridization analysis showed that it is present in the nine strains tested: CFN-1, NITRAGIN-8251, BRA-5, KIM 5, TAL-182, CIAT-894, CIAT-895, 127K81-3, and VIKING-1 (data not shown).

## DISCUSSION

We show here that the *nolL* gene from *R. etli* is clearly involved in the 4-O-acetylation step of the fucosyl residue of the

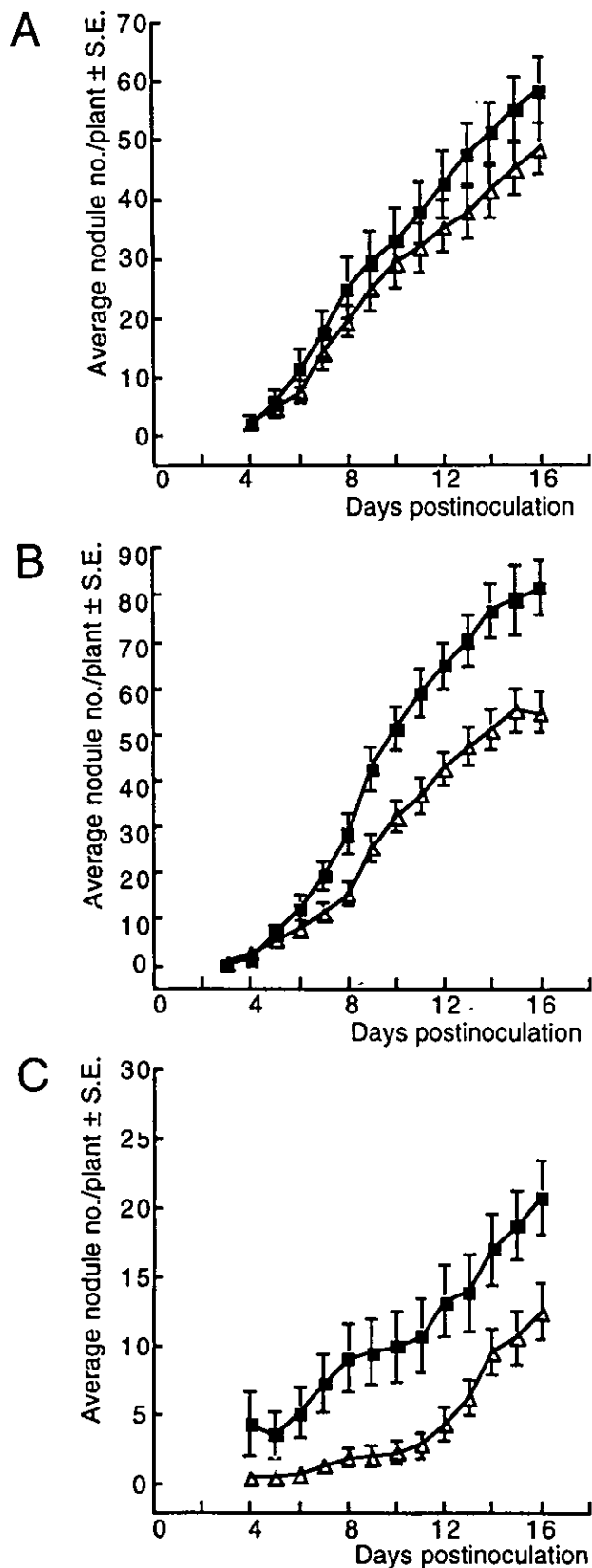


Fig. 6. Nodulation kinetics of strains CE3 (filled squares) and CFNX289 (empty triangles), on plants of (A) *Phaseolus vulgaris* cv. Negro Jamapa, (B) *Phaseolus vulgaris* cv. L3-111-CM, and (C) *Vigna umbellata*.

nodulation factors in *R. etli* CE3. This conclusion is based on TLC analysis of the Nod factors produced by different strains, as well as by direct structural determination by mass spectrometry. To analyze these results, it should be kept in mind that TLC plate assay results were only evaluated qualitatively and not quantitatively. Occasional quantitative differences that can be seen on TLC plates among the compounds produced by the whole set of strains may be due to the fact that they have different plasmid copy numbers (i.e., pSym CE3 has a different copy number than pGM1, and they both have different copy numbers than pRK7813; data not shown), thus having different *nod* and *nol* gene copy numbers. Also, the concentration of Nod factors may vary between the strains depending on the bacterial capacity of synthesizing or not the whole set of Nod factors, in comparison to the wild-type strain. Some precursors may accumulate in those strains that are not able to produce the whole Nod factor mixture. Thus, when talking about phenotypes on TLC plates and/or Nod factor production, we refer to equal number of bands in TLC profiles, and not to equal concentration of the compounds produced. Despite these variations, the chemical composition of the Nod factors produced by the mutant strain, which lack the acetyl-substituent on the fucose, strongly suggests that NoIL may be an acetyl-transferase, as has been proposed for the NoIL protein of *R. loti* (Scott et al. 1996). This hypothesis is reinforced by the similarity between the three different NoIL proteins reported and the members of the family of IMTs (Slauch et al. 1996).

As new members of the family of IMTs, the NoIL proteins from *R. etli*, *R. loti*, and *Rhizobium* sp. strain NGR234 have a hydrophobic nature that makes them perfect candidates for being transmembranal.

A common misconception is that integral membrane proteins usually lack enzymatic activity; most of them are thought to be structural proteins or transporters. However, our data show that the NoIL protein is not a differential transporter of nodulation factors, but that it is playing an important role in acetylation. Besides the examples of acetyl- or acyl-transferases that belong to the same family as NoIL, further examples exist of synthases and synthetases, such as CDP-diglyceride synthases (see for example Shen et al. 1996), that are in the cytoplasmic membrane and catalyze the synthesis of some compounds, and of a eukaryotic transmembranal acetyl-transferase in the lysosomes of human cells (Meikle et al. 1995).

The presence of a putative *nod*-box upstream of the *nolL* gene from *R. etli* suggested that the gene might be regulated by the NodD protein. The *nolL* gene from *Rhizobium* sp. strain NGR234 also has a putative *nod*-box associated with it (277 bp upstream of the predicted open reading frame; Freiberg et al. 1997), while this is not the case for the gene of *R. loti* (Scott et al. 1996). GusA fusion assays demonstrated that the expression of the *nolL* gene of *R. etli* CE3 is independent of the induction by genistein.

The phenotypical characteristics of the *nolL* strain demonstrate that the acetylation on the fucose is a determinant for an efficient nodulation of *P. vulgaris* cv. L3-111-CM and of *V. umbellata*. Our data are in agreement with previous results obtained with *nolL* strains from *R. loti*, in which the nodulation of *Lotus pedunculatus* plants was delayed and nodulation of *Leucaena leucocephala* was abolished (Scott et al. 1996),

demonstrating that acetylation of the fucosyl residue is an important determinant for nodulation efficiency and host range. These data indicate that a nodulation gene may act in different ways, with quantitative effects on nodulation or modulating host range, under Pueppke's (1996) classification of nodulation genes, perhaps in response to unknown stimuli.

Quinto and collaborators (1997) showed, based on in vitro experiments, that NodZ is able to transfer a fucosyl residue (that is not acetylated) to the core oligosaccharide of the nodulation factor. Our in vivo data confirm that acetylation is not necessary for the addition of the fucose to the reducing glucosamine. The precise mechanism of Nod factor synthesis and its cellular localization is still unknown. It has been proposed that an anchor molecule, probably undecaprenol pyrophosphate, may be functioning during the biosynthesis of nodulation factors (Carlson et al. 1994). This carrier molecule would keep the growing molecule near the site where NodC is attached to the inner membrane, where a sequential addition of sugars would take place. Cytoplasmic proteins such as NodAB could easily access the nonreducing end of the Nod factor to act on it. This would not be so easy in the case of those cytoplasmic proteins such as NodZ, which act on the reducing end of the molecule. Nevertheless, growth of a polysaccharide can occur at the reducing terminus by joining two undecaprenol-linked molecules (reviewed in Whitfield and Valvano 1993). Examples of acetylation as a postpolymerization modification have also been described during the synthesis of *O*-polysaccharides of *Salmonella enterica*, *Xanthomonas campestris* (reviewed in Whitfield and Valvano 1993), and *Neisseria meningitidis* (Vann et al. 1978), among others.

In conclusion, our data clearly show that NoIL is involved in acetylation of the nodulation factor, and that it is functioning most probably as an acetyl-transferase. Further support for this proposal will be obtained through the purification and biochemical characterization of the NoIL protein.

## MATERIALS AND METHODS

### Bacterial strains and growth conditions.

Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *Rhizobium* strains were grown in PY rich medium (Noel et al. 1984) at 30°C. *Escherichia coli* strains were grown at 37°C in LB medium (Sambrook et al. 1989). When required, antibiotics were added to the medium at the following concentrations: nalidixic acid (Nal): 20 µg ml<sup>-1</sup>, for both *Rhizobium* strains and *E. coli*; tetracycline (Tc): 10 µg ml<sup>-1</sup> for *E. coli* and 2 to 5 µg ml<sup>-1</sup> for *Rhizobium* strains; kanamycin (Km): 15 to 30 µg ml<sup>-1</sup> for both *Rhizobium* and *E. coli*; gentamycin (Gm): 15 µg ml<sup>-1</sup>. For homogenization experiments, sucrose was employed at a concentration of 12.5% (Gay et al. 1985).

### Complementation assays.

All genetic manipulations were carried out by standard procedures. *R. etli* CFNX250 was complemented (for wild-type production of nodulation factors) with several fragments from the symbiotic plasmid from wild-type strain CE3. Sequential complementation assays were performed by introducing smaller fragments each time. DNA fragments were introduced by standard conjugation techniques, with plasmid pRK2073 as a helper plasmid, when needed. Complementation for wild-

type production of nodulation factors was detected by TLC analysis (see below).

#### Extraction of nodulation factors for TLC and MS analysis.

Cultures grown for 24 h on PY plates were used to inoculate minimal medium (Girard et al. 1996). Cultures were inoculated at an initial OD<sub>600</sub> of 0.1 and grown with shaking (200 rpm; Incubator Shaker G26, New Brunswick Scientific, Edison, NJ) for 15 h at 30°C in the presence of 1.2 μM genistein.

Cultures (1 ml) with 0.2 μCi of D-[1-<sup>14</sup>C]glucosamine hydrochloride (added to the culture 3 h after genistein induction) were used for TLC analysis. Secreted nodulation factors were extracted from the supernatants as described previously (Mendoza et al. 1995). Nodulation factors accumulated in membranes were also extracted from culture pellets (modified from Orgambide et al. 1995), after washing with 50 μl of sterile water, with a mixture of chloroform/1-propanol/methanol/water (1:2:2:3, vol/vol). Extraction matrix-culture pellet mixtures were kept in agitation (100 rpm; Environ-shaker 3597, Lab-Line Instruments, Melrose Park, IL) for 6 h at 37°C; cultures were then centrifuged, and the supernatants were collected and vacuum dried (at a high drying rate in a SpeedVac SVC100; Savant, Farmingdale, NY) for 50 min. Extracted material was taken up in 40 μl of methanol and analyzed by TLC. Control cultures were treated similarly but without genistein induction.

Cultures (1 liter) were centrifuged and the supernatant was extracted with 900 ml of butanol. The butanol extract was vacuum evaporated to dryness at a temperature of 60 to 70°C. The residue was dissolved in 20 ml of water, and vacuum dried once again (at a high drying rate in a SpeedVac SVC100; Savant). MS analysis was used to determine chemical composition of samples.

#### Structural analysis of the nodulation factors.

Extracts from strains CE3 and CFNX250 were solubilized in water and injected on a C-18 reversed phase HPLC column (Spherisorb, ODS1, 5 μm, 250 × 4.6 mm) with the H<sub>2</sub>O:acetonitrile gradient already described (Poupot et al. 1995). The HPLC trace was visualized by UV absorption at 206 nm. A wide fraction eluting after the genistein peak was collected, evaporated, and analyzed by LSIMS. For strain CFNX289, the HPLC step was omitted and the crude butanol extract was analyzed by MS directly.

Mass spectra were recorded on an AutoSpec instrument (Micromass, Manchester, UK) fitted with a cesium gun. The matrix was a mixture of metanitrobenzyl alcohol/glycerol (1:1, vol/vol) spiked either with trichloroacetic acid (for CE3 and CFNX250 samples) or with sodium iodide (CFNX289 sample).

#### Genetic manipulations.

The pACP1 plasmid is a derivative of plasmid pRK7813 (Jones and Gutterson 1987) carrying the 3.8-kb *Bam*HI band 81 from the pSym CE3 (Girard et al. 1991), containing the *nolL* gene. The *nolL* gene was mutagenized by introducing a 1,454-bp *Nhe*I fragment from the Ω-Km element from pBSL128 (Alexeyev et al. 1995) in the unique *Nhe*I site within the *nolL* gene in pACP1, generating pACP3. Plasmid pACP3 was digested with *Bam*HI restriction enzyme and the

*nolL::Km* fragment was subcloned in plasmid pWM91 (Metcalf et al. 1996) to construct plasmid pACP4. Since this plasmid requires the Pir protein for replication, pACP4 was maintained in strain BW21038.

Conjugative transfer of pACP4 to strain CE3 and selection for sucrose and Km-resistant derivatives resulted in double recombination of the *nolL* gene and the Km cassette, thus generating strain CFNX289. Southern blot hybridization analysis, with both band 81 and pWM91 as probes, confirmed the presence of the Km cassette.

A 1,911-bp product of a polymerase chain reaction over pACP1, with universal primer reverse and a specific primer called BOX1 (5'-GCGGCCAAAGCTTCGTGTATC-3'), was cloned in plasmid pMOS with the pMOSBlueT kit (Amersham, Buckinghamshire, U.K.); the 1,872-bp *Bam*HI fragment containing the *nolL* gene was then subcloned in pRK7813 (Jones and Gutterson 1987), giving rise to plasmid pACP5.

Plasmid pACP6 is a derivative of the promoter-probe plasmid pBBMCS53 (L. Girard, unpublished), carrying a 2.8-kb *Eco*RI fragment from band 81 from the pSym CE3.

#### Hybridization assays.

Total DNA was extracted from different strains of *R. etli* with a DNA/RNA extraction kit (Amersham), following the manufacturer's instructions. Total DNA was digested with the restriction enzyme *Bam*HI, electrophoresed in 1% (wt/vol) agarose gels, and transferred to nylon membranes (Hybond N<sup>+</sup>; Amersham) by the standard Southern blot method (Ausubel et al. 1989). Hybridization was performed under high stringency conditions with rapid-hybridization buffer (Amersham) and Redi-prime (random primer labeling; Amersham).

#### Sequencing analysis.

Sequencing analysis was done with DNA from plasmid pACP1. Universal primers (reverse: 5'-GGAAACAGCTATG ACCATGATTACGCC-3' and -21: 5'-TGAAAACGACG GCCAGT-3') were used for initial sequencing stages. Whole sequence from the *nolL* gene was achieved by primer walking, with custom-made oligonucleotides (Biosynthesis, Lewisville, TX, and Laboratorio de Síntesis de Macromoléculas, Instituto de Biotecnología, UNAM). Sequencing was done on both coding and noncoding strands with a thermo sequenase cycle sequencing kit (Amersham). Oligonucleotides were labeled by kinasing with [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP, following the manufacturer's instructions.

#### GUS fusion assays.

Strains carrying either pBBMCS53 or pACP6 were cultured under the same conditions as those used for extraction of nodulation factors. Parallel cultures were grown in the presence and absence of genistein, one sample tube for each one of the conditions and times tested. After 1, 4, 8, 15, and 24 h of incubation, 1.5 ml of culture was centrifuged and resuspended in a salts wash solution (MgSO<sub>4</sub> 0.01%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.022%) supplemented with chloramphenicol (100 μg/ml). Resuspended cultures were kept at -70°C. Quantitative GUS (β-glucuronidase) assays were performed with *p*-nitrophenyl glucuronide as substrate as previously described (Wilson et al. 1992), but GUS assay buffer was prepared with 50 mM KPO<sub>4</sub>, pH 7.0 buffer instead of 50 mM NaPO<sub>4</sub>, pH 7.0 buffer.



Data were normalized to total cell protein concentration by the Lowry method (Ausubel et al. 1996) over a second set of 1.5-ml samples.

### Plant assays.

Surface-sterilized seeds from *P. vulgaris* (common bean) cvs. Negro Jamapa, L3-111-CM, and Canario 101, and from *V. umbellata* (rice bean) and *V. unguiculata* (cowpea) were germinated on H<sub>2</sub>O-0.8% agar plates for 2 to 3 days. Seedlings were then transplanted to 250-ml Erlenmeyer flasks containing N-free Fahraeus (1957) solution-0.8% agar, and inoculated with  $1 \times 10^7$  cells ml<sup>-1</sup> of the corresponding strain. Plants were kept in a culture chamber, under a 12-h light/dark period. Roots were covered with black plastic pouches to protect them from light. Nodulation kinetics were recorded as the accumulated number of nodules formed through time. Control plants were inoculated with sterile water.

### ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Susana Brom for critical reviewing of the manuscript; to Patricia Bustos and Guillermo Dávila for helping with initial stages of sequencing and providing unpublished sequence data; to Marco A. Rogel and Paul Gaytán, for their help in extraction of nodulation factors; to Lourdes Girard for giving us plasmid pBBMCS53; and to Javier Rivera for helping with some of the plant assays. We acknowledge J. J. Peña-Cabriales, S. Pueppke, and PRONASE (México) for providing seeds. Partial financial support for this research was provided by PAPIIT-UNAM (grant IN201595) and PADEP-UNAM (grants 030389 and 030329). A. C. was a recipient of scholarships from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología and DGAPA-UNAM (México).

### LITERATURE CITED

- Alexeyev, M. F., Shokolenko, I. N., and Croughan, T. P. 1995. Improved antibiotic-resistance cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene* 160:63-67.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. L. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K., eds. 1989. *Short Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K., eds. 1996. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York.
- Better, M., and Helinski, D. P. 1983. Isolation and characterization of a *recA* gene of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 115:311-316.
- Bladergroen, M. R., and Spaink, H. P. 1998. Genes and signal molecules involved in the rhizobia-Leguminosae symbiosis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1:353-359.
- Brom, S., García de los Santos, A., Stepkowsky, T., Flores, M., Dávila, G., Romero, D., and Palacios, R. 1992. Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli are required for optimal symbiotic performance. *J. Bacteriol.* 174:5183-5189.
- Cárdenas, L., Domínguez, J., Quinto, C., López-Lara, I. M., Lugtenberg, B. J. J., Spaink, H. P., Rademaker, G. J., Haverkamp, J., and Thomas-Oates, J. E. 1995. Isolation, chemical structures and biological activity of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium etli*. *Plant Mol. Biol.* 29:453-464.
- Carlson, R. W., Price, N. P. J., and Stacey, G. 1994. The biosynthesis of rhizobial lipo-oligosaccharide nodulation signal molecules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7:684-695.
- Dénarié, J., Debelle, F., and Promé, J.-C. 1996. *Rhizobium* lipo-chitoooligosaccharide nodulation factors: Signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 65:503-535.
- Dénarié, J., Truchet, G., and Promé, J.-C. 1994. *Rhizobium* nodulation factors: Synthesis and induction of plant responses. Pages 81-90 in: *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. Vol. 3. M. J. Daniels, J. A. Downie, and A. E. Osbourn, eds. Kluwer Academic Pub., Dordrecht, The Netherlands.
- Fahraeus, G. 1957. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J. Gen. Microbiol.* 16:374-381.
- Fisher, R. F., and Long, S. R. 1992. *Rhizobium*-plant signal exchange. *Nature* 357:655-659.
- Freiberg, C., Fellay, R., Bairoch, A., Broughton, W. J., Rosenthal, A., and Perret, X. 1997. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature* 387:394-401.
- Gay, P., Le Coq, D., Steinmetz, M., Berkelman, T., and Kado, C. I. 1985. Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 164:918-921.
- Girard, M. L., Flores, M., Brom, S., Romero, D., Palacios, R., and Dávila, G. 1991. Structural complexity of the symbiotic plasmid of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli. *J. Bacteriol.* 173:2411-2419.
- Girard, L., Valderrama, B., Palacios, R., Romero, D., and Dávila, G. 1996. Transcriptional activity of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* is affected by different environmental conditions. *Microbiology* 142:2847-2856.
- Hernández-Lucas, I., Segovia, L., Martínez-Romero, E., and Pueppke, S. 1995. Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2775-2779.
- Hofmann, K., and Stoffel, W. 1993. TMbase-A database of membrane spanning protein segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 347:166.
- Jones, J. D. G., and Gutterston, N. 1987. An efficient mobilizable cosmid vector, pRK7181, and its use in a rapid method for marker exchange in *Pseudomonas fluorescens* strain HV37a. *Gene* 61:299-306.
- Josephson, K. L., and Pepper, I. L. 1984. Competitiveness and effectiveness of strains of *Rhizobium phaseoli* isolated from the Sonoran desert. *Soil Biol. Biochem.* 16:651-655.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., II, and Peterson, K. M. 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166:175-176.
- Meikle, P. J., Whittle, A. M., and Hopwood, J. J. 1995. Human acetyl-coenzyme A:  $\alpha$ -Glucosaminide *N*-acetyltransferase. Kinetic characterization and mechanistic interpretation. *Biochem. J.* 308: 327-333.
- Mendoza, A., Leija, A., Martínez-Romero, E., Hernández, G., and Mora, J. 1995. The enhancement of ammonium assimilation in *Rhizobium etli* prevents nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8:584-592.
- Metcalf, W. W., Jiang, W., Daniels, L. L., Kim, S.-K., Haldimann, A., and Wanner, B. L. 1996. Conditionally replicative and conjugative plasmids carrying *lacZ $\alpha$*  for cloning, mutagenesis, and allele replacement in bacteria. *Plasmid* 35:1-13.
- Metcalf, W. W., and Wanner, B. L. 1993. Construction of new  $\beta$ -glucuronidase cassettes for making transcriptional fusions and their use with new methods for allele replacement. *Gene* 129:17-25.
- Mylona, P., Pawlowski, K., and Bisseling, T. 1995. Symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell* 7:869-885.
- Nakai, K., and Kanchisa, M. 1991. Expert system for predicting protein localization sites in gram-negative bacteria. *Proteins* 11:95-110.
- Noel, K. D., Sánchez, A., Fernández, L., Leemans, J., and Cevallos, M. A. 1984. *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. *J. Bacteriol.* 158:148-155.
- Orgambide, G. G., Lee, J., Hollingsworth, R. I., and Dazzo, F. B. 1995. Structurally diverse chitolipooligosaccharide Nod factors accumulate primarily in membranes of wild-type *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. *Biochemistry* 34:3832-3840.
- Piñero, D., Martínez, E., and Selander, R. K. 1988. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2825-2832.
- Poupot, R., Martínez-Romero, E., Gautier, N., and Promé, J.-C. 1995. Wild type *Rhizobium etli*, a bean symbiont, produces acetyl-fucosylated, *N*-methylated, and carbamoylated nodulation factors. *J. Biol. Chem.* 270:6050-6055.
- Pueppke, S. G. 1996. The genetic and biochemical basis of nodulation

- of legumes by Rhizobia. *Crit. Rev. Biotechnol.* 16:1-51.
- Quinto, C., de la Vega, H., Flores, M., Fernández, L., Ballado, T., Soberón, G., and Palacios, R. 1982. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli*. *Nature* 299:724-726.
- Quinto, C., Wijfjes, A. H. M., Bloemberg, G. V., Blok-Tip, L., López-Lara, I. M., Lugtenberg, B. J. J., Thomas-Oates, J. E., and Spaink, H. P. 1997. Bacterial nodulation protein NodZ is a chitin oligosaccharide fucosyltransferase which can also recognize related substrates of animal origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4336-4341.
- Relić, B., Perret, X., Estrada-García, M. T., Kopcinska, J., Golinowski, W., Krishnan, H. B., Pueppke, S. G., and Broughton, W. J. 1994. Nod factors of *Rhizobium* are a key to the legume door. *Mol. Microbiol.* 13:171-178.
- Relić, B., Talmont, F., Kopcinska, J., Golinowski, W., Promé, J.-C., and Broughton, W. J. 1993. Biological activity of *Rhizobium* sp. NGR234 Nod-factors on *Macroptilium atropurpureum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6:764-774.
- Romero, D., Martínez-Salazar, J., Girard, L., Brom, S., Dávila, G., Palacios, R., Flores, M., and Rodríguez, C. 1995. Discrete amplifiable regions (Amplicons) in the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42. *J. Bacteriol.* 177:973-980.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis T. A. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Schultze, M., Kondorosi, É., Ratet, P., Buiré, M., and Kondorosi, A. 1994. Cell and molecular biology of *Rhizobium*-plant interactions. *Int. Rev. Cytol.* 156:1-75.
- Scott, D. B., Young, C. A., Collins-Emerson, J. M., Terzaghi, E. A., Rockman, E. S., Lewis, P. E., and Pankhurst, C. E. 1996. Novel and complex chromosomal arrangement of *Rhizobium loti* nodulation genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9:187-197.
- Segovia, L., Young, J. P. W., and Martínez-Romero, E. 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:374-377.
- Shen, H., Heacock, P. N., Clancey, C. J., and Dowhan, W. 1996. The CDS1 gene encoding CDP-diacylglycerol synthase in *Saccharomyces cerevisiae* is essential for cell growth. *J. Biol. Chem.* 271:789-795.
- Slauch, J. M., Lee, A. A., Mahan, M. J., and Mekalanos, J. J. 1996. Molecular characterization of the *oafA* locus responsible for acetylation of *Salmonella typhimurium* O-antigen: OafA is a member of a family of integral membrane trans-acylases. *J. Bacteriol.* 178:5904-5909.
- Spaink, H. P. 1995. The molecular basis of infection and nodulation by Rhizobia: The ins and outs of symbiogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33:345-368.
- Sprent, J., and Sprent, P. 1990. *Nitrogen Fixing Organisms. Pure and Applied Aspects*. Chapman and Hall, Cambridge.
- Staehein, C., Granado, J., Müller, J., Wiemken, A., Mellor, R. B., Felix, G., Regenass, M., Broughton, W. J., and Boller, T. 1994. Perception of *Rhizobium* nodulation factors by tomato cells and inactivation by root chitinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2196-2200.
- Van Rhijn, P., and Vanderleyden, J. 1995. The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol. Rev.* 59:124-142.
- Vann, W. F., Liu, T.-Y., and Robbins, J. B. 1978. Cell-free biosynthesis of the O-acetylated N-acetylneuraminic acid capsular polysaccharide of group C Meningococci. *J. Bacteriol.* 133:1300-1306.
- Villalobos, M. A., Nava, N., Vázquez, M., and Quinto, C. 1994. Nucleotide sequence of the *Rhizobium etli* *nodS* gene. *Gene* 150:201-202.
- Weaver, R. W., Wei, G. R., and Berryhill, D. L. 1990. Stability of plasmids in *Rhizobium phaseoli* during culture. *Soil Biol. Biochem.* 22:465-469.
- Whitfield, C., and Valvano, M. A. 1993. Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in gram-negative bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 35:135-245.
- Wilson, K. J., Hughes, S. G., and Jefferson, R. A. 1992. The *Escherichia coli* *gus* operon, induction and expression of the *gus* operon in *E. coli* and the occurrence and use of GUS in other bacteria. Pages 7-23 in: *GUS Protocols, Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression*. S. R. Gallagher, ed. Academic Press, San Diego, CA.

## **RESULTADOS ADICIONALES: Regulación de *nolL*.**

Los experimentos de expresión del gene *nolL* realizados con los plásmidos pBBMCS53 y pACP6 introducidos en la cepa CE3, demostraron que la expresión del gene es independiente de la inducción por genisteína. Estos experimentos también mostraron que su expresión no es constitutiva y que la actividad de GUS se incrementa con la edad del cultivo bacteriano, es decir, la actividad de GUS es mayor en cultivos de 24 horas > 15 horas > 8 horas > 4 horas > 1 hora. Aunque estos resultados parecen variar de acuerdo a la concentración celular en el cultivo inicial (Fig.8, paneles A y B). La actividad de GUS es prácticamente inexistente en las cepas CFNX89/pACP6 (Fig.8C) y CFNX89/pBBMCS53 (datos no mostrados). Por lo tanto, la expresión de *nolL* debe estar regulada positivamente por algún determinante genético presente en el plásmido simbiótico de CE3.

No realizamos un análisis estadístico de los datos ya que, según el criterio de Cochran, los datos no son suficientes para ser evaluados estadísticamente.

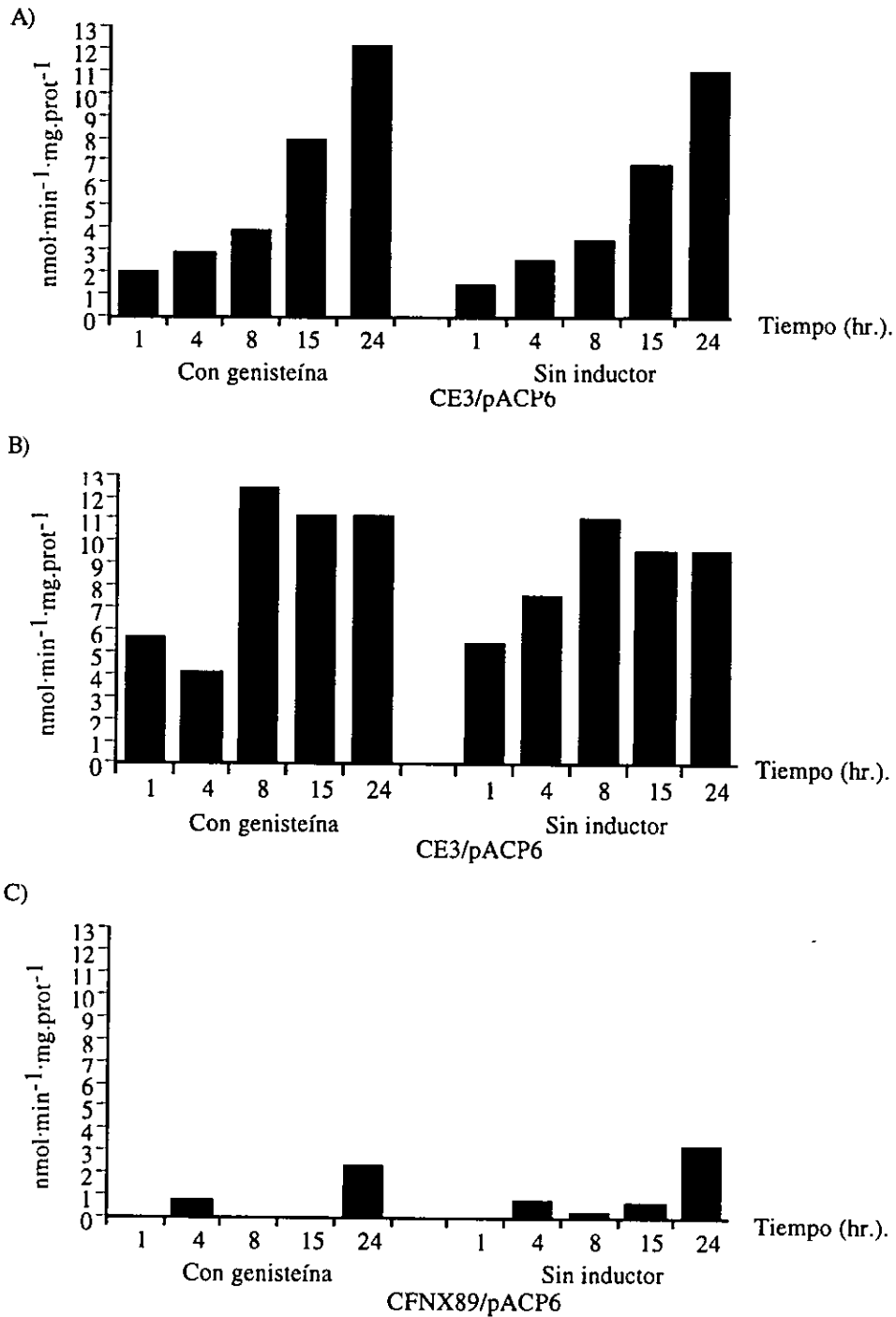


Fig.8. Expresión de GUS (nmoles de pNPG hidrolizado por minuto por mg de proteína) en la A) cepa CE3/pACP6 (cultivo inicial D.O.540=0.01), B) cepa CE3/pACP6 (cultivo inicial D.O.540=0.1) y C) cepa CFNX289/pACP6 (cultivo inicial D.O.540=0.1).

## DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS.

Los factores de nodulación son esenciales para el establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. El tratar de entender el funcionamiento de los genes que los construyen, es solamente un intento más por comprender la interacción planta-bacteria. Los resultados presentados en el artículo "The *nolL* gene from *Rhizobium etli* determines nodulation efficiency by mediating the acetylation of the fucosyl residue in the nodulation factor" son un paso más para acercarnos al conocimiento de la naturaleza de estas interacciones.

### **NolL como una proteína transmembranal necesaria para la acetilación del factor de nodulación.**

Demostremos que la proteína NolL es necesaria para la acetilación del residuo de fucosa del factor de nodulación de *Rhizobium etli* CE3. Recientemente, se demostró también que una mutante *nolL*<sup>-</sup> de *Rhizobium* sp. NGR234 es incapaz de acetilar sus factores de nodulación sobre el residuo de fucosa, y que la introducción del gene *nolL* de *Rhizobium* sp. NGR234 a *R. fredii* permite la acetilación de los mismos (de los factores Nod) (Berck et al. 1999). Esto parece indicar que, como se espera entre proteínas de tan alta identidad, las diferentes proteínas NolL descritas tienen la misma función.

La similitud entre las secuencias de las diversas proteínas NolL reportadas y diversas acetil-transferasas, nos llevaron a proponer a NolL como una posible acetil-transferasa. Esta propuesta ha sido reforzada por el trabajo de Berck y su grupo (1999) en el que demuestran que la presencia de NolL es necesaria para que células bacterianas permeabilizadas presenten actividad de acetil-transferasa y sean capaces de transferir un grupo acetilo desde acetil-coenzima A (Ac-CoA) hasta el residuo de fucosa de los factores de nodulación. Sin embargo, la función de la proteína no ha sido probada por completo, ya que no ha podido purificarse para hacer experimentos *in vitro*.

En un estudio reciente, se observó que las proteínas GumG y GumF de *Xanthomonas campestris* deben estar funcionando como acetil-transferasas específicas. La goma xantana está formada por un esqueleto de glucosas, unidas por enlaces  $\beta$ -1,4, y con cadenas laterales de trisacáridos de manosa-( $\beta$ -1,4)-ácido glucurónico-( $\beta$ -1,2)-manosa unidos al esqueleto principal, alternadas sobre las glucosas, por enlaces  $\alpha$ -1,3. Uno de los residuos de manosa puede presentarse acetilado y el otro piruvilado ó ambos pueden estar acetilados. Experimentos realizados con células permeabilizadas de *X. campestris* demostraron que GumF se involucra con la acetilación del residuo de manosa más interno (el que se une al esqueleto de glucosa) y GumG con la acetilación del residuo de manosa más externo (Katzen et al. 1998). Estos experimentos indican también que la actividad es muy específica para la unión del grupo acetilo con una molécula de azúcar determinada (Katzen et al. 1998) y sugieren que la conformación de la molécula y la proteína deben ser, de alguna manera, complementarias.

Surgieron, sin embargo, hipótesis alternativas sobre la posible función de Noll. En primer lugar nos planteamos la posibilidad de que funcionara como un transportador específico de factores de nodulación acetilados. Esta posibilidad ya fue descartada y discutida en el artículo.

Una segunda hipótesis es que Noll fuera una enzima que participara en un paso previo a la transferencia del grupo acetilo hacia la fucosa del factor de nodulación. Tal vez como un activador de la acetil-transferasa o de alguna otra molécula intermediaria. Una tercera posibilidad es que Noll fuera un transductor de señales específico para la acetilación del factor de nodulación.

Al referirme a la posibilidad de estar tratando con un intermediario en el proceso de acetilación, estoy hablando de un hecho probable que no puede descartarse con el experimento hecho con células permeabilizadas de *Rhizobium* (Berck et al. 1999). Los experimentos hechos con *X. campestris* (Katzen et al. 1998) únicamente apuntarían a que esta actividad sería altamente específica, pero no se descarta la opción. La tercera opción es también posible, y hablaríamos también de un transductor de señales (estimulado por una señal que no hemos detectado) para una acetilación muy específica (por ello existirían dos diferentes en *X. campestris*).

Un experimento *in vitro*, con la proteína purificada y en el que se controle la presencia de sustratos específicos, ayudará a responder esta incógnita. Probablemente, fuera necesario mantener la proteína embebida en una membrana para lograr su funcionamiento. Experimentos sobre la actividad de acetil-transferasa de una enzima transmembranal se han llevado a cabo con fragmentos de membranas lisosomales de placentas humanas en presencia de Ac-CoA y de un sustrato marcado radiactivamente, para después medir la concentración del producto acetilado (Meikle et al. 1995).

Nuestras predicciones sugieren que estamos tratando con una proteína formada por nueve  $\alpha$ -hélices que, muy probablemente, son transmembranales. De acuerdo con lo observado al utilizar el programa TMpred (Hofmann y Stoffel 1993, Fig.9), la probabilidad de que el extremo amino se encuentre orientado hacia el interior de la célula o hacia el espacio periplásmico es prácticamente la misma y el modelo que se favorece varía de acuerdo a la ventana utilizada (número de aminoácidos mínimo y máximo para formar  $\alpha$ -hélices). Un análisis realizado con PSA (Protein Structure Analysis. Stultz et al. 1993; White et al. 1994) nos confirmó que existe una mayor probabilidad (probabilidad=1) de que Noll esté integrada por  $\alpha$ -hélices no expuestas separadas por "loops", que por algún otro tipo de estructura secundaria (probabilidad=4.9e-09; datos no mostrados). Pero tampoco podemos predecir la orientación de las hélices en la membrana interna.

Yo he trabajado suponiendo que Noll, por sí sola, es suficiente para llevar a cabo la actividad de trans-acetilasa. Sin embargo, sería necesario llevar a cabo experimentos de purificación de la proteína, los cuales, podrían indicarnos si se encuentra sola o si forma parte de un complejo proteico. En caso de existir otra proteína necesaria para el funcionamiento de Noll, entonces, esta debería buscarse en la región de 170 Kb del pSym silvestre conservadas en pGM1 o en alguno de los otros replicones de la cepa.

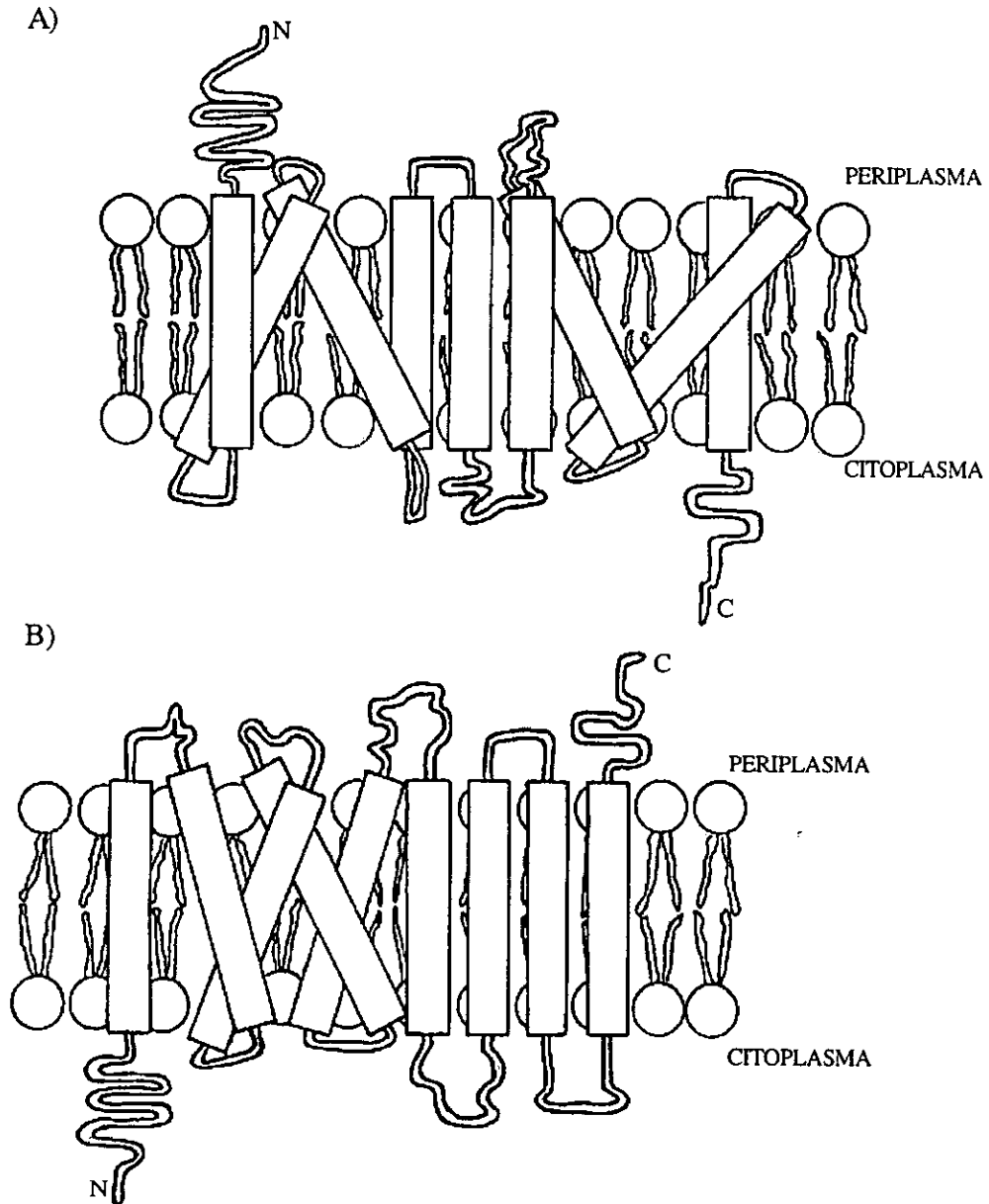


Fig.9. Modelos propuestos (predichos según el programa TMpred, Hofmann y Stoffel 1993) para la estructuración de NoIL en la membrana citoplásmica. A)Extremo amino orientado hacia el periplasma. B)Extremo amino orientado hacia el interior de la célula.



### *nolL* y su expresión.

El gene *nolL* no parece estar regulado por inductores como la genisteína. Sin embargo, su expresión no parece ser constitutiva, sino que parece depender de un regulador positivo presente en el plásmido simbiótico y de la concentración celular en el cultivo. ¿Cuál es el estímulo que determina su expresión? La limitación de nutrientes en el medio podría ser la señal de encendido para este regulador, igualmente sucede con la limitación de oxígeno y con la densidad poblacional. Experimentos en medio rico y medio mínimo, en matraces con diferentes volúmenes de cultivo (para variar la cantidad total de oxígeno disponible) y con diferentes densidades celulares, nos ayudarían a determinar cuál(es) de estos factores es determinante para la expresión de *nolL*. Una vez determinado el estímulo, podría procederse a complementar a la cepa CFNX89/pACP6 con los diferentes cósmidos del plásmido simbiótico para rastrear a aquel involucrado con la expresión del gene *nolL*. La región en que se encuentra este regulador positivo es, sin duda alguna, la zona *nod-nif* de 170 Kb conservada en pGM1, ya que *nolL* (plásmido pACP5) es expresado en la cepa CFNX250 (experimentos de complementación para producción de factores de nodulación, ver artículo Fig. 2, carriles 13 y 14, cepa CFNX296). Una segunda posibilidad es que *NolL* se autoregulara positivamente. Un experimento de expresión de GUS en presencia y en ausencia de un gene *nolL* silvestre nos ayudaría a aceptar o rechazar esta hipótesis.

Los diferentes genes *nolL* parecen estar regulados de distintas maneras. El gene de *Rhizobium loti* no está asociado a una caja-*nod* por lo que los autores sugieren que podría regularse de manera independiente a los flavonoides secretados por la planta (Scott et al. 1996). Por otro lado, el homólogo encontrado en *Rhizobium* sp. NGR234 sí está asociado a una caja-*nod* funcional que responde a la inducción por flavonoides (Berck et al. 1999; Freiberg et al. 1997).

## Cinética de síntesis de los factores de nodulación de *Rhizobium etli* CE3 y su secreción al medio.

Si las proteínas involucradas en la síntesis del factor de nodulación de *R. etli* funcionan como sus homólogos, descritos en otras cepas, entonces podemos predecir algunos de los pasos en la síntesis del factor de nodulación (Fig. 10):

Tras la activación de los genes *nod* por acción conjunta de NodD y los flavonoides de la planta, NodC se encarga de polimerizar los residuos de *N*-acetilglucosamina hasta formar pentasacáridos (Kamst et al. 1997). Estos pentasacáridos son *N*-deacetilados en la glucosamina del extremo no reductor, por acción de NodB (John et al. 1993). Este producto deacetilado y no acilado es el sustrato de las proteínas NodS y NodZ, para *N*-metilar el extremo no reductor (Geleen et al. 1995) y 6-*O*-fucosilar (Quinto et al. 1997) el extremo reductor de la molécula, respectivamente. Suponemos que estas proteínas funcionan de manera independiente una de otra, ya que podemos encontrar ejemplos de factores de nodulación metilados y no fucosilados ó fucosilados y no metilados en especies como *Azorhizobium caulinodans* (Mergaert et al. 1997a) y *Bradyrhizobium elkanii* (Sttokermans et al. 1996).

Este “pre-factor” de nodulación es acilado por acción de NodA, que transfiere ácidos grasos (que son comunes en la membrana celular) al sitio deacetilado por NodB (Atkinson et al. 1994). Esta molécula es ahora el sustrato idóneo para la acetilación por NodL (sobre el residuo de fucosa del extremo reductor; Berck et al. 1999).

Suponemos que NodO también utilizaría como sustrato la molécula NodReV(C16:0 ó C18:1,Me,Fuc), para llevar a cabo la 4-*O*-carbamilación del extremo no reductor (Jabbouri et al. 1998). Creemos que este es el sustrato adecuado dado que no hemos encontrado moléculas carbamiladas que carezcan de un grupo metilo ni de un grupo fucosilo. La actividad de NodO es independiente de la actividad de NodL ya que encontramos compuestos fucosilados y carbamilados, y acetil-fucosilados sin carbamilar.

Así, la acetilación y/o la carbamilación darían fin a la síntesis de los factores de nodulación y éstos podrían ahora ser secretados al medio por acción conjunta de NodIJ (Cárdenas et al. 1996).

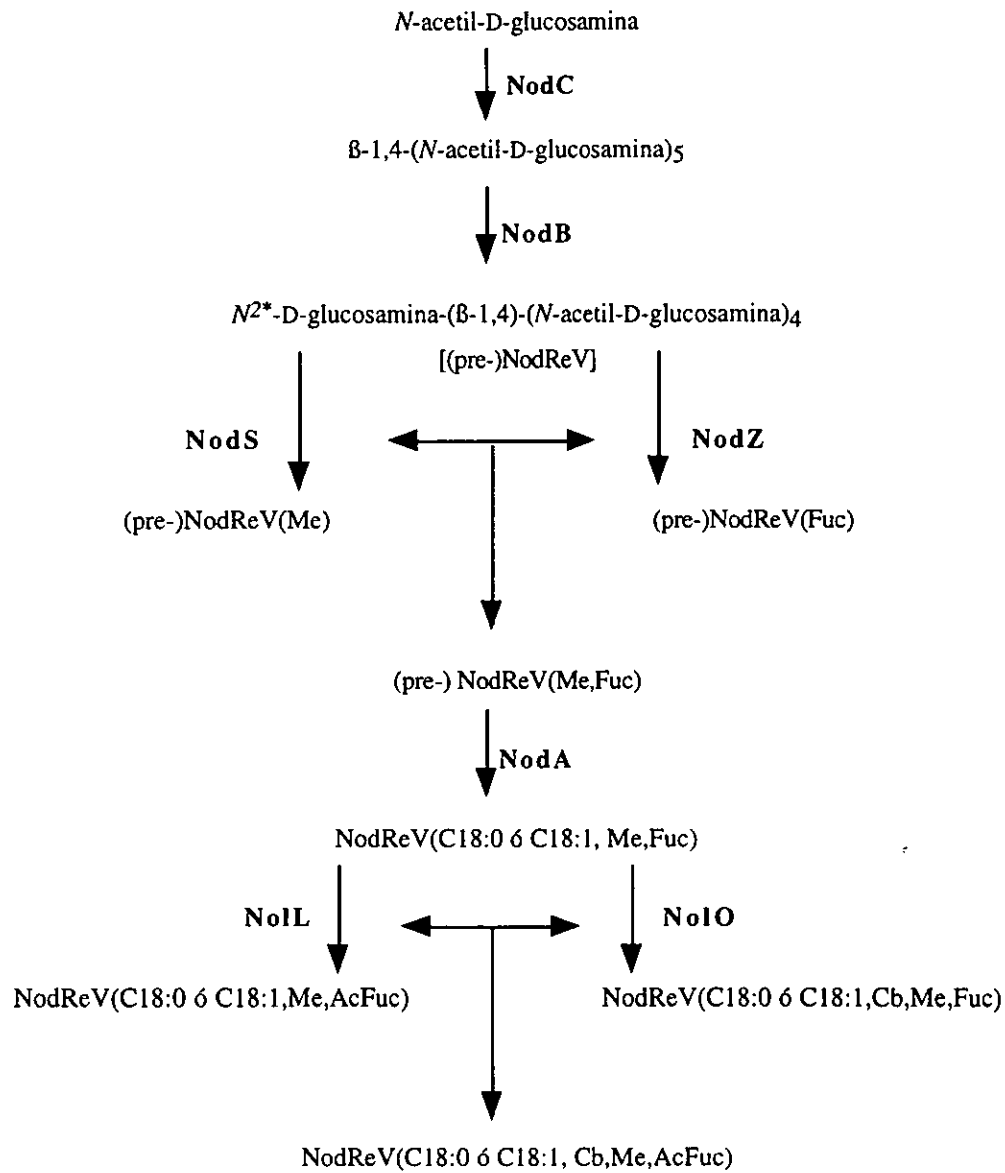


Fig. 10. Cinética de síntesis propuesta para los factores de nodulación de *Rhizobium etli* CE3 (ver detalles en el texto).

## **NoIL y la competencia por la nodulación.**

Sabemos bien que un cambio en la cinética de nodulación de una cepa, ya sea por retraso en el inicio de la nodulación o por la incapacidad de formar un número igual de nódulos en la raíz de una planta que la cepa contra la cual se compite, disminuye la capacidad competitiva de la cepa en cuestión (Tripplet y Sadowsky 1992). Así pues, es evidente que la cepa CFNX289, debería tener una menor capacidad competitiva que su cepa parental CE3, en la nodulación de plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. L3-111-CM y de *Vigna umbellata*. Esta conclusión no es tan evidente si tratamos con *Phaseolus vulgaris* cvs. Negro Jamapa y Canario 101 o con *Vigna unguiculata*. Por lo tanto, sería necesario realizar experimentos de competitividad entre las cepas CFNX289 y CE3, en los diferentes cultivares de plantas, si quisiera determinarse su capacidad competitiva.

## **Los factores de nodulación y la respuesta de la planta.**

Algunas preguntas carecen, sin duda, de una respuesta concreta: ¿Por qué cada planta responde de diferente manera a los diferentes factores de nodulación? ¿Por qué diferencias muy pequeñas entre las moléculas pueden llevar a grandes diferencias en las respuestas? ¿Qué otros requisitos deben cumplir la bacteria y la planta para tener una simbiosis óptima? ¿Por qué se sintetizan mezclas de factores y no uno solo? ¿Sería más eficiente la síntesis de un solo factor de nodulación para nodular una sola planta?

Tenemos cierta idea de lo que puede estar sucediendo para que se lleve a cabo el reconocimiento entre los simbioses y la formación de la simbiosis. Mencioné en la introducción que las quitinasas de la planta son un factor determinante del inicio de la infección. Parece ser que las plantas secretan quitinasas específicas (como parte de una respuesta de defensa) para cada factor de nodulación, y provocan su degradación. Sin embargo, esta degradación parecería ser indispensable para el reconocimiento y la infección. Así mismo, esta degradación es más rápida para unos esqueletos de lipooligoquitina que para otros, correlacionando con el número y tipo de sustituyentes laterales que presentan (Stahelin et al. 1994, 1995, 1997). Así pues, parecería que la

producción de más de un factor de nodulación es indispensable para que la simbiosis se establezca efectivamente. Mi opinión es que producir un sólo tipo de factor de nodulación no es eficiente porque i) aunque se reconociera muy específicamente por la planta, desencadenaría también una respuesta tan específica de degradación que la simbiosis nunca se llevaría a cabo, ó ii) se reconocería tan específicamente que sólo se llevaría a cabo la simbiosis entre una cepa y un cultivar de planta y no habría posibilidad de variación.

En términos evolutivos, podríamos pensar que la degradación de los factores de nodulación por quitinasas específicas de la planta es una consecuencia del posible origen patogénico de *Rhizobium*. Tras la inoculación por *Rhizobium*, la planta responde también aumentando la producción de compuestos de la vía de los fenilpropanoides, la secreción de peroxidasas y de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina, en conjunto, éstas y otras respuestas son comunes a las respuestas de las plantas ante patógenos (revisado en Baron y Zambryski 1995). Existen ejemplos de diversas proteínas homólogas que son utilizadas por simbioses y patógenos para interactuar con su huésped, por ejemplo, ambos tipos de bacterias producen las mismas enzimas de degradación de pared celular y fitohormonas, y utilizan los mismos mecanismos de secreción (revisado en Preston et al. 1998). Asimismo, se han encontrado sistemas de dos componentes homólogos indispensables para endosimbiosis, en cepas de *Rhizobium meliloti*, y patogenicidad, en cepas de *Agrobacterium tumefaciens* y *Brucella abortus* (Sola-Landa et al. 1998). Estudios recientes han demostrado la existencia de una cinasa para proteínas, tipo receptor, que se induce en presencia de patógenos y simbioses, pero cuya expresión se silencia tempranamente en interacción con simbioses (Lange et al. 1999). La hipótesis del posible origen patogénico de *Rhizobium* se ha visto reforzada por:

- a) la existencia de cepas inefectivas para la nodulación que provocan la formación de estructuras similares a tumores en las raíces de las plantas (revisado en Vance 1983);
- b) cepas de *Rhizobium etli* mutantes en el gene *glnT* que son patogénicas ya que provocan un detrimento en el crecimiento de plantas de frijol inoculadas, posiblemente, por la secreción de un compuesto tóxico (Guzmán et al. 1993);
- c) cepas de *Rhizobium tropici* tipo B con un gene *glnD* funcional que, aunque sean incapaces de nodular, inducen clorosis foliar de diversas plantas dicotiledoneas (O'Connell et al. 1993, 1998) y

d) cepas de *Bradyrhizobium japonicum* que producen fitotoxinas llamadas rizobitoxinas (citado en Durbin y Langston-Unkefer 1988).

Así, antes de la existencia de una relación simbiótica, la planta leguminosa debe haber desarrollado mecanismos de protección contra la invasión por *Rhizobium*, y la degradación de factores de nodulación por quitinasas de la planta podría ser una actividad vestigial de la antigua relación patogénica entre ellas.

Por otro lado, el que existiera un sólo factor de nodulación y un sólo receptor de membrana involucrado en un reconocimiento altamente específico sería “evolutivamente peligroso” si consideramos que diversos patógenos podrían ser capaces de mimetizar al factor de nodulación e infectar a la planta. Podría iniciarse una “carrera armamentista” en la cual: i) Las plantas leguminosas deberían elaborar nuevos mecanismos de resistencia a los patógenos, incluyendo el cambio en sus receptores; ii) *Rhizobium* deberían coevolucionar junto con su planta huésped ó perdería su capacidad de establecer una simbiosis; y iii) el patógeno debería ser capaz de responder a cada cambio de la planta con uno propio, para poder mantenerse como patógeno de la misma.

Actualmente, existen varias hipótesis sobre cómo reconoce la planta a los factores de nodulación y cómo los internaliza para permitir la formación e invasión de los nódulos. Estas hipótesis coinciden en que el ácido graso que se une al extremo no reductor del esqueleto de oligoquitina es necesario para la internalización del factor de nodulación. Una de las hipótesis sugiere la existencia de una ruta de difusión, de factores de nodulación y quitina-lipooligosacáridos en general, a través de la membrana citoplásmica sin la intervención de un receptor específico (Philip-Hollingsworth et al. 1997). Otras hipótesis hablan de la existencia de receptores específicos y otras de receptores inespecíficos para cada tipo de factor de nodulación (Philip-Hollingsworth et al. 1997). Otras hipótesis dicen que deben existir ambos tipos de receptores a la vez (Ardourel et al. 1994; Heidstra y Bisseling 1996; Philip-Hollingsworth et al. 1997; Schultze y Kondorosi 1998). La existencia de receptores específicos e inespecíficos en cada raíz determinaría el grado de respuesta por parte de la planta ante cada uno de los factores de nodulación secretados por *Rhizobium* y en contacto con la superficie radicular. Esto es, si los receptores son inespecíficos,

cada factor de nodulación será detectado de manera diferente por parte de la planta y de la afinidad de la unión entre el ligando y el receptor o de la compatibilidad conformacional entre la molécula señal y la molécula receptora, dependerán la intensidad del estímulo y la respuesta (i. e. algunos factores sólo permitirán la deformación de pelos radiculares, otros permitirán que comience la división de células corticales, otros más permitirán la formación completa de nódulos). Por otro lado, si los receptores son altamente específicos, entonces deberá existir más de un receptor que permita que la planta responda a cada uno de los factores de nodulación como estímulos específicos a los que hay que responder. Tal vez cada una de estas hipótesis sea una respuesta específica a una pregunta general, y más de una pudiera ser válida dependiendo de cada bacteria y de cada planta.

En general, podemos decir que la capacidad que tienen una planta y una bacteria de interactuar específicamente para establecer una simbiosis es un fenómeno multifactorial. Este fenómeno de especificidad comienza con la liberación de flavonas por parte de la planta, estas flavonas son reconocidas específicamente por la bacteria, quien ahora debe ser capaz de activar la vía de síntesis de los factores de nodulación. Paralelamente a esto, la bacteria debe de ser capaz de detectar quimioatrayentes vegetales, para poder adherirse a la planta. Una vez secretados, los factores de nodulación de la bacteria deben ser reconocidos por la planta e internalizados (no se sabe si como moléculas completas o fragmentadas). Los factores de nodulación deben, a su vez, permitir la activación de los genes para la síntesis de nodulinas y la división de células corticales. Esta serie de factores permite la formación de hilos de infección por los que penetrarán las bacterias. Durante el periodo de reconocimiento e infección los EPS, LPS y los KPS son también importantes determinantes de especificidad. Así pues, la especificidad está determinada por un sinnúmero de factores, muchos de los cuales con seguridad aún desconocemos, y que no pueden considerarse como factores aislados cuando se quiere determinar el conjunto de requisitos para que se establezca la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa.

## CONCLUSIONES.

-La proteína Noll es necesaria para la 4-O-acetilación del residuo de fucosa del extremo reductor del factor de nodulación de *Rhizobium etli* CE3.

-En *Rhizobium etli*, el gene *noll* no es regulado por genisteína. Sin embargo, algún elemento genético presente en la cepa CE3 determina que sea regulado positivamente.

-Los genes *noll* de *Rhizobium etli*, de *R. loti* y de *Rhizobium* sp. NGR234 codifican para la misma proteína.

-Los genes *noll* de *Rhizobium etli*, de *R. loti* y de *Rhizobium* sp. NGR234 parecen estar regulados de distinta manera.

-Las proteínas Noll son, probablemente, acetil-transferasas transmembranales, miembros de la familia de transacilasas transmembranales.

-La proteína Noll no es un transportador diferencial de factores de nodulación acetilados.

-La acetilación del residuo de fucosa del factor de nodulación es un determinante importante en la eficiencia de la nodulación.



## LITERATURA CITADA.

Albrecht C., R. Geurts y T. Bisseling. 1999. Legume nodulation and mycorrhizae formation; two extremes in host specificity meet. EMBO J. 18:281-288.

Ardourel, M., N. Demont, F. Debelle, F. Maillet, F. de Billy, J.-C. Promé, J. Dénarié y G. Truchet. 1994. *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide nodulation factors: Different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic developmental responses. Plant Cell 6:1357-1374.

Ardourel, M., G. Lortet, F. Maillet, P. Roche, G. Truchet, J.-C. Promé y C. Rosenberg. 1995. In *Rhizobium meliloti*, the operon associated with the *nod* box n5 comprises *nodL*, *noeA* and *noeB*, three host-range genes specifically required for the nodulation of particular Medicago species. Mol. Microbiol. 17:687-699.

Assman, S. M. 1995. Electryfing symbiosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:1795-1796.

Atkinson, E. M., M. M. Palcic, O. Hindsgaul y S. R. Long. 1994. Biosynthesis of *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide Nod factors: NodA is required for an N-acyltransferase activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:8418-8422.

Baev, N., G. Endre, G. Petrovics, Z. Bánfalvi y A. Kondorosi. 1991. Six nodulation genes of *nod* box locus 4 in *Rhizobium meliloti* are involved in nodulation signal production: *nodM* codes for D-glucosamine synthetase. Mol. Gen. Gen. 228:113-124.

Baev, N. y A. Kondorosi. 1992. Nucleotide sequence of the *Rhizobium meliloti nodL* gene located in locus n5 of the *nod* regulon. Plant Mol. Biol. 18:843-846.

Baev, N., M. Schultze, I. Barlier, D. C. Ha, H. Virelizier, E. Kondorosi y A. Kondorosi. 1992. *Rhizobium nodD* and *nodN* genes are common *nod* genes: *nodM* encodes functions for efficiency of Nod signal production and bacteroid maturation. J. Bacteriol. 174:7555-7565.

Bakkers, J., C. E. Semino, H. Stroband, J. W. Kijne, P. W. Robbins y H. P. Spaink. 1997. An important developmental role for oligosaccharides during early embryogenesis of cyprinid fish. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:7982-7986.

Balatti, P. A., L. G. Kovács, H. B. Krishnan y S. G. Pueppke. 1995. *Rhizobium* sp. NGR234 contains a functional copy of the soybean cultivar specificity locus, *noIXWBTUV*. Mol. Plant-Microbe Interac. 8:693-699.

Barnett, M. J. y S. R. 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.

Barnett, M. J. y S. R. Long. 1997. Identification and Characterization of a gene on *Rhizobium meliloti* pSyma, *syrB*, that negatively affects *syrM* expression. Mol. Plant-Microbe Interac. 10:550-559.

Baron, C. y P. C. Zambryski. 1995. The plant response in pathogenesis, symbiosis, and wounding: Variations on a common theme? Ann. Rev. Gen. 29:107-129.

Bauer, P., P. Ratet, M. D. Crespi, M. Schultze y Á. Kondorosi. 1996. Nod factors and

cytokinins induce similar cortical cell division, amyloplast deposition and *MsEnod12A* expression patterns in alfalfa roots. Plant J. 10:91-105.

Baureithel, K., G. Felix y T. Boller. 1994. Specific, high affinity binding of chitin fragments to tomato cells and membranes. Competitive inhibition of binding by derivatives of chitooligosaccharides and a Nod factor of *Rhizobium*. J. Biol. Chem. 269:17931-17938.

Bec-Ferté, M. P., H. B. Krishnan, D. Promé, A. Savagnac, S. G. Pueppke y J.-C. Promé. 1994. Structures of nodulation factors from the nitrogen-fixing soybean symbiont *Rhizobium fredii* USDA257. Biochemistry 33:11782-11788

Bec-Ferté, M. P., H. B. Krishnan, A. Savagnac, S. G. Pueppke y J.-C. Promé. 1996. *Rhizobium fredii* synthesizes an array of lipooligosaccharides, including a novel compound with glucose inserted into the backbone of the molecule. FEBS Lett. 393:273-279.

Bellato, C. M., S. G. Pueppke y H. B. Krishnan. 1997. Regulation of the expression of the *nod* box-independent nodulation gene, *nodX*, in *Sinorhizobium fredii*, a nitrogen-fixing symbiont of legume plants. FEMS Microbiol. Lett. 157:13-18.

Berck, S., X. Perret, D. Quesada-Vincens, J.-C. Promé, W. J. Broughton y S. Jabbouri. 1999. *nodL* of *Rhizobium* sp. NGR234 is required for *O*-acetyltransferase activity. J. Bacteriol. 181:957-964.

Bhagwat, A. A. y Donald L. Keister. 1995. Site-directed mutagenesis of the  $\beta$ -(1-3),  $\beta$ -(1-6)-D-glucan synthesis locus of *Bradyrhizobium japonicum*. Mol. Plant-Microbe Interac. 8:366-370.

Bisseling, T., H. Franssen, A. Emons y D. Gadella. 1997. Legume Nodule Development. Proceedings of the 11th International Congress on Nitrogen Fixation. Paris, Francia. 20-25 de julio, 1997. p 12.

Bladergroen, M. R. y H. P. Spaink. 1998. Genes and signal molecules involved in the rhizobia-Leguminosae symbiosis. Curr. Op. Plant Biol. 1:353-359.

Bloemberg, G. V., E. Kamst, M. Harteveld, K. M. G. M. Van der Drift, J. Haverkamp, J. E. Thomas-Oates, B. J. J. Lugtenberg y H. P. Spaink. 1995a. A central domain of *Rhizobium* NodE protein mediates host specificity by determining the hydrophobicity of fatty acyl moieties of nodulation factors. Mol. Microbiol. 16:1123-1136.

Bloemberg, G. V., R. M. Lagas, S. Van Leewen, G. A. Van der Marel, J. H. Van Boom, B. J. J. Lugtenberg y H. P. Spaink. 1995b. Substrate specificity and kinetic studies on nodulation protein NodL of *Rhizobium leguminosarum*. Biochemistry 34:12712-12720.

Boivin, C., I. Ndoye, F. Molouba, P. de Lajudie, N. Dupuy y B. Dreyfus. 1997. Stem nodulation in legumes: Diversity, mechanisms, and unusual characteristics. Crit. Rev. Plant Sci. 16:1-30.

Bono, J.-J., J. Riond, K. C. Nicolaou, N. J. Bockovich, V. A. Estevez, J. V. Cullimore y R. Ranjeva. 1995. Characterization of a binding site for chemically synthesized lipooligosaccharidic NodRm factors in particulate fractions prepared from root. Plant J. 7:253-260.

Boundy-Mills, K. L., R. M. Kossak, R. E. Tully, S. G. Pueppke, S. Lohrke y M. J. Sadowsky. 1994. Induction of the *Rhizobium fredii* *nod* box-independent nodulation gene *nodJ*

requires a functional *nodD1* gene. Mol. Plant-Microbe Interac. 7:305-308.

Brewin, N. J. 1991. Development of the legume root nodule. Ann. Rev. Cell Biol. 7:191-226.

Brewin, N. J. e I. V. Kardailski, 1997. Legume lectins and nodulation by *Rhizobium*. Trends Plant Sci. 2: 92-98

Brom, S., A. García de los Santos, T. Stepkowsky, M. Flores, G. Dávila, D. Romero y R. Palacios. 1992. Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli are required for optimal symbiotic performance. J. Bacteriol. 174:5183-5189.

Bulawa, C. E. 1992. *CSD2*, *CSD3*, and *CSD4*, genes required for chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the *CSD2* gene product is related to chitin synthases and to developmentally regulated proteins in *Rhizobium* species and *Xenopus laevis*. Mol. Cell. Biol. 12:1764-1776.

Caetano-Anollés, G. y P. M. Gresshoff. 1991. Plant genetic control of nodulation. Ann. Rev. Microbiol. 45:345-382.

Campbell, R. 1987. Ecología Microbiana. Limusa, México.

Cárdenas, L., J. Domínguez, C. Quinto, I. M. López-Lara, B. J. J. Lugtenberg, H. P. Spaink, G. J. Rademaker, J. Haverkamp y J. E. Thomas-Oates. 1995. Isolation, chemical structures and biological activity of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium etli*. Plant Mol. Biol. 29:453-464.

Cárdenas, L., J. Domínguez, O. Santana y C. Quinto. 1996. The role of *nodI* and *nodJ* genes in the transport of Nod metabolites in *Rhizobium etli*. Gene 173:183-187.

Cárdenas, L., L. Vidali, J. Domínguez, H. Pérez, F. Sánchez, P. K. Hepler y C. Quinto. 1998. Rearrangements of actin microfilaments in plant root hairs responding to *Rhizobium etli* nodulation signals. Plant Physiol. 116:871-877.

Carlson, R. W., J. Sanjuan, U. R. Bhat, J. Glushka, H. P. Spaink, A. H. M. Wifjes, A. A. N. van Brussell, T. J. W. Stokkermans, N. K. Peters y G. Stacey. 1993. The structures and biological activities of the lipo-oligosaccharide nodulation signals produced by type I and II strains of *Bradyrhizobium japonicum*. J. Biol. Chem. 268:18372-18381.

Carlson, R. W., N. P. J. Price y G. Stacey. 1994. The biosynthesis of rhizobial lipo-oligosaccharide nodulation signal molecules. Mol. Plant-Microbe Interac. 7:684-695.

Cedergren, R. A., J. Lee, K. L. Ross y R. I. Hollingsworth. 1995. Common links in the structure and cellular localization of *Rhizobium* chitolipooligosaccharides and general *Rhizobium* membrane phospholipid and glycolipid components. Biochemistry 34:4467-4477.

Cooper, J. B. y S. R. Long. 1994. Morphogenetic rescue of *Rhizobium meliloti* nodulation mutants by *trans*-zeatin secretion. Plant Cell 6:215-225.

Coronado, C., J. Zuanazzi, S. Poirier, B. Charrier, P. Ratet y A. Kondorosi. 1993. Regulation of flavonoid production in *Medicago sativa*-*Rhizobium meliloti* symbiosis. En: Palacios, R., J. Mora y W. E. Newton. 1993. New Horizons in Nitrogen Fixation. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. p 334.

Corvera, A. 1994. Análisis físico y funcional de un rearrreglo en el plásmido simbiótico de *Rhizobium etli* CFN42 que altera competitividad. Tesis de Licenciatura. UNAM.

Corvera, A., D. Promé, J.-C. Promé, E. Martínez-Romero y D. Romero. 1999. The *nolL* gene from *Rhizobium etli* determines nodulation efficiency by mediating the acetylation of the fucosyl residue in the nodulation factor. Mol. Plant-Microbe Interac. 12:236-246.

Cren, M., A. Kondorosi y E. Kondorosi. 1995. NodR controls expression of the *Rhizobium meliloti* nodulation genes involved in the core Nod factor synthesis. Mol. Microbiol. 15:733-747.

Crespi, M., C. Johansson, C. Charon, F. Frugier, S. Poirier, C. Sousa y A. Kondorosi. 1998. Classical and novel growth regulators acting during nodule initiation. En: Elmerich, C., A. Kondorosi y W. E. Newton (eds.). 1998. Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp. 223-224.

Cheng, H. P. y G. C. Walker. 1998. Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 180:5183-1591.

Davis, E. O. y A. W. B. Johnston. 1990. Analysis of the three *nodD* genes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*; *nodD1* is preceded by *nolE*, a gene whose product is secreted from the cytoplasm. Mol. Microbiol. 4:921-932.

Dazzo F.B., G.L. Truchet, R.I. Hollingsworth, E.M. Hrabak, H. S. Pankratz, S. Philip-Hollingsworth, J.L. Salzwedel, K. Chapman, L. Appenzeller, A. Squartini, D. Gerhold y G. Orgambide. 1991. *Rhizobium* lipopolysaccharide modulates infection thread development in white clover root hairs. J. Bacteriol. 173:5371-5384.

De Jong, A., J., R. Heidstra, H. P. Spaank, M. V. Hartog, E. A. Meijer, T. Hendriks, F. Lo Schiavo, M. Terzi, T. Bisseling, A. Van Kammen y S. C. De Vries. 1993. *Rhizobium* lipooligosaccharides rescue a carrot somatic embryo mutant. Plant Cell 5:615-620.

Debellé, F., C. Plazanet, P. Roche, C. Pujol, A. Savagnac, c. Rosenberg, J.-C. Promé y J. Dénarié. 1996. The NodA proteins of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium tropici* specify the N-acylation of Nod factors by different fatty acids. Mol. Microbiol. 22:303-314.

Demont, N., F. Debellé, H. Aurelle, J. Denarié y J.-C. Promé. 1993. Role of the *Rhizobium meliloti nodF* and *nodE* genes in the biosynthesis of lipo-oligosaccharidic nodulation factors. J. Biol. Chem. 268:20134-20142.

Demont, N., M. Ardourel, F. Maillat, D. Promé, M. Ferro, J.-C. Promé y J. Dénarié. 1994. The *Rhizobium meliloti* regulatory *nodD3* and *syrM* genes control the synthesis of a particular class of nodulation factors N-acylated by ( $\omega$ -1)-hydroxylated fatty acids. EMBO J. 13:2139-2149.

Dénarié, J., G. Truchet y J.-C. Promé. 1994. *Rhizobium* nodulation factors: Synthesis and induction of plant responses. En: Daniels, M. J., J. A. Downie y A. E. Osbourn (eds.). 1994. Advances in molecular genetics of Plant-Microbe Interactions. Vol. 3. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp. 81-90.

Dénarié, J., F. Debellé y J.-C. Promé. 1996. *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide

nodulation factors: Signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. Ann. Rev. Biochem. 65:503-535.

D'Haese, M. Gao, S. Goormachtig, M. Van Montagu y M. Holsters. 1998. Characterization of an azorhizobial mutant with altered surface polysaccharides and affected in nodule invasion. En: Elmerich, C., A. Kondorosi y W. E. Newton (eds.). 1998. Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp. 227-228.

Díaz, C. L., H. P. Spaink, C. A. Wijffelman y J. W. Kijne. 1995. Genomic requirements of *Rhizobium* for nodulation of white clover hairy roots transformed with the pea lectin gene. Mol. Plant-Microbe Interac. 8:348-356.

Doberst R. C., B. T. Breil y E. W. Triplett. 1994. DNA sequence of the common nodulation genes of *Bradyrhizobium elkanii* and their phylogenetic relationship to those of other nodulating bacteria. Mol. Plant-Microbe Interac. 7: 564-572.

Dockendorff, T. C., J. Sanjuan, P. Grob y G. Stacey. 1994. NodA represses *nod* gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. Mol. Plant-Microbe Interac. 7:596-602.

Dowling, D. N. y W. J. Broughton. 1986. Competition for nodulation of legumes. Ann. Rev. Microbiol. 40:131-157.

Downie, J. A., A. E. Davies, J. M. Sutton, G. Dean, S. Ghelani, E. J. A. Lea, K. E. Wilson y J. L. Firmin. 1994. The roles of *nodX* and *nodO* in host specific nodulation of peas and vetch by *Rhizobium leguminosarum*. En: Kiss, G. B. y G. Endre (eds.). 1994. Proceedings of the 1st European Nitrogen Fixation Conference and the Workshop on "Safe Application of genetically modified microorganisms in the Environment". Officina Press, Szeged. pp. 54-58.

Downie, J. A. 1998. Functions of rhizobial nodulation genes. En: Spaink, H. P., A. Kondorosi y P. J.J. Hooykaas (eds.). 1998. The Rhizobiaceae. Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 387-402

Durbin, R. D. y P. J. Langston-Unkefer. 1988. The mechanisms for self-protection against bacterial phytotoxins. Ann. Rev. Phytopathol. 26:313-329.

Eggleston, G., M. C. Huber, R.-t. Liang, A. L. Karr y D. W. Emerich. 1996. *Bradyrhizobium japonicum* mutants deficient in exo- and capsular polysaccharides cause delayed infection and nodule initiation. Mol. Plant-Microbe Interac. 9:419-423.

Ehrhardt, D. W., E. M. Atkinson y S. R. Long. 1992. Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. Science 256:998-1000.

Ehrhardt, D. W., E. M. Atkinson, K. F. Faull, D. I. Freedberg, D. P. Sutherlin, R. Armstrong y S. R. Long. 1995. In vitro sulfotransferase activity of NodH, a nodulation protein of *Rhizobium meliloti* required for host-specific nodulation. J. Bacteriol. 177:6237-6245.

Ehrhardt, D. W., R. Wais y S. R. Long. 1996. Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. Cell 85:673-681.

Eisenschenk, L., R. Diebold, J. Perez-Lesher, A. C. Peterson, N. K. Peters y K. D. Noel. 1994. Inhibition of *Rhizobium etli* polysaccharide mutants by *Phaseolus vulgaris* root compounds. Appl. Environ. Microbiol. 60:3315-3322.

Fellay, R., M. Hanin, G. Montorzi, J. Frey, C. Freiberg, W. Golinowski, C. Staehelin, W. J. Broughton y S. Jabbouri. 1998. *nodD2* of *Rhizobium* sp. NGR234 is involved in the repression of the *nodABC* operon. Mol. Microbiol. 27:1039-1050.

Felle, H. H., É. Kondorosi, A. Kondorosi y M. Schultze. 1995. Nod signal-induced plasma membrane potential changes in alfalfa root hairs are differentially sensitive to structural modifications of the lipochitooligosaccharide. Plant J. 7:939-947.

Fernández-López, M., W. D'Haese, P. Mergaert, C. Verplancke, J.-C. Promé, M. Van Montagu y M. Holsters. 1996. Role of *nodI* and *nodJ* in lipo-chitooligosaccharide secretion in *Azorhizobium caulinodans* and *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 20:993-1000.

Finnie, C., G. Dean, A. E. Davies, K. E. Wilson y J. A. Downie. 1998. Analysis of the symbiotic role of proteins secreted by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. En: Elmerich, C., A. Kondorosi y W. E. Newton (eds.). 1998. Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp. 209-210.

Firmin, J. L., K. E. Wilson, R. W. Carlson, A. E. Davies y J. A. Downie. 1993. Resistance to nodulation of cv. Afghanistan peas is overcome by *nodX*, which mediates an O-acetylation of the *Rhizobium leguminosarum* lipo-oligosaccharide nodulation factor. Mol. Microbiol. 10:351-360.

Fisher, R. F. y S. R. Long. 1992. *Rhizobium*-plant signal exchange. Nature 357:655-659.

Fisher, R. F. y S. R. Long. 1993. Interactions of NodD at the *nod* box: NodD binds to two distinct sites on the same face of the helix and induces a bend in the DNA. J. Mol. Biol. 233:336-348.

Folch-Mallol, J. L., S. Marroquí, C. Sousa, H. Manyani, I. M. López-Lara, K. M. G. M. van der Drift, J. Haverkamp, C. Quinto, A. Gil-Serrano, J. Thomas-Oates, H. P. Spaink y M. Megías. 1996. Characterization of *Rhizobium tropici* CIAT899 Nodulation Factors: The role of *nodH* and *nodPQ* genes in their sulfation. Mol. Plant-Microbe Interac. 9:151-163.

Freiberg, C., R. Fellay, A. Bairoch, W. J. Broughton, A. Rosenthal y X. Perret. 1997. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. Nature 387:394-401.

Gagnon, H. y R. K. Ibrahim. 1998. Aldonic acids: a novel family of *nod* gene inducers of *Mesorhizobium loti*, *Rhizobium lupini*, and *Sinorhizobium meliloti*. Mol. Plant-Microbe Interact. 11:988-998.

Gao, M., W. D'Haese, P. Mergaert, M. Fernández-López, M. van Montagu, J.-C. Promé y M. Holsters. 1998. Structure-function relationship of Nod factors synthesised by *Azorhizobium caulinodans*. En: Elmerich, C., A. Kondorosi y W. E. Newton (eds.). 1998. Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. p. 250.

García, M., J. Dunlap, J. Loh y G. Stacey. 1996. Phenotypic characterization and regulation of the *nolA* gene of *Bradyrhizobium japonicum*. Mol. Plant-Microbe Interac. 9:625-635.

García-de los Santos, A. y S. Brom. 1997. Characterization of two plasmid-borne *lpsβ* loci of *Rhizobium etli* required for lipopolysaccharide synthesis and for optimal interactions with plants. Mol. Plant-Microbe Interac. 10:891-902.

Geelen, D., P. Mergaert, R. A. Geremia, S. Goormachtig, M. Van Montagu y M. Holsters. 1993. Identification of *nodSUIJ* genes in Nod locus 1 of *Azorhizobium caulinodans*: evidence that *nodS* encodes a methyltransferase involved in Nod factor modification. Mol. Microbiol. 9:145-154.

Geelen, D., B. Leyman, P. Mergaert, K. Klarskov, M. Van Montagu, R. A. Geremia y M. Holsters. 1995. NodS is an S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase that methylates chito-oligosaccharides deacetylated at the non-reducing end. Mol. Microbiol. 17:387-397.

Geiger, O., H. P. Spaik y E. P. Kennedy. 1991. Isolation of the *Rhizobium leguminosarum* NodF nodulation protein: NodF carries a 4'-phosphopantetheine prosthetic group. J. Bacteriol. 173:2872-2878.

Geremia, R. A., P. Mergaert, D. Geelen, M. Van Montagu y M. Holsters. 1994. The NodC protein of *Azorhizobium caulinodans* is an N-acetylglucosaminyltransferase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2669-2673.

Gil-Serrano, A. M., G. Franco-Rodríguez, P. Tejero-Mateo, J. Thomas-Oates, H. P. Spaik, J. E. Ruiz-Sainz, M. Megias y Y. Lamrabet. 1997. Structural determination of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals produced by *Rhizobium fredii* HH103. Carbohydr. Res. 303:435-443.

Girard, M. L., M. Flores, S. Brom, D. Romero, R. Palacios y G. Dávila. 1991. Structural complexity of the symbiotic plasmid of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli. J. Bacteriol. 173:2411-9

Girard, L., B. Valderrama, R. Palacios, D. Romero y G. Dávila. 1996. Transcriptional activity of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* is affected by different environmental conditions. Microbiology 142:2847-2856.

Göttfert, M., P. Grob y H. Hennecke. 1990. 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.

Gressent, F., S. Drouillard, N. Mantegazza, E. Samain, R. A. Geremia, H. Canut, A. Niebel, H. Driguez, R. Ranjeva, J. Cullimore y J. J. Bono. 1999. Ligand specificity of a high-affinity binding site for lipo-chito-oligosaccharidic nod factors in *Medicago* cell suspension cultures. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:4704-4709.

Guzmán, J., S. Moreno y G. Espín. 1993. *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*: A symbiotic or a pathogenic bacteria? A mutation in *glnT* makes the difference. En: Palacios, R., J. Mora y W. E. Newton. 1993. New Horizons in Nitrogen Fixation. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. p. 551.

Hanin M., S. Jabbouri, D. Quesada-Vincens, C. Freiberg, X. Perret, J.-C. Promé, W. J. Broughton y R. Fellay. 1997. Sulphation of *Rhizobium* sp. NGR234 Nod factors is dependent on *noeE*, a new host-specificity gene. Mol. Microbiol. 24:1119-1129.

Hanin, M., S. Jabbouri, W. J. Broughton y R. Fellay. 1998. SyrM1 of *Rhizobium* sp. NGR234 activates transcription of symbiotic loci and controls the level of sulfated Nod Factors. Mol. Plant-Microbe Interac. 11:343-350

Heidstra, R. y T. Bisseling. 1996. Nod factor-induced host responses and mechanisms of

Nod factor perception. New Phytol. 133:25-43.

Heidstra, R., W. C. Yang, Y. Yalcin, S. Peck, A. M. Emons, A. van Kammen y T. Bisseling. 1997a. Ethylene provides positional information on cortical cell division but is not involved in Nod factor-induced root hair tip growth in *Rhizobium*-legume interaction. Development 124:1781-1787.

Heidstra, R., G. Nilsen, F. Martinez-Abarca, A. van Kammen y T. Bisseling. 1997b. Nod factor-induced expression of leghemoglobin to study the mechanism of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  inhibition on root hair deformation. Mol. Plant-Microbe Interact. 10:215-220.

Hernández-Lucas, I., L. Segovia, E. Martinez-Romero y S. G. Pueppke. 1995. Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. Appl. Environ. Microbiol. 61:2775-2779.

Hernández-Mendoza, A., N. Nava, O. Santana y C. Quinto. 1998. ¿Participan los genes *nodT* de *Rhizobium etli* cepa CE3 en la secreción de los factores de nodulación?. En: Memorias del XXII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Mérida, Yucatán, México. 1-6 de noviembre, 1998. p 86.

Hirsch, A. M. 1992. Tansley review No. 40. Developmental biology of legume nodulation. New Phytol. 122:211-237.

Hirsch, A. M. y Y. Fang. 1994. Plant hormones and nodulation: what's the connection? Plant Mol. Biol. 26:5-9.

Hofmann, K. y W. Stoffel. 1993. TMbase-A database of membrane spanning protein segments. Biol. Chem. Hoppe-Seyler 347: 166.

Huguet, E. y U. Bonas. 1997. *hrpf* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* encodes an 87-kDa protein with homology to NolX of *Rhizobium fredii*. Mol. Plant-Microbe Interact. 10:488-498.

Jabbouri, S., R. Fellay, F. Talmont, P. Kamalaprija, U. Burger, B. Relic', J.-C. Promé y W. J. Broughton. 1995. Involvement of *nodS* in N-methylation and *nodU* in 6-O-Carbamoylation of *Rhizobium* sp. NGR234 *nod* factors. J. Biol. Chem. 270:22968-22973.

Jabbouri, S., B. Relic', M. Hanin, P. Kamalaprija, U. Burger, D. Promé, J.-C. Promé y W. J. Broughton. 1998. *noI* and *noE* (HsnIII) of *Rhizobium* sp. NGR234 are involved in 3-O-carbamoylation and 2-O-methylation of Nod factors. J. Biol. Chem. 273:12047-12055.

Johanson, C., C. Charon,, C. Sousa, C. Sauter, M. Crespi y A. Kondorosi. 1998. What is the role of *ENOD40* in nodulation? En: Elmerich, C., A. Kondorosi y W. E. Newton (eds.). 1998. Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. p. 261.

John, M., H. Röhrig, J. Schmidt, U. Wieneke y J. Schell. 1993. *Rhizobium* NodB protein involved in nodulation signal synthesis is a chitoooligosaccharide deacetylase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:625-629.

Kamst, E., K. M. G. M. van Der Drift, J. E. Thomas-Oates, B. J. J. Lugtenberg y H. P. Spauk. 1995. Mass spectrometric analysis of chitin oligosaccharides produced by *Rhizobium*



NodC protein in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 177:6282-6285.

Kamst, E., J. Pilling, L. M. Raamsdonk, B. J. J. Lugtenberg y H. P. Spaink. 1997. *Rhizobium* nodulation protein NodC is an important determinant of chitin oligosaccharide chain length in Nod Factor Biosynthesis. J. Bacteriol. 179:2103-2108.

Katzen, F., D. U. Ferreira, C. G. Oddo, M. V. Ielmini, A. Becker, A. Pühler y L. Ielpi. 1998. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. J. Bacteriol. 180:1607-1617.

Kijne, J. W. 1992. The *Rhizobium* infection process. En: Stacey, G., R. H. Burris y H. J. Evans (eds.). 1992. Biological nitrogen fixation. Chapman and Hall, New York, USA. pp. 349-398.

Kondorosi, E., M. Buiré, M. Cren, N. Iyer, B. Hoffman y A. Kondorosi. 1991. Involvement of the *syrM* and *nodD3* genes of *Rhizobium meliloti* in *nod* gene activation and in optimal nodulation of the host plant. Mol. Microbiol. 5:3035-3048.

Kondorosi, E., H. Trinh, F. Roudier, F. Foucher, D. Vaubert, A. Cebolla, A. Lodeiro, A. Fehér, Z. Kelemen, J. Györgyey, P. Mergaert, A. Kereszt, D. Dudits, H. Hirt y A. Kondorosi. 1998. Nod factor-induced cell cycle activation in root cortical cells. En: Elmerich, C., A. Kondorosi y W. E. Newton (eds.). 1998. Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp. 189-192.

Kovács, L.G., P. A. Balatti, H.B. Krishnan y S. G. Pueppke. 1995. Transcriptional organization and expression of *noIXWBTUV*, a locus that regulates cultivar-specific nodulation of soybean by *Rhizobium fredii* USDA257. Mol. Microbiol. 17:923-933.

Krishnan, H. B. y S. G. Pueppke. 1992. Inactivation of *nodC* conditions developmental abnormalities in nodulation of Peking soybean by *Rhizobium fredii* USDA257. Mol. Plant-Microbe Interact. 5:14-21.

Laeremans, T., I. Caluwaerts, C. Verreth, M. A. Rogel, J. Vanderleyden y E. Martínez-Romero. 1996. Isolation and characterization of *Rhizobium tropici* Nod factor sulfation genes. Mol. Plant-Microbe Interact. 9:492-500.

Lange, J., Z.-P. Xie, W. J. Broughton, R. Vögeli-Lange y T. Boller. 1999. A gene encoding a receptor-like protein kinase in the roots of common bean is differentially regulated in response to pathogens, symbionts and nodulation factors. Plant Sci. 142:133-145.

Lauson, C. G. R., B. G. Rolfe y M. A. Djordjeric. 1996. *Rhizobium* inoculation induces condition-dependent changes in the flavonoid composition of root exudates from *Trifolium subterraneum*. Aust. J. Plant. Physiol. 23:93-101.

Lerouge, P., P. Roche, C. Faucher, F. Maillat, G. Truchet, J.-C. Promé y J. Dénarié. 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated acylated glucosamine oligosaccharide signal. Nature 344:781-784.

Loh, J., M. Garcia y G. Stacey. 1997. NodV and NodW, a second flavonoid recognition system regulating *nod* gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. J. Bacteriol. 179:3013-3020.

Lohrke, S. M., B. Day, V. S. Kolli, R. Hancock, J. P. Yuen, M. L. de Souza, G. Stacey,

R. Carlson, Z. Tong, H. G. Hur, J. H. Orf y M. J. Sadowsky. 1998. The *Bradyrhizobium japonicum noeD* gene: a negatively acting, genotype-specific nodulation gene for soybean. Mol. Plant-Microbe Interact. 11:476-488.

López-Lara, I. M., J. D. J. van den Berg, J. E. Thomas-Oates, J. Glushka, B. J. J. Lugtenberg y H. P. Spaink. 1995a. Structural identification of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals of *Rhizobium loti*. Mol. Microbiol. 15:627-638.

López-Lara, I. M., K. M. van der Drift, A. A. van Brussel, J. Haverkamp, B. J. Lugtenberg, J. E. Thomas-Oates y H. P. Spaink. 1995b. Induction of nodule primordia on *Phaseolus* and *Acacia* by lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from broad-host-range *Rhizobium* strain GRH2. Plant Mol. Biol. 29:465-477.

López-Lara, I. M., L. Blok-Tip, C. Quinto, M. L. García, G. Stacey, G. V. Bloemberg, G. E. M. Lamers, B. J. J. Lugtenberg, J. E. Thomas-Oates y H. P. Spaink. 1996. NodZ of *Bradyrhizobium* extends the nodulation host range of *Rhizobium* by adding a fucosyl residue to nodulation signals. Mol. Microbiol. 21:397-408.

Lorquin, J., G. Lortet, M. Ferro, N. Méar, B. Dreyfus, J.-C. Promé y C. Boivin. 1997a. Nod factors from *Sinorhizobium saheli* and *S. teranga* bv. *sesbaniae* are both arabinosylated and fucosylated, a structural feature specific to *Sesbania rostrata* symbionts. Mol. Plant-Microbe Interac. 10:879-890.

Lorquin, J., G. Lortet, M. Ferro, N. Méar, J.-C. Promé y C. Boivin. 1997b. *Sinorhizobium teranga* bv. *acaciae* ORS1073 and *Rhizobium* sp. strain ORS1001, two distantly related *Acacia*-nodulating strains, produce similar Nod factors that are O carbamoylated, N methylated, and mainly sulfated. J. Bacteriol. 179:3079-3083.

Lugtenberg, B. J. J. 1992. Regulation of nodulation in *Rhizobium leguminosarum*. World J. Microbiol. Biotech. 8 (supplement 1):120-123.

Luka, S., J. Sanjuan, R. W. Carlson y G. Stacey. 1993. *nolMNO* genes of *Bradyrhizobium japonicum* are co-transcribed with *nodYABCSUIJ*, and *nolO* is involved in the synthesis of the lipo-oligosaccharide nodulation signals. J. Biol. Chem. 268:27053-27059.

Martínez, E., D. Romero y R. Palacios. 1990. The *Rhizobium* genome. Crit. Rev. Plant Sci. 9:59-93.

Mathesius, U., H. R. M. Schlaman, H. P. Spaink, C. Sautter, B. G. Rolfe y M. A. Djordjevic. 1998. Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides. Plant J. 14:23-34.

McIver, J., M. A. Djordjevic, J. J. Weinman y B. G. Rolfe. 1993. Influence of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* host specific nodulation genes on the ontogeny of clover nodulation. Protoplasma 172:166-179.

Megias, M., C. Sousa, M. J. Romero, P. Boloix y J. L. Folch. 1993. *Rhizobium meliloti nodEFG* and *nodH* genes confer host range extension to alfalfa when introduced to *R. leguminosarum* bv. *trifolii* RS1051. En: Palacios, R., J. Mora y W. E. Newton. 1993. New Horizons in Nitrogen Fixation. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. p 243.

Meikle, P. J., A. M. Whittle y J. J. Hopwood. 1995. Human acetyl-coenzyme A:  $\alpha$ -glucosaminide *N*-acetyltransferase. Kinetic characterization and mechanistic interpretation.

Meinhardt, L. W., H. B. Krishnan, P. A. Balatii y S. G. Pueppke. 1993. Molecular cloning and characterization of a sym plasmid locus that regulates cultivar-specific nodulation of soybean by *Rhizobium fredii* USDA2557. Mol. Microbiol. 9:17-29.

Mergaert, P., M. Van Montagu, J.-C. Promé y M. Holsters. 1993. Three unusual modifications, a D-arabinosyl, an N-methyl, and a carbamoyl group, are present on the Nod factors of *Azorhizobium caulinodans* strain ORS571. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:1551-1555.

Mergaert, P., W. D'Haese, D. Geelen, D. Promé, M. Van Montagu, R. Geremia, J.-C. Promé y M. Holsters. 1995. Biosynthesis of *Azorhizobium caulinodans* Nod Factors. Study of the activity of the NodABC proteins by expression of the genes in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 270:29217-29223.

Mergaert, P., W. D'Haese, M. Fernández-López, D. Geelen, K. Goethals, J.-C. Promé, M. Van Montagu y M. Holsters. 1996. Fucosylation and arabinosylation of Nod factors in *Azorhizobium caulinodans*: involvement of *nolK*, *nodZ* as well as *noeC* and/or downstream genes. Mol. Microbiol. 21:409-419.

Mergaert, P., M. Ferro, W. D'Haese, M. Van Montagu, M. Holsters y J.-C. Promé. 1997a. Nod factors of *Azorhizobium caulinodans* strain ORS51 can be glycosylated with and arabinosyl group, a fucosyl group, or both. Mol. Plant-Microbe Interac. 10:683-687.

Mergaert, P., M. Van Montagu y M. Holsters. 1997b. The nodulation gene *nolK* of *Azorhizobium caulinodans* is involved in the formation of GDP-fucose from GDP-mannose. FEBS Lett. 409:312-316.

Meskiene, I., W.-C. Yang, C. de Blank, L. Bögre, K. Zwerger, M. Brandstätter, M. Mattauch, Ton Bisseling y H. Hirt. 1997. En: Legocki, A., H. Bothe y A. Pühler (eds.). 1997. Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture. Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 63-65.

Niebel, A., J.-J. Bono, R. Ranjeva y J. V. Cullimore. 1997. Identification of a high-affinity binding site for lipooligosaccharidic NodRm factors in the microsomal fraction of *Medicago* cell suspension cultures. Mol. Plant-Microbe Interac. 10:132-134.

Niehaus, K., U. Albus, R. Baier, K. Schiene, S. Schöder y A. Pühler. 1998a. Symbiotic suppression of the *Medicago sativa* plant defence system by *Rhizobium meliloti* oligosaccharides. En: Elmerich, C., A. Kondorosi y W. E. Newton (eds.). 1998. Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 225-226.

Niehaus, K., A. Lagares y A. Pühler. 1998b. A *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharide mutant induces effective nodules on the host plant *Medicago sativa* (Alfalfa) but fails to establish a symbiosis with *Medicago truncatula*. Mol. Plant-Microbe Interact. 11:906-14.

Noel, K. D., A. Sánchez, L. Fernández, J. Leemans y M. A. Cevallos. 1984. *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. J. Bacteriol. 158:148-155.

Noel, T. C., C. Sheng, C. K. Yost, R. P. Pharis y M. F. Hynes. 1996. *Rhizobium leguminosarum* as plant growth-promoting rhizobacterium: direct growth promotion of canola and lettuce. Can. J. Microbiol. 42:276-283.

O'Connell, K. P. y J. Handelsman. 1993. Foliar chlorosis in symbiotic host and nonhost plants induced by *Rhizobium tropici* type B strains. Appl. Environ. Microbiol. 59:2184-2189.

O'Connell, K. P., S. J. Raffel, B. J. Saville y J. Handelsman. 1998. Mutants of *Rhizobium tropici* strain CIAT899 that do not induce chlorosis in plants. Microbiology 144:2607-2617.

Ogawa, J. y S. R. Long. 1995. The *Rhizobium meliloti groELc* locus is required for regulation of early *nod* genes by the transcription activator NodD. Genes Dev. 9:714-729.

Olsthoorn, M. M. A., I. M. López-Lara, B. O. Petersen, K. Bock, J. Haverkamp, H. P. Spaink y J. E. Thomas-Oates. 1998. Novel branched nod factor structure results from  $\alpha$ -(1-->3) fucosyl transferase activity: the major lipo-chitin oligosaccharides from *Mesorhizobium loti* strain NZP2213 bear an  $\alpha$ -(1-->3) fucosyl substituent on a nonterminal backbone residue. Biochemistry 37:9024-9032

Orgambide, G. G., J. Lee, R. I. Hollingsworth y F. B. Dazzo. 1995. Structurally diverse chitolipooligosaccharide nod factors accumulate primarily in membranes of wild type *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. Biochemistry 34:3832-3840.

Philip-Hollingsworth, S., F. B. Dazzo y R. I. Hollingsworth. 1997. Structural requirements of *Rhizobium* chitolipooligosaccharides for uptake and bioactivity in legume roots as revealed by synthetic analogs and fluorescent probes. J. Lipid Res. 38:1229-1241.

Pingret, J.-L., E.-P. Journet y D. Barker. 1998. *Rhizobium* Nod factor signaling: Evidence for a G protein-mediated transduction mechanism. Plant Cell 10: 659-671.

Plazenet, C., G. Réfrégier, N. Demont, G. Truchet y C. Rosenberg. 1995. The *Rhizobium meliloti* region located downstream of the *nod*-box *nod*6 is involved in the specific nodulation of *Medicago lupulina*. FEMS Microbiol. Lett. 133:285-291.

Poupot, R., E. Martínez-Romero y J.-C. Promé. 1993. Nodulation factors from *Rhizobium tropici* are sulfated or nonsulfated chitopentasaccharides containing an *N*-methyl-*N*-acylglucosaminyl terminus. Biochemistry 32:10430-10435.

Poupot, R., E. Martínez-Romero, N. Gautier y J.-C. Promé. 1995. Wild Type *Rhizobium etli*, a bean symbiont, produces acetyl-fucosylated, *N*-methylated, and carbamoylated nodulation factors. J. Biol. Chem. 270:6050-6055.

Preston, G. M., B. Haubold y P. B. Rainey. 1998. Bacterial genomics and adaptation to life on plants: implications for the evolution of pathogenicity and symbiosis. Curr. Op. Microbiol. 1:589-597.

Price, N. P. J., B. Rélic, F. Talmont, A. Lewin, D. Promé, S. G. Pueppke, F. Maillet, J. Denarié, J.-C. Promé y W. J. Broughton. 1992. Broad-host-range *Rhizobium* species strain NGR234 secretes a family of carbamoylated, and fucosylated, nodulation signals that are *O*-acetylated or sulphated. Mol. Microbiol. 6:3575-3584.

Promé, J.-C., G. P. Yang, M. Ferro, A. Savagnac, F. Maillet, F. Debellé. D. Promé, M. Treilhou, O. Schiltz y J. Dénarié. 1998. Diversity of Nod factors from bacteria nodulating legumes in the galegae tribe: *Rhizobium huakii* and *Rhizobium galegae*. En: Proceedings of the 16th North American Congress on Symbiotic Nitrogen Fixation. Cancún, México. 1-6 de febrero, 1998. resumen III.12.

Pueppke, S. G. 1996. The Genetic and Biochemical basis of nodulation of legumes by Rhizobia. Crit. Rev. Biotech. 16:1-51.

Pueppke, S. G., M. C. Bolaños-Vásquez, D. Werner, M.-P. Bec-Ferté, J.-C. Promé y H. B. Krishnan. 1998. Release of flavonoids by the soybean cultivars McCall and Peking and their perception as signals by the nitrogen-fixing symbiont *Sinorhizobium fredii*. Plant Physiol. 117: 599-608.

Pühler, A. 1998. Signalling processes in root nodule organogenesis: introductory remarks. En: Elmerich, C., A. Kondorosi y W. E. Newton (eds.). 1998. Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp. 183-184.

Quesada-Vincens, D., R. Fellay, T. Nasim, V. Viprey, U. Burger, J.-C. Promé, W. J. Broughton y S. Jabbouri. 1997. *Rhizobium* sp. strain NGR234 NodZ protein is a fucosyltransferase. J. Bacteriol. 176:5087-5093.

Quesada-Vincens, D., M. Hanin, W. J. Broughton y S. Jabbouri. 1998. *In vitro* sulfotransferase activity of NoeE, a nodulation protein of *Rhizobium* sp. NGR234. Mol. Plant-Microbe Interact. 11:592-600.

Quinto, C., H. de la Vega, M. Flores, L. fernández, T. Ballado, G. Soberón y R. Palacios. 1982. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli*. Nature 299:724-726.

Quinto, C., A. H. M. Wijfjes, G. V. Bloemberg, L. Blok-Tip, I. M. López-Lara, B. J. J. Lugtenberg, J. E. Thomas-Oates y H. P. Spaink. 1997. Bacterial nodulation protein NodZ is a chitin oligosaccharide fucosyltransferase which can also recognize related substrates of animal origin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4336-4341.

Relic', B., F. Talmont, J. Kopcinska, W. Golinowski, J.-C. Promé y W. J. Broughton. 1993. Biological activity of *Rhizobium* sp. NGR234 Nod-factors on *Macropodium atropurpureum*. Mol. Plant-Microbe Interac. 6:764-774.

Relic', B., X. Perret, M. T. Estrada-García, J. Kopcinska, W. Golinowski, H. B. Krishnan, S. G. Pueppke y W. J. Broughton. 1994. Nod factors of *Rhizobium* are a key to the legume door. Mol. Microbiol. 13:171-178.

Ritsema, T., O. Geiger, P. van Dillewijn, B. J. Lugtenberg y H. P. Spaink. 1994. Serine residue 45 of nodulation protein NodF from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* is essential for its biological function. J. Bacteriol. 176:7740-7743.

Ritsema, T., A. H. Wijfjes, B. J. Lugtenberg y H. P. Spaink. 1996. *Rhizobium* nodulation protein NodA is a host-specific determinant of the transfer of fatty acids in Nod factor biosynthesis. Mol. Gen. Genet. 251:44-51.

Rivilla, R., J. M. Sutton y J. A. Downie. 1995. *Rhizobium leguminosarum* NodT is related to a family of outer-membrane transport proteins that includes TolC, PrtF, CyaE, and AprF. Gene 161:27-31.

Roche, P., P. Lerouge, C. Ponthus y J.-C. Promé. 1991a. Structural determination of bacterial nodulation factors involved in the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis. J. Biol. Chem. 266:10933-10940.

Roche, P., F. Debellé, F. Maillet, P. Lerouge, C. Faucher, G. Truchet, J. Dénarié y J.-C-

Promé. 1991b. Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti*: *nodH* and *nodPQ* genes encode the sulfation of lipooligosaccharide signals. Cell **67**:1131-1143.

Röhrig, H., J. Schmidt, R. Walden, I. Czaja, E. Miklasevics, U. Wieneke, J. Schell y M. John. 1995. Growth of tobacco protoplasts stimulated by synthetic lipo-chitoooligosaccharides. Science **269**:841-843.

Rosas, S., R. Soria, N. Correa y G. Abdala. 1998. Jasmonic acid stimulates the expression of *nod* genes in *Rhizobium*. Plant Mol. Biol. **38**:1161-1168.

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.

Saier, M. H. Jr., R. Tam, A. Reizer y J. Reizer. 1994. Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. Mol. Microbiol. **11**:841-847.

Sanjuan, J., R. W. Carlson, H. P. Spaink, U. R. Bhat, W. M. Barbour, J. Glushka y G. Stacey. 1992. A 2-*O*-methylfucose moiety is present in the lipo-oligosaccharide nodulation signal of *Bradyrhizobium japonicum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**:8789-8793.

Sanjuan, J., P. Grob, M. Göttfer, H. Hennecke y G. Stacey. 1994. NodW is essential for full expression of the common nodulation genes in *Bradyrhizobium japonicum*. Mol. Plant-Microbe Interac. **7**:364-369.

Scott, K. F. 1986. Conserved nodulation genes from the non-legume symbiont *Bradyrhizobium* sp. (*Parasponia*). Nucleic Acids Res. **14**:2905-2919.

Scott, D. B., C. A. Young, J. M. Collins-Emerson, E. A. Terzaghi, E. S. Rockman, P. A. Lewis y C. E. Pankhurst. 1996. Novel and complex chromosomal arrangement of *Rhizobium loti* nodulation genes. Mol. Plant-Microbe Interac. **9**:187-197.

Schell, J., J. Schmidt, M. John y H. Röhrig. 1998. Lipo-chitoooligosaccharides (LCO's) as growth hormones. En: Elmerich, C., A. Kondorosi y W. E. Newton (eds.). 1998. Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp. 3-5.

Schlaman, H. R., R. J. H. Okker y B. J. J. Lugtenberg. 1992. Regulation of nodulation gene expression by NodD in Rhizobia. J. Bacteriol. **174**:5177-5182.

Schlaman, H. R., A. A. Gisel, N. E. Quaedvlieg, G. V. Bloemberg, B. J. Lugtenberg, J. W. Kijne, I. Potrykus, H. P. Spaink y C. Sautter. 1997. Chitin oligosaccharides can induce cortical cell division in roots of *Vicia sativa* when delivered by ballistic microtargeting. Development **124**:4887-4895.

Schultze, M., É. Kondorosi, P. Ratet, M. Buiré y A. Kondorosi. 1994. Cell and molecular biology of *Rhizobium*-plant interactions. Int. Rev. Cyt. **156**:1-75.

Schultze, M. y A. Kondorosi. 1998. Regulation of symbiotic root nodule development. Ann. Rev. Genet. **32**:33-57.

Schwedock, J. y S. R. Long. 1990. ATP sulphurylase activity of the *nodP* and *nodQ* gene

products of *Rhizobium meliloti*. Nature 348:644-647.

Schwedock, J. S. y S. R. Long. 1992. *Rhizobium meliloti* genes involved in sulfate activation: the two copies of *nodPQ* and a new locus, *ssa*. Genetics 132:899-909.

Segovia, L., J. P. W. Young, E. Martínez-Romero. 1993. Reclassification of american *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 43:374-377.

Semino, C. E. y P. W. Robbins. 1995. Synthesis of "Nod"-like chitin oligosaccharides by the *Xenopus* developmental protein DG42. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:3498-3501.

Semino, C. E., C. A. Specht, A. Raimondi y P. W. Robbins. 1996. Homologs of the *Xenopus* developmental gene *DG42* are present in zebrafish and mouse and are involved in the synthesis of Nod-like chitin oligosaccharides during early embryogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:4548-4553.

Shibuya, N., H. Kaku, K. Kuchitsu y M. Maliarik. 1993. Identification of a novel high-affinity binding site for N-acetylchitoooligosaccharide elicitor in the membrane fraction from suspension-cultured rice cells. FEBS 329:75-78.

Smit, G., V. Puvanesarajah, R. W. Carlson, W. M. Barbour y G. Stacey. 1992. *Bradyrhizobium japonicum nodD1* can be specifically induced by soybean flavonoids that do not induce the *nodYABCSUIJ* operon. J. Biol. Chem. 267:310-318.

Smit, G., C. C. de Koster, J. Schripsema, H. P. Spaink, A. A. van Brussel y J. W. Kijne. 1995. Uridine, a cell division factor in pea roots. Plant Mol. Biol. 29:869-873.

Smith, D. R., K. Boundy-Mills y M. J. Sadowsky. 1998. The *Rhizobium fredii noeF* gene is involved in competition for nodulation of soybean and affects nodule initiation. En: Proceedings of the 16th North American Congress on Symbiotic Nitrogen Fixation. Cancún, México. 1-6 de febrero, 1998. resumen III.14.

Sola-Landa, A., J. Pizarro-Cerdá, M.-J. Grilló, E. Moreno, I. Moriyón, J.-M. Blasco, J.-P. Gorvel e I. López-Goñi. 1998. A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. Mol. Microbiol. 29:125-138.

Spaink, H.P., J. Weinman, M. A. Djordjevic, C. A. Wijffelman, R. J. Okker y B. J. Lugtenberg. 1989. Genetic analysis and cellular localization of the *Rhizobium* host specificity-determining NodE protein. EMBO J. 8:2811-2818

Spaink, H. P., D. M. Sheeley, A. A. N. van Brussel, J. Glushka, W. S. York, T. Tak, O. Geiger, E. P. Kennedy, V. N. Reinhold y B.J.J. Lugtenberg. 1991. A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. Nature 354:125-130.

Spaink, H. P., A. Aarts, G. Stacey, G. V. Bloemberg, B. J. J. Lugtenberg y E. P. Kennedy. 1992. Detection and separation of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* Nod metabolites using thin-layer chromatography. Mol. Plant-Microbe Interac. 5:71-80.

Spaink, H. P., A. H. M. Wijffjes y B. J. J. Lugtenberg. 1995. *Rhizobium* NodI and NodJ proteins play a role in the efficiency of secretion of lipochitin oligosaccharides. J. Bacteriol.

Sprent, J. y P. Sprent. 1990. Nitrogen fixing organisms. Pure and applied aspects. Chapman and Hall, USA.

Stacey, G. 1998. Plant-microbe signaling in the *Bradyrhizobium*-soybean symbiosis. En: Proceedings of the 16th North American Congress on Symbiotic Nitrogen Fixation. Cancún, México. 1-6 de febrero, 1998. resumen III.02.

Stacey, G., S. Luka, J. Sanjuan, Z. Banfalvi, A. J. Nieuwkoop, J. Y. Chun, L. S. Forsberg y R. Carlson. 1994. *nodZ*, a unique host-specific nodulation gene, is involved in the fucosylation of the lipooligosaccharide nodulation signal of *Bradyrhizobium japonicum*. J. Bacteriol. 176:620-633.

Stahelin, C., J. Granado, J. Müller, A. Wiemken, R. B. Mellor, G. Felix, M. Regenass, W.J. Broughton y T. Boller. 1994. Perception of *Rhizobium* nodulation factors by tomato cells and inactivation by root chitinases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2196-2200.

Stahelin, C., M. Schultze, É. Kondorosi y Á. Kondorosi. 1995. Lipochitooligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium meliloti* induce their rapid degradation by the host plant alfalfa. Plant Physiol. 108:1607-1614.

Stahelin, C., M. Vanney, F. Foucher, É. Kondorosi, M. Schultze y Á. Kondorosi. 1997. Degradation of nodulation signals from *Rhizobium meliloti* by its host plant. En: Legocki, A., H. Bothe y A. Pühler (eds.). 1997. Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture. Springer-Verlag, Heidelberg. pp. 43-46.

Stokkermans, T. J. W., S. Ikeshita, J. Cohn, R. W. Carlson, G. Stacey, T. Ogawa y N. K. Peters. 1995. Structural requirements of synthetic and natural lipo-chitin oligosaccharides for induction of nodule primordia on *Glycine soja*. Plant Physiol. 108:1587-1595.

Stokkermans, T. J. W., R. Orlando, V. S. K. Kolli, R. W. Carlson y N. K. Peters. 1996. Biological activities and structures of *Bradyrhizobium elkanii* low-abundance lipo chitin-oligosaccharides. Mol. Plant-Microbe Interac. 9:298-304.

Stultz, C. M., J. V. White y T. F. Smith. 1993. Structural analysis based on state-space modeling. Prot. Sci. 2:305-314.

Swanson, J. A., J. T. Mulligan y S. R. Long. 1993. Regulation of *syrm* and *nodD3* in *Rhizobium meliloti*. Genetics 134:435-444.

Timmers, A. C., M. C. Auriac, F. de Billy y G. Truchet. 1998. Nod factor internalization and microtubular cytoskeleton changes occur concomitantly during nodule differentiation in alfalfa. Development 125:339-349.

Triplett, E. W. y M. J. Sadowsky. 1992. Genetics of competition for nodulation of legumes. Annu. Rev. Microbiol. 46:399-428.

Udvardi M. K. y D. A. Day. 1997. Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48:493-523.

Van Brussel, A. A. N., R. Bakhuizen, P. C. van Spronsen, H. P. Spaink, T. Tak, B. J. J. Lugtenberg y J. W. Kijne. 1992. Induction of pre-infection thread structures in the leguminous



host plant by mitogenic lipo-oligosaccharides of *Rhizobium*. Science 257:70-72.

Van der Drift, K. M. G. M., H. P. Spaink, G. V. Bloemberg, A. A. N. van Brussel, B. J. J. Lugtenberg, J. Haverkamp y J. E. Thomas-Oates. 1996. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* produces lipo-chitin oligosaccharides with *nodE*-dependent highly unsaturated fatty acyl moieties. J. Biol. Chem. 271:22563-22569.

Van Rhijn, P., J. Desair, K. Vlassak y J. Vanderleyden. 1994. The NodD proteins of *Rhizobium* sp. strain BR816 differ in their interaction with coinducers and in their activities for nodulation of different host plants. Appl. Environ. Microbiol. 60:3615-3623 .

Van Rhijn, P. y J. Vanderleyden. 1995. The *Rhizobium*-plant symbiosis. Microbiol. Rev. 59:124-142.

Van Workum, W. A. T., S. van Slageren, A. A. N. Van Brussel y J. W. Kijne. 1998. Role of exopolysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* as host plant-specific molecules required for infection thread formation during nodulation of *Vicia sativa*. Mol. Plant-microbe Interac. 11:1233-1242.

Vasse, J., F. de Billy, S. Camut y G. Truchet. 1990. Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. J. Bacteriol. 172:4295-4306.

Vázquez, M., A. Dávalos, A. de las Peñas, F. Sanchez y C. Quinto. 1991. Novel organization of the common nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* strains. J. Bacteriol. 173:1250-1258.

Vázquez, M., O. Santana y C. Quinto. 1993. The NodI and NodJ proteins from *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* strains are similar to capsular polysaccharide secretion proteins from Gram-negative bacteria. Mol. Microbiol. 8:369-377.

Vijn, I., L. das Neves, A. van Kammen, H. Franssen y T. Bisseling. 1993. Nod factors and nodulation in plants. Science 260:1764-1765.

Villalobos, M. A., N. Nava, M. Vázquez y C. Quinto. 1994. Nucleotide sequence of the *Rhizobium etli nodS* gene. Gene 150:201-202.

Vinuesa, P., A. K. Maly y D. Werner. 1998. Identification of *noeJ* and *nolK* genes in *Rhizobium etli* Kim5s: analysis of their regulation and role in LCO-synthesis. Proceedings of the 16th North American Congress on Symbiotic Nitrogen Fixation. Cancún, México. 1-6 de febrero, 1998. III.17.

Werner, D. 1992. Physiology of nitrogen fixing-legume nodules. En: Stacey, G., R. H. Burris y H. J. Evans (eds.). 1992. Biological nitrogen fixation. Chapman and Hall, New York, USA. pp 399-431.

White, J. V., C. M. Stultz y T. F. Smith. 1994. Protein classification by stochastic modeling and optimal filtering of amino-acid sequences. Math. Biosci. 119:35-75.

York, G., H.-P. Cheng, B. Pellock, L. Lecour, G. Campbell y G. Walker. 1998. Role of exopolysaccharides in nodule invasion by *Rhizobium meliloti*. En: Elmerich, C., A. Kondorosi y W. E. Newton (eds.). 1998. Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp. 193-198.

## ÍNDICE.

	Pag.
Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
-Formación de nódulos.....	5
-Los factores de nodulación.....	11
-Los factores de nodulación como determinantes de la infección.....	21
-Otros genes involucrados en la nodulación.....	21
-Los factores de nodulación como reguladores del desarrollo.....	24
-Moléculas que se han relacionado con los factores de nodulación.....	26
Antecedentes específicos y objetivos .....	28
-Los factores de nodulación de <i>R. etli</i> CE3 y los genes <i>nod</i> involucrados en su producción y secreción .....	30
Resultados:.....	32
Artículo:“The <i>nolL</i> gene from <i>Rhizobium etli</i> determines nodulation efficiency by mediating the acetylation of the fucosyl residue in the nodulation factor. Corvera, A., D. Promé, J.-C. Promé, E. Martínez-Romero y D. Romero. 1999. <u>Mol. Plant-Microbe Interac.</u> 12:236-246”.	
-Resultados adicionales .....	44
Discusión y perspectivas.....	46
-NolL como una proteína transmembranal necesaria para la acetilación del factor de nodulación.....	46
- <i>nolL</i> y su expresión.....	50
-Cinética de síntesis de los factores de nodulación de <i>Rhizobium etli</i> CE3 y su secreción al medio..	51
-NolL y la competencia por la nodulación.....	53
-Los factores de nodulación y la respuesta de la planta.....	53
Conclusiones .....	57
Literatura citada .....	58