

R. 10551

T 831

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
BIBLIOTECA GENERAL

74 número 80 del libro

27 MAR 1994

Jefe del Negociado de Farmacia

J. L. Folch

Estudio de los Genes de Nodulación y la
Síntesis de Lipo-oligosacáridos en
Rhizobium tropici CIAT899.

Memoria que presenta el
Licenciado en
Investigación Biomédica
Básica JORGE LUIS FOLCH
MALLOL, para aspirar al
grado de Doctor en
Farmacia por la
Universidad de Sevilla.

Folch

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Memoria realizada en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla que presenta EL Licenciado JORGE LUIS FOLCH MALLOL, para optar al grado de Doctor.

El Director

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Megías Guijo', enclosed within a hand-drawn oval. A horizontal line extends from the right side of the oval.

Fdo. Manuel Megías Guijo

Don Manuel Megías Guijo, profesor titular del del
Departamento de Microbiología y Parasitología de la
Universidad de Sevilla,

Certifico: Que la Tesis de Doctorado titulada:" Estudio de los
Genes de Nodulación y la Síntesis de Lipo-oligosacáridos en
Rhizobium tropici CIAT899", presentada por Don JORGE
LUIS FOLCH MALLOL para optar por el grado de Doctor, ha
sido realizada en el Departamento de Microbiología y
Parasitología de la Universidad de Sevilla bajo mi dirección
y reuniendo los requisitos exigidos,

Y para que así conste, expido el presente certificado
en Sevilla, a 20 de mayo de mil novecientos noventa y
cuatro


A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Megías', with a long horizontal line extending to the right.

Fdo.: Dr. Manuel Megías guijo

Don DIEGO GUEVARA BENITEZ, CATEDRATICO Y DIRECTOR
DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA
DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Certifico: Que la Tesis de Doctorado titulada:" Estudio de los Genes de Nodulación y la Síntesis de Lipo-oligosacáridos en *Rhizobium tropici* CIAT899", presentada por Don JORGE LUIS FOLCH MALLOL para optar por el grado de Doctor, ha sido realizada en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Sevilla bajo la dirección del Dr. D. Manuel Megías Guijo.

Y para que así conste, expido el presente certificado en Sevilla, a 20 de mayo de mil novecientos noventa y cuatro.

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke extending to the right.

Fdo.: Dr. Diego Guevara Benitez

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS USADOS EN ESTA TESIS

A	AvaI
Amp	Ampicilina
B	<i>Bam</i> HI
Bg	<i>Bg</i> III
BSA	Albúmina bovina
bv.	Biovariedad
bvs.	Biovariedades
<i>chv</i>	Genes involucrados en la síntesis y exportación de β -(1,2) glucanos en <i>Agrobacterium</i> .
Cm	Cloramfenicol
col.	Colaboradores
cos	Sitio cos del fago lambda
c.s.p.	Cantidad suficiente para
<i>dct</i>	Genes responsables del transporte de los ácidos dicarboxílicos.
D.O.	Densidad óptica
E	<i>Eco</i> RI
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPS	Polisacárido extracelular
FITA	Activación de la transcripción independiente de flavonoides
Fix ⁺	Fenotipo fijador de nitrógeno
Fix ⁻	Fenotipo no fijador de nitrógeno

<i>fix</i>	Genes de la fijación de nitrógeno no homólogos a los de <i>Klebsiella pneumoniae</i>
Gm	Gentamicina
H	<i>HindIII</i>
Hadulinas	Por "hair deformation specific proteins"
Ini	Liberación de flavonoides por las raíces en respuesta a la activación por la molécula señal
Inf-	Incapaces de llevar a cabo el proceso de infección
K	<i>KpnI</i>
Km	Kanamicina
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltons
log	Logarítmica
LPS	Lipopolisacárido
<i>lps</i>	Genes implicados en la síntesis de lipopolisacárido
Mdal	Megadaltons
ml	Mililitros
N	Normalidad
Nal	Acido nalidíxico
<i>ndv</i>	Genes involucrados en la síntesis y exportación de β -(1,2) glucanos en <i>Rhizobium</i> .
Nif	Proteínas codificadas por los genes <i>nif</i>
<i>nif</i>	Genes de la fijación de nitrógeno
nm	Nanómetro
Nod	Proteínas codificada por los genes <i>nod</i>
Nod+	Fenotipo nodulante
Nod-	Fenotipo no nodulante

<i>nod</i>	Genes de la nodulación
<i>nod::lac</i>	Fusión transcripcional del gen <i>nodA</i> con el gen <i>lacZ</i>
ori	Origen de replicación IncQ
oriT	Origen de transferencia
oriV	Origen de replicación IncP
P	<i>Pst</i> I
pb	Pares de bases
PHB	Poli-β-hidroxibutirato
pSym	Plásmido simbiótico
PVP	Polivinil pirrolidona
Rif	Rifampicina
rpm	Revoluciones por minuto
S	<i>Sa</i> II
SDS	Dodecil sulfato sódico
Sm	<i>Sma</i> I
sp.	Especies
Spc	Espectinomicina
ssp.	Subespecie
Str	Estreptomicina
Tc	Tetraciclina
X	<i>Xho</i> I
³² P-dCTP	Desoxicitosina 5' (α ³² P) trifosfato
%p/v	Gramos por cada 100 ml
mCi	Microcuries
ml	Microlitros
mg	Microgramos
l	ADN del fago lambda digerido con <i>Hind</i> III

ÍNDICE

INDICE

	<u>Página</u>
I. INTRODUCCION.....	1
a)Regulación de la Fijación de Nitrógeno.....	3
b)La Simbiosis <i>Rhizobiaceae</i> -Leguminosa.....	8
c) Los Genes de Nodulación y la Síntesis de Lipo-oligosacáridos.....	13
d) La Función de los Genes de Noidulación.....	19
e) El gen <i>nodD</i> y la regulación de los genes de noidulación.....	19
f) Los Genes <i>nod</i> comunes y su Función Bioquímica.....	23
g) Función Bioquímica de los Genes <i>nod</i> específicos.....	24
II.- OBJETIVOS.....	30
III.- MATERIAL Y METODOS.....	32
1) Bacterias y Plásmidos.....	33
2) Medios y Condiciones de Cultivo.....	36
3) Antimicrobianos y Productos Químicos Añadidos a los Medios de Cultivo.....	38
4) Enzimas, Isótopos y Kit.....	39
5) Medios para Plantas.....	39

	<u>Página</u>
6) Electroforesis en Geles de Agarosa.....	40
7) Recuperación de ADN a partir de los Geles.....	41
8) Extracción y Purificación de ADN.....	41
8.1.- ADN Total.....	41
8.2.-ADN Plasmídico.....	41
8.2.1.- Plásmidos de <i>E. coli</i>	41
8.2.2.- Plásmidos de <i>Rhizobium</i> de bajo Peso Molecular.....	42
9) Marcaje Radioactivo de Sondas de ADN.....	42
10) Hibridaciones de ADN.....	43
10.1.-Preparación de Membranas.....	43
10.2.- Prehibridación	43
10.3.- Hibridación	44
10.4.- Lavado de las Membranas	44
10.5.- Exposición de las Membranas	44
11) Técnicas de Transferencia de ADN	44
11.1.- Conjugación	44
11.1.1 Conjugación en Filtro	44
11.1.2.- Conjugación en Placa	45
11.2.- Transrformación	45
12) Ensayos de Nodulación	45
13) Preparación de Exudados de Raiz de <i>Phaseolus vulgaris</i> y <i>Leucaena esculenta</i>	46
14) Determinación de la Actividad de β -Galactosidasa	47
15) Análisis por Cromatografía en Capa Fina	47

	<u>Página</u>
16) Análisis por HPLC de los Factores de Nodulación	48
17) Análisis de los Factores de Nodulación por Espectrometría de Masas	49
IV. RESULTADOS	50
a) Localización Física de los Genes de Nodulación de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899	51
b) Actividad Inductora de la Proteína NodD	59
c) Extensión del Espectro de Nodulación por un Fragmento de ADN que Contiene la Región Amino Terminal de <i>nodD</i> y una caja de Nodulación	60
d) Análisis de los Lipo-oligosacáridos Producidos por <i>R. tropici</i> CIAT899	71
e) Análisis de los Requerimientos Estructurales de los lipo-oligosacáridos de <i>R. tropici</i> CIAT899 para la Nodulación de Plantas de <i>Phaseolus</i> y <i>Leucaena</i>	87
f) Análisis del Cósmido pCV61	93
DISCUSION	101
a) Localización Física de los Genes de Nodulación de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899	102
b) Actividad Inductora de la Proteína NodD	106

	<u>Página</u>
c) Extensión del Espectro de Nodulación por un Fragmento de ADN que Contiene la Región Amino Terminal de <i>nodD</i> y una caja de Nodulación	107
d) Análisis de los Lipo-oligosacáridos Producidos por <i>R. tropici</i> CIAT899	110
e) Análisis de los Requerimientos Estructurales de los lipo-oligosacáridos de <i>R. tropici</i> CIAT899 para la Nodulación de Plantas de <i>Phaseolus</i> y <i>Leucaena</i>	116
f) Análisis del Cósmido pCV61	118
BIBLIOGRAFIA	122

INTRODUCCION

INTRODUCCION

La fijación de nitrógeno es un proceso natural exclusivo de microorganismos procariotes, que consiste en la reducción de nitrógeno molecular (N_2) a amonio (NH_3). Existen muchos géneros bacterianos que son capaces de llevar a cabo este proceso que aporta una gran cantidad de nitrógeno orgánico a la biósfera. Este elemento suele ser uno de los factores limitantes para la agricultura moderna a pesar de que 4/5 partes de la atmósfera está constituida por nitrógeno molecular. Así, es necesaria la acción de los microorganismos fijadores de nitrógeno para que este elemento pueda ser aprovechado por otros microorganismos y por plantas superiores. Actualmente, la agricultura moderna hace uso de fertilizantes nitrogenados, lo que presenta varios problemas: en primer lugar, el costo de producción de estos compuestos es muy elevado, ya que su síntesis requiere una gran cantidad de energía, suministrada principalmente por derivados del petróleo. Por otro lado, los fertilizantes nitrogenados son muy solubles en agua, por lo que se lavan fácilmente del suelo y es necesario aplicarlos varias veces a lo largo de la cosecha con el consiguiente encarecimiento de la producción. Esta misma característica de solubilidad hace que estos compuestos contaminen el manto freático y desemboquen en ríos, mares y lagunas, favoreciendo la sobrepoblación de microorganismos que desbalancean el equilibrio ecológico en estos ecosistemas, además de contaminar el agua para consumo humano (Delwiche C.C., 1970; Delwiche C.C., 1981).

Una posible alternativa al uso de fertilizantes químicos nitrogenados consiste en aplicar organismos fijadores de nitrógeno al suelo, reduciendo así, o inclusive evitando, el uso de fertilizantes nitrogenados. Aquí el problema estriba en el rendimiento de la cosecha, ya que este suele ser mayor cuando se aplican fertilizantes químicos. Por otro lado, las cepas de microorganismos seleccionadas en el laboratorio por su gran eficiencia de fijación de nitrógeno, suelen ser desplazadas por poblaciones autóctonas que están mejor adaptadas a las condiciones del suelo. Hasta la fecha, los mejores resultados se han obtenido en cultivos de caña de azúcar aplicando mezclas de fertilizantes nitrogenados con bacterias del género *Azotobacter* (J. Caballero, comunicación personal). Actualmente, se están desarrollando otras mezclas usando diferentes microorganismos para distintos cultivos.

REGULACION DE LA FIJACION DE NITROGENO

La nitrogenasa es la enzima capaz de convertir N_2 a NH_3 en un proceso que requiere de 12 a 15 moléculas de ATP para que cada molécula de N_2 sea fijada en dos moléculas de NH_3 . La base genética de la fijación de nitrógeno ha sido ampliamente estudiada en varios microorganismos pero es en *Klebsiella pneumoniae* donde mejor se conoce, aunque en el género *Rhizobium* también ha sido intensamente estudiada.

Existen en *Rhizobium* genes homólogos a aquellos de *Klebsiella* que han sido denominados genes *nif*. Por otro lado, ciertos genes involucrados en la fijación de nitrógeno que no se encuentran presentes en *Klebsiella* pero sí en *Rhizobium* han sido denominados genes *fix*. La presencia de los genes *fix* es congruente con las condiciones ambientales especiales en las cuales se lleva a cabo la fijación de nitrógeno en *Rhizobium*. Esto sugiere que la ruta metabólica de fijación de nitrógeno en vida libre es distinta de aquella en simbiosis. La estructura y las propiedades bioquímicas del complejo de la nitrogenasa están muy conservadas en diversos microorganismos, aunque las condiciones fisiológicas en las cuales se lleva a cabo la fijación de nitrógeno sean muy distintas.

Los estudios sobre fijación de nitrógeno llevados a cabo en *Rhizobium* se vieron facilitados enormemente por estudios previos desarrollados en *Klebsiella*. En este microorganismo se ha identificado un conjunto que consta de 21 genes contiguos organizados en ocho operones (De Bruijn *et al.* 1990). En *Rhizobium* estos genes se encuentran en el plásmido simbiótico o en el cromosoma dispuestos en diferentes unidades transcripcionales.

Los genes *nifHDK* se encuentran tanto en *Rhizobium* como en *Klebsiella* y son los genes estructurales que codifican para las subunidades que componen el complejo de la enzima nitrogenasa. El gen *nifA*, también común para ambos microorganismos, es un activador transcripcional de muchos de los genes *nif* y *fix* incluidos los genes *nifHDK* (Ruvkun & Ausbel, 1980; Szeto *et al.*, 1984). Otros genes, *nifB*, *nifN* y *nifE* están involucrados en el procesamiento y síntesis del cofactor hierro-molibdeno de la nitrogenasa (FeMoCo) (Norel *et al.*, 1984; Hennecke *et al.*, 1985), mientras que *nifF* (Hontelez *et al.*, 1984) y *nifJ* (Norel *et al.*, 1984) codifican para proteínas involucradas en el transporte específico de electrones en el complejo nitrogenasa.

Los genes *fixABCX* se encuentran en el plásmido simbiótico de *R. meliloti* en orientación divergente de *nifH* y corriente arriba de *nifA*. Estos genes están organizados como una sola unidad transcripcional y no tienen homología con ninguno de los genes *nif* de *Klebsiella*. Sus productos probablemente estén involucrados en el transporte de electrones específico de la nitrogenasa (Better *et al.*, 1985; Earl *et al.*, 1987).

El promotor del gen *fixA* contiene una secuencia consenso específica de los genes *nif*, lo cual indica que probablemente sea reconocido por el producto de *ntrA* y sea positivamente regulado.

El gen *fixX* tiene una gran homología con una ferredoxina encontrada en *Azotobacter vinelandii*, otro microorganismo fijador de nitrógeno (Buck & Cannon, 1987).

En *R. meliloti* existe otro grupo de genes *fix* que están organizados en cuatro operones: *fixJL*, *fixK*, *fixNOPQ* y *fixGHIS* (David *et al.*, 1988; Batut *et al.*, 1989; Kahn *et al.*, 1989). Los genes *fixJ* y *fixL* son genes reguladores, mientras que los genes *fixNOPQ* y *fixGHIS* parecen estar asociados a membrana. El gen *fixG* tiene homología con otras ferredoxinas bacterianas por lo que se piensa que está involucrado en el transporte de electrones, mientras que el gen *fixI* es probablemente la subunidad catalítica de una bomba de cationes asociada específicamente a la fijación simbiótica del nitrógeno (Kahn *et al.*, 1989). El gen *fixP* muestra homología con citocromo C, mientras que del gen *fixN* se sabe que se expresa en condiciones simbióticas pero también se observa expresión en vida libre cuando las condiciones ambientales son de microaerobiosis, por lo que probablemente esté regulado por los niveles de oxígeno (Batut *et al.*, 1989).

La expresión de los genes *nif* está regulada a dos niveles principales (Buck & Cannon, 1987). El primer nivel, depende del sistema de regulación centralizado del metabolismo del nitrógeno (sistema *ntr*). El segundo nivel de regulación involucra el control de la expresión de los operones *nif* a través de los productos de los genes *nifA* y *nifL*. La síntesis, el procesamiento y la actividad del complejo nitrogenasa está a cargo de NifA, un activador transcripcional y de NifL, una proteína que reduce la actividad de NifA en presencia de oxígeno y nitrógeno fijado (Figura 1). La expresión del operón *nifLA* está regulada por el nivel de nitrógeno combinado a través de los productos de *ntrB* y *ntrC*, que forman un sistema regulatorio de dos componentes. Cuando se presentan condiciones en las que la cantidad de α -cetoglutarato es elevada y las de glutamina son bajas, el producto de *ntrB*

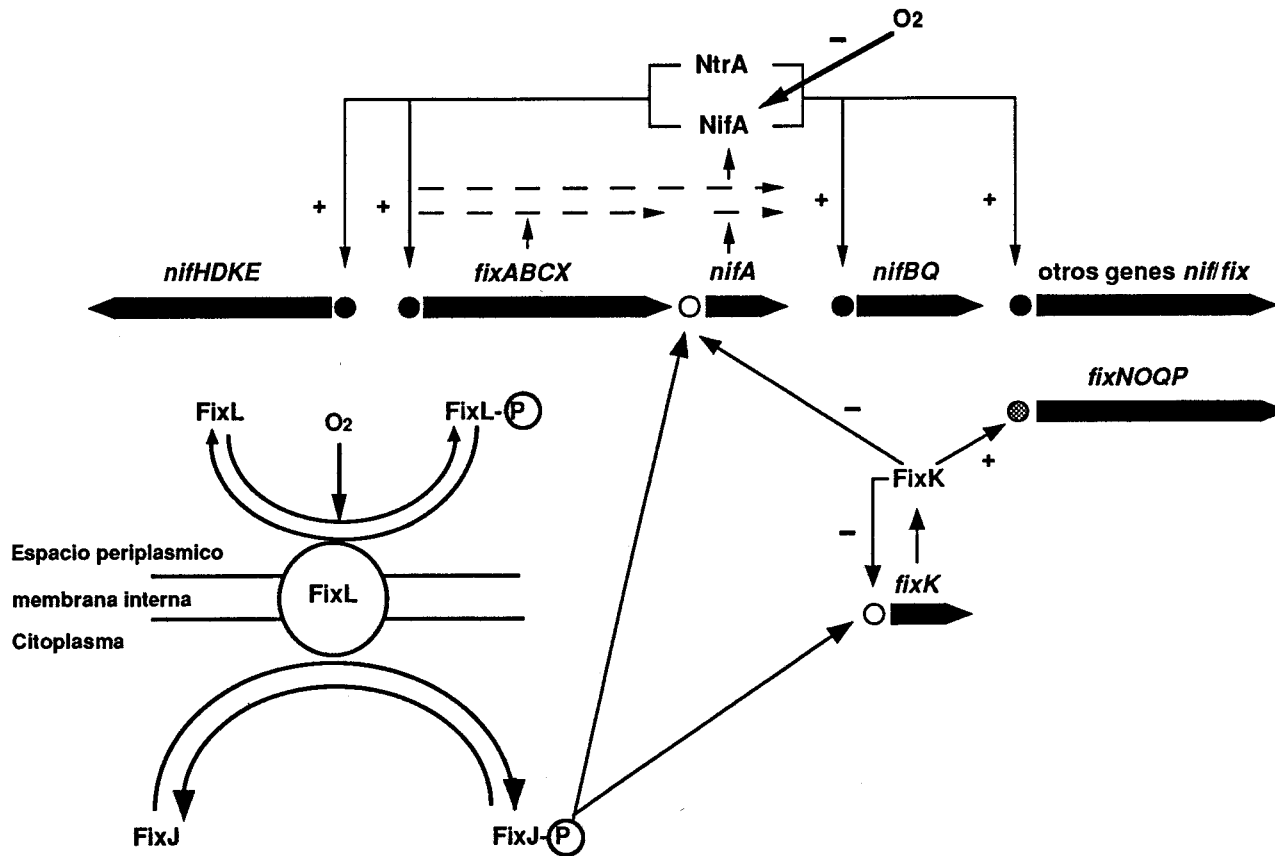


Figura 1.- Regulación de los genes de Fijación de Nitrógeno.
 Las flechas indican rutas regulatorias.
 +: control positivo. -: control negativo.

fosforila a la proteína NtrC que a su vez, activa la transcripción de el operón *nifLA* (Gussin, *et al.*, 1986) (Figura 1).

La proteína NifA pertenece a un grupo de proteínas bacterianas reguladoras que dependen del factor sigma alternativo NtrA (RpoN) (Gussin, *et al.*, 1986). Además de NifA, que activa la transcripción de los genes estructurales para la fijación de nitrógeno, existen otras proteínas como NtrC, que activa la transcripción de genes involucrados en la asimilación de nitrógeno y el producto del gen *dctD*, que activa la transcripción de genes involucrados en el transporte de C₄-dicarboxilatos en *Rhizobium* (Ronson *et al.*, 1987). Estas tres proteínas regulatorias comparten aspectos estructurales, incluyendo una secuencia muy conservada de 238 aminoácidos en la región central de las proteínas y otro bloque no tan conservado de 45 aminoácidos en el extremo C-terminal que incluye una estructura de helice-giro-helice típica de estructuras de unión a ADN (Drummond *et al.*, 1986). Además, existe una secuencia activadora corriente arriba (Upstream Activating Sequence, UAS) con la secuencia consenso 5'-TGTCG-N₆-ACACA-3' que está situada a 90 pares de bases corriente arriba de los promotores consenso de NtrA que son activados por NifA (Gussin, *et al.*, 1986). La dependencia de la secuencia activadora UAS varía entre distintas especies descritas y las condiciones estudiadas (ver más adelante) (Better *et al.*, 1985).

La proteína NifA de *R. meliloti* activa la transcripción simbiótica de un grupo de genes que contienen su correspondiente promotor *nif* en otras especies fijadoras de nitrógeno en vida libre (Szeto *et al.*, 1984; Gubler & Hennecke, 1986). En condiciones de limitación de nitrógeno, en células en vida libre de *R. meliloti*, la transcripción de los genes *nifH* y *fixA* pudo ser inducida por el producto de *ntrC* (Szeto *et al.*, 1987). Sin embargo se ha demostrado que el papel de NtrC es poco significativo en nódulos inducidos por *R. meliloti*, mientras que la función de *nifA* es esencial para la activación de genes simbióticos de fijación de nitrógeno (Ditta, *et al.*, 1987). En condiciones de vida libre, la expresión de *nifA* está regulada por oxígeno y puede ser inducida por condiciones de microaerobiosis (Virts *et al.*, 1988). Se ha demostrado que la función activadora de NifA en *R. meliloti* puede ser inactivada por O₂ (Huala & Ausbel, 1989).

Existe en *R. meliloti* otro gen, *fixK*, que se expresa tanto en condiciones de microaerobiosis como en simbiosis y reprime la transcripción de *nifA*, siendo un regulador positivo del operón *fixN* (Batut *et al.*, 1989). El gen *fixK* es homólogo a un gen regulatorio de *E. coli* llamado *fnr* que controla la expresión

de genes que se activan en condiciones anaeróbicas. Se han identificado homólogos del gen *fixK* en *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Colonna-Romano *et al.*, 1990), en *Azorhizobium caulinodans* (De Bruijn *et al.*, 1990), y en *Bradyrhizobium japonicum* (Anthamatten & Hennecke, 1991). Sin embargo y en contraste con todos estos genes homólogos, al gen *fixK* de *R. meliloti* le falta una secuencia consenso presente en el extremo amino terminal que se ha asociado a la sensibilidad a O₂ en otras proteínas de la familia *fnr* (Batut *et al.*, 1989).

La expresión de *fixK* en *R. meliloti* en condiciones de microaerobiosis, así como en simbiosis, está regulada por un par de proteínas regulatorias: FixL y FixJ (David *et al.*, 1988; De Philip *et al.*, 1990). La proteína FixJ es un regulador transcripcional de varios operones (Figura 1) y es activado por el producto del gen *fixL*, que es una proteína sensora de oxígeno. En condiciones de baja tensión de oxígeno, FixL fosforila a la proteína FixJ y esta activa la transcripción de *nifA* y así la de otros genes *nif* y *fix* (Figura 1). Algunos datos de secuencia han revelado que las proteínas FixJ y FixL pertenecen a una familia de proteínas denominadas sistemas regulatorios de dos componentes (para revisión vease Stock *et al.*, 1989). La proteína FixL es una hemoproteína sensora de oxígeno y su función es llevada a cabo por el grupo hemo, que probablemente esté localizado entre los residuos 86 y 219 del polipéptido (Gilles-Gonzalez *et al.*, 1991). Esta parte de la proteína FixL está muy conservada en *A. caulinodans* y en *B. japonicum* (Anthamatten & Hennecke, 1991; Kaminski & Elmerich, 1991). Además, en el extremo amino terminal de la proteína FixL se encuentra un dominio probable de formación de hélices transmembranales común a muchos elementos sensores de sistemas regulatorios de dos componentes. Estudios realizados en varios sistemas regulatorios de dos componentes, han llevado a proponer que FixL es una proteína sensora transmembranal que reacciona a cambios en el ambiente bacteriano (probablemente la tensión de oxígeno) y fosforila a la proteína FixJ, que a su vez activa la transcripción de los genes *nifA* y *nifK* (Ronson *et al.*, 1987; Albright *et al.*, 1989). Por otro lado, la proteína FixJ presenta homología en los primeros 120 aminoácidos de su extremo amino terminal con miembros reguladores del sistema regulatorio de dos componentes (David *et al.*, 1988; Albright *et al.*, 1989).

Se han realizado estudios de transcripción *in vitro* que indican que el promotor de *fixK* es dependiente de un factor sigma 70 y esto ha llevado a suponer que el promotor de *nifA* de *R. meliloti* también es sigma 70 dependiente (Batut *et al.*, 1991).

Al parecer, la tensión de oxígeno es una de las señales principales para la activación y regulación de los genes simbióticos de fijación de nitrógeno dentro del nódulo. Sin embargo, hay otras señales que son necesarias para que la fijación simbiótica de nitrógeno sea efectiva. Por ejemplo, el promotor de *fixA* es débilmente activado en condiciones de microanaerobiosis mientras que su activación en simbiosis es muy fuerte. Esto indica que no solo la tensión de oxígeno regula a este promotor (Ditta, *et al.*, 1988). Otro ejemplo lo tenemos con la expresión de *nifH*, que en microaerobiosis es fuertemente dependiente de la UAS, mientras que esta secuencia parece tener poca importancia en simbiosis, ya que sin ella se alcanzan niveles altos de fijación de nitrógeno en el nódulo (Ditta, *et al.*, 1988). Al parecer, el sistema de transporte de C₄-dicarboxilatos es esencial para la fijación de nitrógeno, ya que mutantes en estos genes son incapaces de inducir los genes *nif* en condiciones de microaerobiosis o simbiosis (Birkenhead *et al.*, 1990). Estas y otras evidencias indican que además de la tensión de oxígeno, otras señales están involucradas en la regulación de los genes de fijación de nitrógeno.

LA SIMBIOSIS *RHIZOBIACEAE*- LEGUMINOSA

Dentro de la gran variedad de microorganismos fijadores de nitrógeno, algunos miembros de la familia *Rhizobiaceae* tienen especial interés, ya que forman asociaciones simbióticas con plantas leguminosas (muchas de las cuales son cosechas importantes) formando un órgano especializado llamado nódulo en donde se lleva a cabo la fijación de nitrógeno. El amonio producido durante este proceso es asimilado por la planta, mientras que la bacteria recibe fuentes de carbono producto de la fotosíntesis vegetal. Estos géneros bacterianos son incapaces de fijar nitrógeno en vida libre, en contraste con otros géneros fijadores de nitrógeno como *Azospirillum*, *Azotobacter* o *Klebsiella*. La cantidad de nitrógeno molecular (N₂) incorporada a material orgánico que resulta de la simbiosis *Rhizobiaceae*-leguminosas, se ha calculado en un tercio del total del nitrógeno requerido por la agricultura mundial y equivale a la producción de fertilizantes nitrogenados producidos por año (Economou & Downie, 1992). La gran importancia agronómica de esta simbiosis, ha llevado a muchos grupos de varios países a un intenso proceso de investigación, de modo que esta simbiosis es una de las interacciones planta-bacteria mejor conocidas.

Dentro de la familia *Rhizobiaceae* existen tres géneros que establecen simbiosis con plantas leguminosas

(*Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Rhizobium*), aunque otros miembros como *Agrobacterium* son patógenos de una gran variedad de plantas que no se limitan a las leguminosas (Young & Johnston, 1989). Por otro lado, hasta la fecha sólo se conoce una especie de planta no leguminosa (la ulmácea *Parasponia*) que es capaz de ser nodulada por *Rhizobium* (Dénarié *et al.*, 1992). El género *Rhizobium* incluye especies de crecimiento rápido y por lo general con un espectro de nodulación limitado (ver más adelante), mientras que los miembros del género *Bradyrhizobium* son bacterias de crecimiento lento y con un amplio espectro de nodulación. Los miembros del género *Azorhizobium* son más escasos, de crecimiento lento, con un espectro de nodulación limitado y son capaces de formar nódulos no solo en las raíces de la planta sino también en los tallos (Elkan, 1984; Martínez *et al.*, 1990).

Una de las características más importantes de estas asociaciones simbióticas es que son muy específicas, es decir, solo ciertas especies bacterianas son capaces de nodular a determinadas leguminosas (Tabla 1). Así, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* es una bacteria capaz de establecer simbiosis con ciertas plantas del género *Trifolium*, pero es incapaz de nodular otras leguminosas como *Phaseolus* o *Medicago*. Así mismo, *R. meliloti* es capaz de nodular plantas de los géneros *Melilotus*, *Medicago* y *Trigonella*, pero no establece asociaciones compatibles con otros géneros de leguminosas. La mayoría de las especies del género *Rhizobium* han sido clasificadas como noduladoras de espectro limitado. Por el contrario, las especies del género *Bradyrhizobium*, suelen ser capaces de nodular un mayor número de leguminosas, por lo cual se les ha denominado como especies de amplio espectro de nodulación. Sin embargo, dentro del género *Rhizobium* también se encuentran especies con amplio espectro de nodulación como lo son *Rhizobium tropici* o *Rhizobium* sp. NGR234. Esta última estirpe es capaz de nodular más de 70 especies distintas de leguminosas (Dénarié *et al.*, 1992). Las bases moleculares de la especificidad de hospedero se discutirán más adelante.

Tabla 1. Relación de especies que comprenden los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* (Ejemplos de rizobios con los grupos de inoculación cruzada).

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

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

El proceso de nodulación es complejo y tiene varias etapas en las que intervienen un gran número de genes, tanto de la planta como de la bacteria. Se inicia cuando la bacteria reconoce de forma específica a su hospedero a través de un intercambio de señales químicas entre los dos simbioses (ver más adelante) y se adhiere a la punta de los pelos radicales. El proceso de adhesión de las células bacterianas ocurre en dos fases; inicialmente se unen débilmente a la raíz y después se dá una adherencia firme y la acumulación de células

bacterianas a la punta del pelo radical. La primera fase de este proceso está mediada por una proteína de superficie bacteriana que une calcio llamada ricadhesina. En la segunda fase de adhesión, intervienen fibrillas de celulosa de la bacteria. Por parte de la planta, intervienen unas proteínas llamadas lectinas, que son polipéptidos capaces de unir polisacáridos extracelulares de *Rhizobium*. Se ha demostrado que las lectinas juegan un papel importante en la especificidad de la interacción, ya que cuando se han transformado raíces de trébol con la lectina de guisante, estas raíces adquieren la capacidad de ser noduladas por *R. leguminosarum* *bv. viciae*, un huésped no usual de esta planta (Kijne, 1991).

Algunos de los pelos radicales en donde se han adherido las bacterias sufren una serie de cambios morfológicos, dirigidos probablemente por el citoesqueleto de la célula vegetal. Estos cambios incluyen curvatura, deformación y ramificación de los pelos radicales (Smit, *et al.*, 1987). La membrana vegetal sufre una invaginación que dá inicio a una estructura llamada cordón de infección, mediante la cual las células bacterianas penetran hasta el córtex vegetal, en donde son liberadas al interior del citoplasma de algunas células corticales, rodeadas de una membrana de origen vegetal conocida como membrana peribacteroidal (Economou & Downie, 1992). A lo largo de la formación del cordón de infección y en la liberación de las células bacterianas dentro de las células del córtex, los exopolisacáridos de *Rhizobium* juegan un papel fundamental, ya que mutantes exo^- de distintas especies de *Rhizobium* son incapaces de formar nódulos. Probablemente, los exopolisacáridos extracelulares de *Rhizobium* enmascaren a las bacterias, permitiéndoles escapar al sistema de defensa de la planta. Simultáneamente con la formación del cordón de infección, las células del córtex se han empezado a dividir formando un primordio de nódulo que más adelante dará lugar al nódulo maduro para la fijación de nitrógeno. Durante este proceso las células vegetales expresan una serie de proteínas llamadas nodulinas que llevan a cabo muy diversas funciones; por ejemplo en *Phaseolus vulgaris* se ha detectado la existencia de una glutamino sintetasa nódulo específica (Sánchez *et al.*, 1987). Otra de las nodulinas mejor conocidas es la leghemoglobina, que tiene el papel de regular la concentración de oxígeno dentro del nódulo ya que la actividad de nitrogenasa es sumamente sensible a este elemento (Nap & Bisseling, 1990). Sin embargo, el papel de la mayoría de las nodulinas hasta ahora estudiadas es desconocido (ver más adelante). Una vez dentro de la membrana peribacteroidal, las bacterias se diferencian a bacteroides y se da paso a la fijación

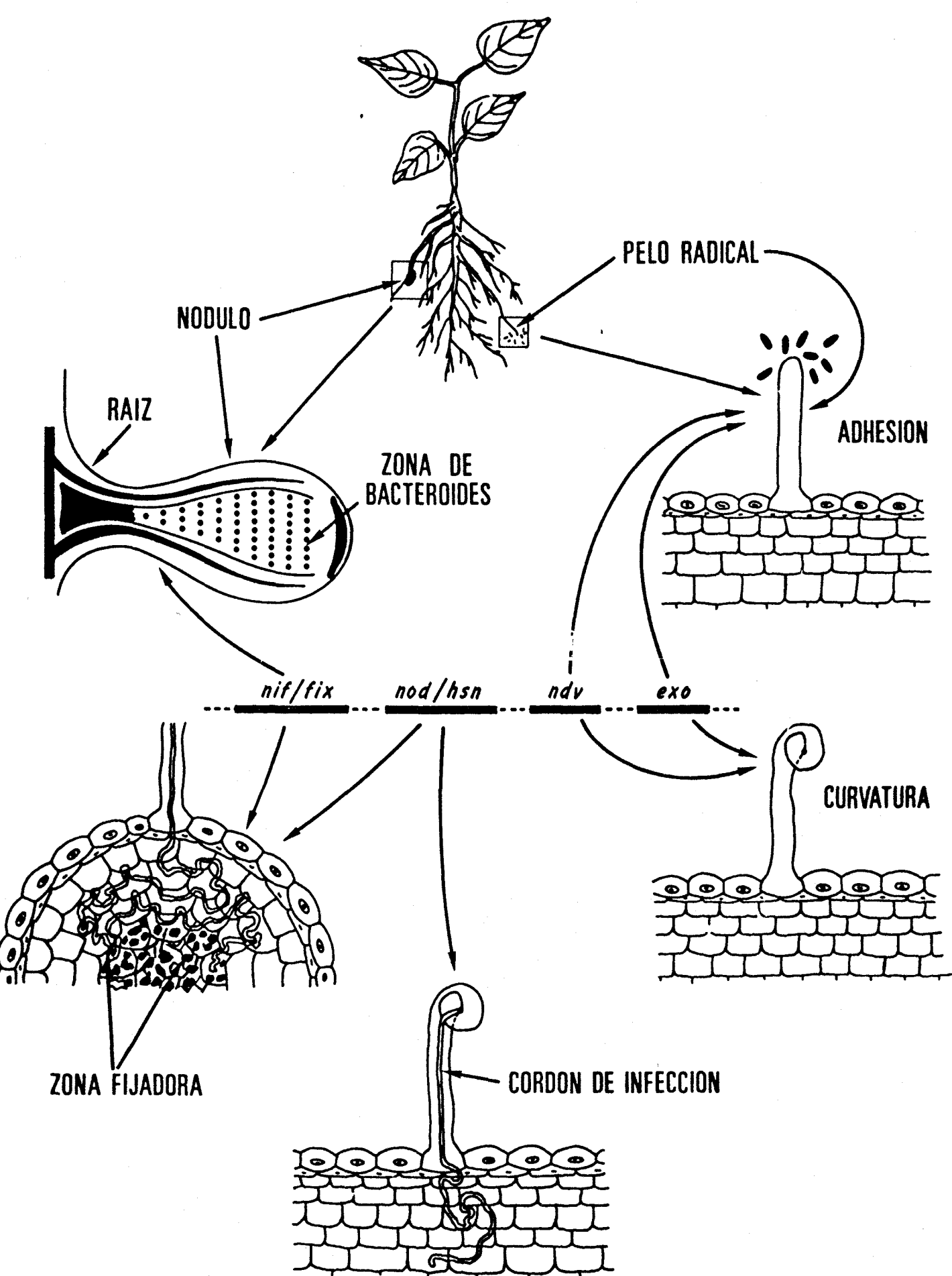


Figura 2.- Representación esquemática de los diferentes pasos en el proceso de nodulación.

de nitrógeno. En el nódulo maduro encontramos haces vasculares y dos tipos de células: infectadas (aquellas que contienen a los bacteroides) y células no infectadas, cuyo papel es metabolizar el amonio producto de la fijación de nitrógeno y aportar fuentes de carbono a los bacteroides. El amonio producido por los bacteroides es exportado a las células no infectadas donde se convierte a glutamina, que a su vez es utilizada para la síntesis de ureidos o amidas. Estos compuestos son finalmente transportados hacia el resto de los tejidos vegetales (Figura 2).

El proceso de iniciación del nódulo, así como la especificidad de la simbiosis radica en un intercambio de señales químicas entre los dos simbioses. Así, la planta exuda por la raíz compuestos fenólicos llamados flavonoides que son reconocidos por la proteína reguladora bacteriana NodD. El producto del gen *nodD* es un activador transcripcional de los denominados genes de nodulación, cuyo papel es la síntesis de lipo-oligosacáridos, moléculas que a su vez disparan el proceso de diferenciación en las células vegetales dando lugar a la formación del nódulo.

LOS GENES DE NODULACION Y LA SINTESIS DE LIPO-OLIGOSACARIDOS.

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

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

En la Figura 3 se muestra la organización genética de muchos de los genes de nodulación descritos para varias especies de Rizobios. Estos genes están organizados en distintas unidades transcripcionales que comparten una secuencia consenso corriente arriba denominada caja de nodulación a

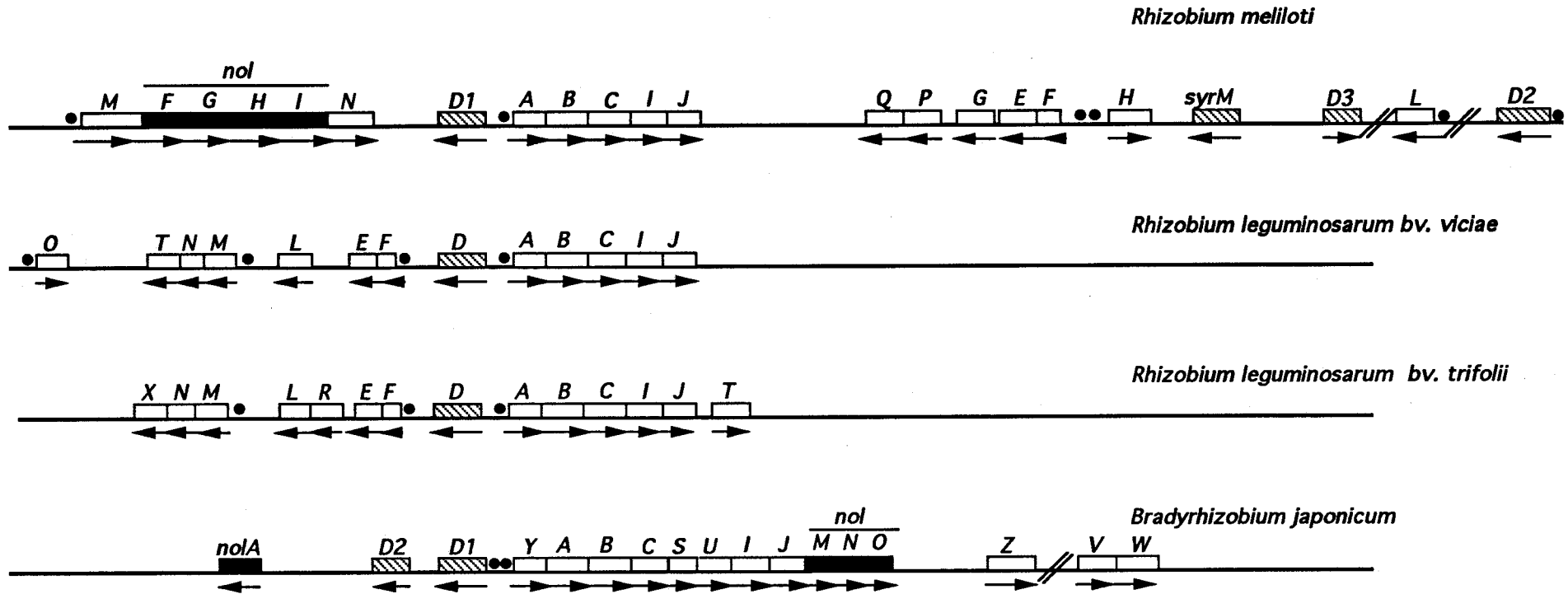


Figura 3.- Organización genética de los operones *nod* en diversas especies de Rhizobios.

través de la cual se lleva a cabo su regulación (ver más adelante).

Los genes de nodulación están involucrados en la síntesis y transporte de pequeños lipo-oligosacáridos (también llamados factores de nodulación), moléculas que son reconocidas por la planta y disparan la organogénesis del nódulo. En algunos casos se ha podido inducir la formación de un nódulo completo en plantas estériles de alfalfa con sólo añadir estos compuestos a muy bajas concentraciones (Lerouge *et al.*, 1990). La estructura básica de estos compuestos consta de varias unidades de N-acetil-glucosamina (de 3 a 5) unidas por enlaces β -1-4 y N-aciladas en el extremo no reductor del azúcar (Figura 4 y Tabla 2). Dado que la producción de estos compuestos es *nodABC* dependiente y estos genes están presentes en todos los rizobios, es de suponerse que el mecanismo por el cual se induce la formación del nódulo es similar para todas las especies, y está mediado a través de compuestos que pertenecen a la misma familia química, es decir, los lipo-oligosacáridos. Estudios en varias especies distintas y poco relacionadas genéticamente como *Rhizobium* sp. NGR234, *R. tropici*, *B. japonicum* y *A. caulinodans* han demostrado que todas estas especies producen lipo-oligosacáridos con la misma estructura básica antes mencionada (Figura 4) (Price *et al.*, 1992; Sanjuan *et al.*, 1992; Mergaet *et al.*, 1993; Poupot *et al.*, 1993). Sin embargo, existen diferencias en la estructura química de estos compuestos dependiendo de la especie de la cual provengan, lo que sugiere un segundo mecanismo para la especificidad de la simbiosis. Así, los factores de nodulación de *R. meliloti* y *R. tropici* están O-sulfatados mientras que los de *R. leguminosarum* no lo están. Por otro lado los lipo-oligosacáridos de esta última especie presentan un lípido altamente insaturado que no se ha encontrado en otras especies. En la Tabla 2 se muestran las diferentes substituciones que presentan varios lipo-oligosacáridos provenientes de distintas especies de rizobios.

Tabla 2.-Estructuras de los factores de nodulación producidos por diversas especies de *Rhizobium*

	Substituciones ^b					
	R ₁	R ₂	R ₃	X	Y	n
<i>R. meliloti</i>	C16:2 o C16:3	-H o -CO-CH ₃	-SO ₃ H	-H	-H	1,2, 3
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	C18:4 o C18:1	-CO-CH ₃	-H	-H	-H	2, 3
<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	C18:1 o C16:0	-CO-CH ₃	2- <i>O</i> -methylfucosa 3- <i>O</i> -sulfatada o 4- <i>O</i> -acetylada	-CONH ₂	-CH ₃	3
<i>B. japonicum</i>	C18:1, C16:0 o C16:1	-H o -CO-CH ₃	2- <i>O</i> -methylfucosa o -H	-H	-H	3, 4
<i>A. caulinodans</i>	C18:0 o C18:1	-H o -CONH ₂	D-arabinosa o -H	-H	-CH ₃	2, 3

^b R₁= acido graso: acido vaccenico (C18:1), acido estearico (C18:0), acido palmitico (C16:0); R₂ and R₃= hidrogeno o otra substitucion distinta; X= hidrogeno o residuo carbamoyl; Y= hidrogeno o residuo *N*-methyl y n= numero de unidades de glucosamina.

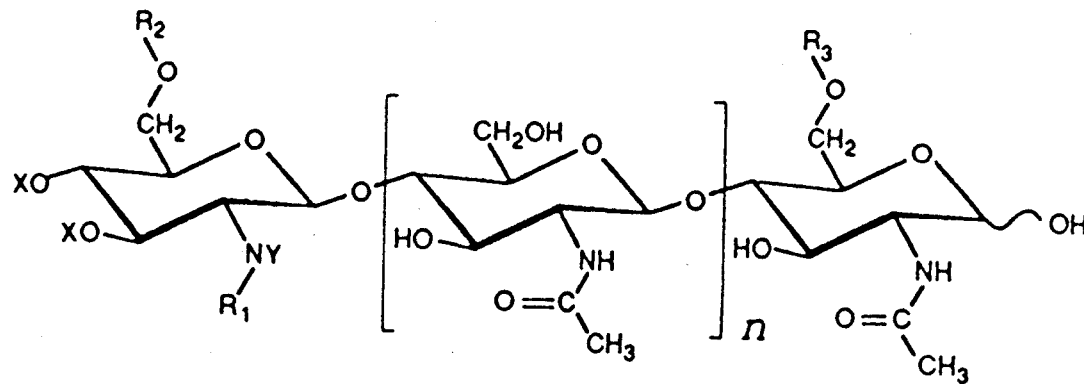


Figura 4.- Estructura básica de los factores de nodulación de *Rhizobium*.

La actividad biológica de estas moléculas ha sido estudiada con cierto detalle en algunas especies de *Rhizobium*, especialmente en *R. leguminosarum* bv. *viciae* y en *R. meliloti*. La adición de factores de nodulación puros a raíces de leguminosas provoca una serie de respuestas ontogénicas en distintos grupos de células de la raíz. A concentraciones pico o nanomolares, estos compuestos inducen deformación, ramificación y curvatura de los pelos radicales (Lerouge *et al.*, 1990; Roche *et al.*, 1991; Spaink *et al.*, 1991). Cuando se añaden factores de *R. leguminosarum* bv. *viciae* a raíces de *Vicia sativa*, en las células del córtex externo y medio, se observa la formación de unas estructuras citoplásmicas alineadas radialmente que se han propuesto como precursoras de los cordones de infección (van Brussel *et al.*, 1992). Mientras, en el córtex interno, estos factores disparan la mitosis a tal grado que comienza a notarse un abultamiento de la raíz (Truchet *et al.*, 1991; van Brussel *et al.*, 1992). Cuando los factores de *R. meliloti* se añaden a raíces de alfalfa, se ha observado la formación de meristemas que dan lugar a nódulos con idéntica anatomía y ontogenia que aquellos inducidos por la bacteria. Estos nódulos están vacíos y obviamente no fijan nitrógeno (Truchet *et al.*, 1991). En otros sistemas como *Sesbania* y *Phaseolus* se han podido observar estructuras muy similares a verdaderos nódulos cuando se añaden los factores producidos por especies compatibles (Mergaet *et al.*, 1993; Palacios *et al.*, 1993). Estos datos sugieren que la planta contiene toda la información genética necesaria para el desarrollo del nódulo.

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

Por otro lado, las O-substituciones en el lipo-oligosacárido juegan también un papel determinante en su actividad biológica. En *R. meliloti* el grupo sulfato es esencial para la actividad del factor; por otro lado, si está ausente el grupo O-acetilo en los factores de *R. meliloti* y de *R. leguminosarum* bv.

viciae estos muestran una actividad muy reducida (Spaink *et al.*, 1991; Truchet *et al.*, 1991).

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

Actualmente se están llevando a cabo estudios para determinar el mecanismo biológico por medio del cual estos factores ejercen su actividad en la planta. Dado que la concentración a la cual actúan los lipo-oligosacáridos es extremadamente baja, se postula la existencia de receptores de alta afinidad en la planta. La evidencia de que existen distintos requerimientos estructurales del factor para distintas respuestas en la planta también hace pensar en que existan varios tipos de receptores con diferentes afinidades para distintas partes del lipo-oligosacárido y/o distinta localización celular. No se ha determinado si estos receptores estarían localizados en la membrana plasmática o en algún otro compartimento celular. Recientemente, se ha conseguido la síntesis química completa del factor mayoritario de *R. meliloti* (Nicolau *et al.*, 1992), lo cual ofrece la posibilidad de la síntesis de factores radioactivos o fotoactivos que permitan su seguimiento dentro de la raíz para lograr la identificación de los receptores y sus genes.

Por otro lado, la vía de transducción de la señal provocada por los factores de nodulación también se está estudiando. Ehrhardt y colaboradores (1992) han encontrado un sistema de ensayo mediante el cual se puede detectar una depolarización de la membrana de los pelos radicales de plantas de alfalfa cuando se añaden factores puros de *R. meliloti*. Esto permitirá el uso de metodologías farmacológicas en el estudio de la transducción de la señal provocada por los factores de nodulación. Otro enfoque para el estudio de la acción de los lipo-oligosacáridos en la planta, ha sido el aislamiento de genes que se expresan en etapas tempranas del proceso de nodulación y en respuesta a la adición de factores de nodulación. Estos genes han sido denominados genes ENOD (por Early Nodulins) y se han identificado ya varios de ellos como lo son ENOD12, ENOD5 y ENOD40 (Horvath *et al.*, 1993; Bisseling T., comunicación personal), si bien, su función bioquímica aún se desconoce.

Por último, se está explorando la posibilidad de que los lipo-oligosacáridos producidos por *Rhizobium* sean una mímica de señales endógenas de la planta. Existen varias evidencias para considerar esta posibilidad. En primer lugar, pese que los

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

LA FUNCION DE LOS GENES DE NODULACION

Los genes de nodulación han sido clasificados en tres grupos, si bien esta clasificación está aún sujeta a discusión. Por un lado, está la familia de genes regulatorios *nodD*, de los cuales existen varios alelos y algunas estirpes tienen múltiples copias de ellos. Por otro lado, están los genes *nod* comunes que se han denominado así porque son funcionalmente intercambiables entre distintas especies de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*. Finalmente, encontramos los genes *nod* específicos (o genes *hsn*) cuya función determina la especificidad de la simbiosis (Kondorosi *et al.*, 1984).

EL GEN *nodD* Y LA REGULACION DE LOS GENES *nod*

El gen *nodD* se ha encontrado en todos los rizobios (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*) estudiados hasta la fecha. En algunas estirpes de *Rhizobium* el gen *nodD* se encuentra en una sola copia, mientras que en otras se han encontrado hasta 4 copias de este gen (Rodríguez Quiñones *et al.*, 1987; Sousa *et al.*, 1993). Por otro lado, en *R. meliloti* existe una proteína (SyrM) que muestra gran homología con el producto del gen *nodD* y está involucrada en su regulación (ver más adelante) (Long *et al.*, 1989). La proteína NodD es un activador transcripcional de los genes *nod* y *nol* y muestra diferentes afinidades por flavonoides, dependiendo de la especie de la cual provenga. Por lo general, los inductores de *Rhizobium* son flavonas y flavanonas, mientras que para *Bradyrhizobium* son isoflavonas. Para cada especie o biovariedad de rizobio, existe un grupo de flavonoides que determinan una tasa óptima de activación transcripcional. Al parecer esta especificidad depende únicamente del tipo de proteína NodD presente(s) en la bacteria. Solo cuando la

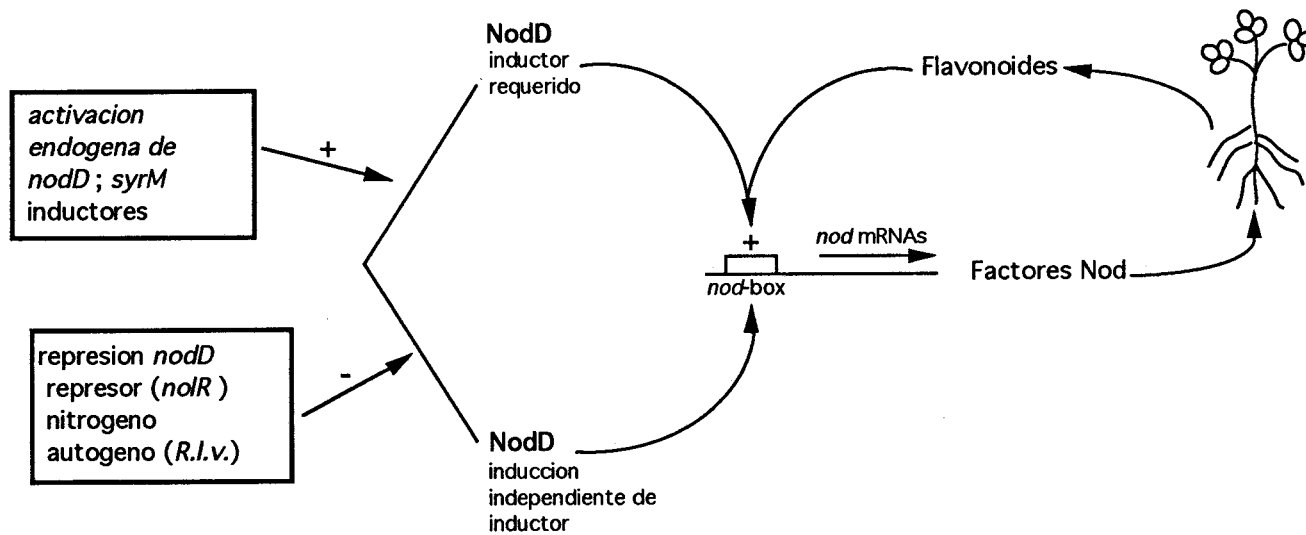


Figura 5.- Regulación de los genes *nod* a través de *nodD*. Las flechas indican rutas regulatorias.

+ : controles positivos - : controles negativos

proteína NodD interacciona con flavonoides cumple su función como activador transcripcional. Esta característica de NodD hace que esta proteína juegue un papel determinante en la especificidad de la simbiosis, ya que diferentes plantas excretan distintas combinaciones de flavonoides y solo aquella proteína NodD que reconozca estos flavonoides podrá activar la transcripción de los genes de nodulación y nodular esa planta determinada (Györgypal *et al.*, 1988; Spaink *et al.*, 1989). Por otro lado, también se ha demostrado que algunos flavonoides pueden actuar como inhibidores de la función de NodD (Figura 5). Esta primera barrera de especificidad se ha demostrado al introducir distintos genes *nodD* a cepas heterólogas de modo que su espectro de nodulación se ve alterado. Por ejemplo, si el gen *nodD* de *R. tropici* es introducido en *R. leguminosarum* bv. *trifolii* esta última estirpe adquiere la capacidad de nodular plantas de *Phaseolus*, que no son su hospedero habitual (Sousa *et al.*, 1993). Por otro lado, existen experimentos similares en donde no se ha logrado extender el espectro de nodulación de la cepa receptora, indicando así que el reconocimiento de flavonoides por NodD no es la única barrera de especificidad. Una explicación para este fenómeno es que la planta no sea capaz de reconocer los factores de nodulación de la cepa en cuestión, aunque esta los esté produciendo inducida por la proteína NodD heteróloga.

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

La transcripción de *nodD* es por lo general constitutiva pero existen diferentes factores que intervienen en su regulación. Dentro de estos factores están: los niveles de nitrógeno combinado, ya que en algunos promotores de *nodD* existen secuencias que son reconocidas por NtrC, algunos compuestos exudados por la planta e inclusive algunas proteínas regulatorias como *nolR* (una proteína represora encontrada en *R. meliloti*), SyrM y la misma NodD, que en algunos sistemas es una proteína autoregulatoria (Rossen *et al.*, 1985; Horvath *et al.*, 1987; Banfalvi *et al.*, 1988; Dusha *et al.*, 1989; Kondorosi *et al.*, 1989; Davis & Johnston, 1990; Maillet *et al.*, 1990). La regulación de *nodD* no está aún bien entendida y al parecer se lleva a cabo por un sistema complejo. Por ejemplo, en mutantes en *groEL* (una chaperona molecular) de *R. meliloti*, la expresión de *nodD3* se reprime mientras que la de *nodD1* y *nodD2* disminuye, indicando así que probablemente varias proteínas participen en el proceso de activación de los genes *nod*. Por otro lado, también existe regulación cruzada entre diferentes alelos de *nodD*. En *R. meliloti*, *nodD3* es inducido por SyrM, al mismo tiempo que la proteína NodD3 induce la transcripción de *syrM* en un circuito de auto-alimentación positiva. Tanto *nodD3* como *syrM* se autoregulan positivamente y NodD1 regula positivamente a *nodD3* en presencia de flavonoides que lo activen (Maillet *et al.*, 1990; Kondorosi *et al.*, 1991). NodD de *R. leguminosarum* bv. *viciae* y NodD2 de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* reprimen su propia transcripción.

La gran mayoría de los operones *nod* tienen una secuencia conservada de 50 pares de bases situada a unas 200 o 250 pares de bases del inicio de la transcripción, llamada caja de nodulación (Figura 3). Es en esta secuencia donde se une la proteína NodD para activar la transcripción. Estudios recientes (Long *et al.*, 1992), han demostrado que la proteína NodD se une sólo a un lado de la doble hélice de ADN y provoca que se doble sobre si misma, recordando la acción de otra proteína regulatoria bacteriana llamada IHF (Integration Host Factor) y que está involucrada en la regulación de operones *nif* junto con la proteína NifA (Kustu *et al.*, 1992). Aún no está claro si la proteína NodD actúa como monómero o como multímero para activar la transcripción, pero la presencia del módulo receptor en su estructura hace pensar que interacciona con otras proteínas o con otras moléculas de NodD para ejercer su función. A este respecto, se ha encontrado en todas las cajas de nodulación estudiadas una estructura que favorece la hipótesis de que NodD se une como un tertrámero a la caja de nodulación. Estudios de delección en las cajas de nodulación

también favorecen este modelo (Long *et al.*, 1992). Como se ha mencionado anteriormente, sólo cuando NodD interacciona con flavonoides es capaz de activar la transcripción de los operones *nod* y *nol*, aunque no se ha demostrado una interacción directa entre NodD y los flavonoides. Por otro lado, algunos estudios han demostrado que NodD es capaz de unirse a las cajas de nodulación aún en ausencia de flavonoides, si bien la afinidad de esta unión es mucho mayor en presencia de estos compuestos (Schlaman, *et al.*, 1992). Como la proteína NodD se ha localizado en la membrana plasmática de la bacteria se postula que su interacción con flavonoides debe ocurrir en el espacio periplásmico. Estudios de transporte y acumulación del flavonoide naringenina en células de *R. leguminosarum* bv. *viciae* apoyan este modelo (Recourt 1991; Schlaman, *et al.*, 1992). Por último, existen también factores ambientales que regulan la transcripción de los genes *nod*, como lo es la disponibilidad de nitrógeno combinado en el suelo (Dusha *et al.*, 1989).

LOS GENES NOD COMUNES Y SU FUNCION BIOQUIMICA

Los genes *nodABCDEFGHIJ* se han denominado genes *nod* comunes y se han encontrado también en todos los rizobios estudiados a la fecha. Estos genes son funcionalmente intercambiables entre diversas especies de rizobios y de ahí que se les haya denominado "comunes". Los genes *nodABC* son esenciales para el proceso de nodulación, ya que cualquier mutación en ellos bloquea por completo este proceso. Por otro lado, mutaciones en los genes *nodIJ* sólo provocan un fenotipo de retraso en la nodulación. Estos genes muestran homología con algunas proteínas bacterianas involucradas en transporte transmembranal, por lo que se ha postulado que su papel es transportar los lipo-oligosacáridos fuera de la célula. Sin embargo, es claro que debe existir otro sistema alternativo para el transporte de estos compuestos ya que las mutaciones en estos genes no bloquean la nodulación y se ha observado la presencia de lipo-oligosacáridos en sobrenadantes de células mutantes en *nodI* de *R. etli* (Evans & Downie, 1986; Vazquez *et al.*, 1992).

Recientemente se ha esclarecido la función bioquímica de los productos de los genes *nodABC*. La proteína NodC muestra homología con algunas quitina sintetasas (Fisher & Long, 1992) por lo que se ha propuesto que su función es sintetizar el esqueleto de N-acetilglucosamina. Sin embargo, aún no está

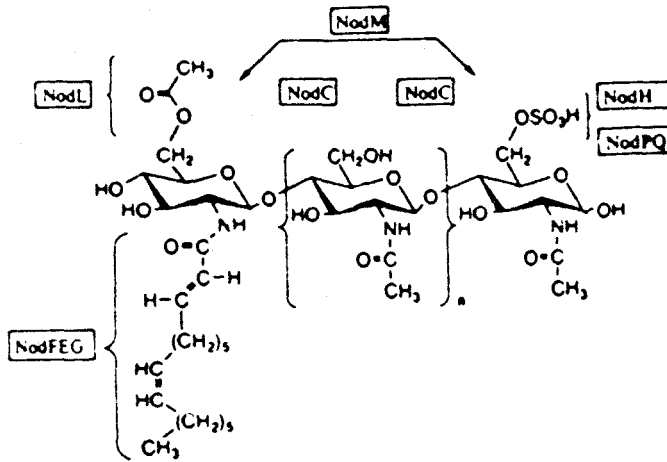
claro como se determina la longitud de la cadena de quitina. La proteína producto del gen *nodB* está involucrada en desacetilar la molécula de N-acetilglucosamina del extremo no reductor del esqueleto de quitina, de modo que en esta posición pueda entrar la parte lipídica del factor de nodulación. Esta parte de la reacción es llevada a cabo por NodA (Fig. 6). Actualmente, se especula que el gen *nodA* no es tan "común" como en un principio se ha clasificado. Esta suposición se basa en la posibilidad de que la proteína codificada por este gen tenga diferentes afinidades por distintos lípidos, de acuerdo a la especie de la cual provenga. Esta hipótesis está siendo explorada actualmente (Spaink, H., comunicación personal).

FUNCION BIOQUIMICA DE LOS GENES *Nod* ESPECIFICOS.

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

En *R. meliloti* los determinantes de especificidad de hospedador más importantes son los genes *nodPQ* y *nodH*. Mutantes de *R. meliloti* en el gen *nodH* pierden la capacidad de nodular a su hospedero normal (alfalfa), pero adquieren la habilidad de nodular veza. Al analizar los lipo-oligosacáridos producidos por mutantes *nodH* se ha descubierto que estas estirpes producen factores a los cuales les falta el grupo sulfato. Estos factores no tienen actividad biológica en raíces de alfalfa pero si en raíces de veza, en concordancia con el fenotipo observado (Roche *et al.*, 1991). Por otro lado, mutantes en los genes *nodPQ* producen una mezcla de lipo-oligosacáridos sulfatados y no sulfatados y son capaces de nodular tanto su huésped normal como al hospedero heterólogo veza. Cabe hacer notar que en *R. meliloti* se han detectado homólogos cromosomales de los genes *nodPQ*, pero estudios con dobles mutantes han demostrado que las copias cromosomales son incapaces de complementar totalmente las

Figura 6.- Papel de algunos de los genes de nodulación en la síntesis de los lipo-oligosacáridos producidos por *Rhizobium*.



Proteína Nod	Función probable	Homología
NodC	N-acetilglucosamina transferasa	Quitina sintasas de levaduras (CHS1, CHS2 y CSD2) y varias celulosa sintasas de hongos
NodE	β -cetoacilsintasa	β -cetoacilsintasas de <i>Escherichia Coli</i> (FabH y FabB, biosíntesis de AG) y varias spp de <i>Streptomyces</i> (codificadas por <i>tcml</i> ORF1 y <i>gal</i> ORF1, biosíntesis de antibióticos poliquétidos)
NodF	Proteína transportadora de acilo	ACP de varios procariontes y eucariontes
NodG	Deshidrogenasa NADH-dependiente β -cetoacilreductasa NADH-dependiente	Ribitol DH (<i>Klebsiella aerogenes</i>), ADH (mosca de la fruta) y GAD3P DH (<i>Thermus aquaticus</i>) β -cetoacilreductasas de aguacate (secuencia parcial de la proteína) y de varias spp de <i>Streptomyces</i> (ej ActIII de <i>S. coelicolor</i>)
NodH	Sulfotransferasa	Sulfotransferasas esteroideas de mamíferos
NodL	Acetiltransferasas	LacA, CysE y LpxA de <i>E. coli</i>
NodM	D-glucosamina sintasa	GlmS de <i>E. coli</i>
NodP	Subunidad de ATP sulfurilasa	CysD de <i>E. coli</i>
NodQ	Subunidad de ATP sulfurilasa	CysN de <i>E. coli</i>

mutaciones en los genes del plásmido simbiótico. Estudios de secuencia han mostrado que los genes *nodPQ* tienen homología con enzimas que sintetizan intermediarios activados de grupos sulfato, mientras que *nodH* presenta homología con algunas sulfotransferasas bacterianas. Así, los productos de estos tres genes han sido propuestos como responsables de la sulfatación del factor de nodulación en *R. meliloti* (Fig. 6).

En *R. leguminosarum* bv. *viciae* los genes más importantes para la especificidad de hospedero son los genes *nodF* y *nodE*. Estos genes están organizados en un operón y son homólogos a una proteína transportadora de grupos acilo y a una cetoacil sintasa, respectivamente (Shearman *et al.*, 1986; Spaink *et al.*, 1989). Se ha demostrado que estas proteínas están involucradas en la síntesis del ácido graso poli-insaturado (C18:4) presente en los factores de *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Por otro lado, estos genes en *R. meliloti* sintetizan un ácido graso de 16 carbonos con 2 o 3 insaturaciones, indicando así que diferentes alelos de *nodFE* pueden sintetizar distintos ácidos grasos dependiendo de la especie a la que pertenezcan (Schultze *et al.*, 1992). Algunos estudios sugieren que estos ácidos grasos son sintetizados por la ruta de los fosfolípidos, ya que se han encontrado algunos de ellos con las mismas insaturaciones que los presentes en los factores de nodulación (Otto Geiger, comunicación personal). En *R. meliloti* se ha descrito otro gen involucrado en la síntesis del ácido graso: *nodG*. Este gen presenta homología con una alcohol deshidrogenasa y con una 3-oxoacil(proteína translocadora de acilos) reductasa (Fisher *et al.*, 1987; Sheldon *et al.*, 1990) (Fig. 6).

nodM es un gen específico que se ha encontrado en *R. meliloti*, en *R. leguminosarum* bv. *viciae* y en *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Presenta homología con la N-acetilglucosamina sintasa de *E. coli* por lo que se ha propuesto la misma función en *Rhizobium* para aportar una mayor cantidad de este precursor para la síntesis de los lipo-oligosacáridos, ya que está regulado por *nodD*. Las mutaciones en este gen tienen muy poca importancia en el fenotipo de nodulación ya que puede ser substituido por un homólogo cromosomal (Baev *et al.*, 1991) (Fig. 6).

En los lipo-oligosacáridos producidos por *R. meliloti*, *R. leguminosarum* bv. *viciae* y en *R. leguminosarum* bv. *trifolii* se ha encontrado la presencia de un grupo O-acetilo en el extremo no reductor de la molécula (Tabla 2). Bloemberg y colaboradores (1992) han demostrado que el producto del gen *nodL* es el responsable de la O-acetilación del oligómero de

quitina, ya que han purificado la proteína a homogeneidad y han comprobado su actividad bioquímica. Aparentemente el lípido presente en el factor de nodulación no es reconocido por esta enzima, ya que un factor de nodulación obtenido a partir de un mutante *nodL*⁻ de *R. meliloti* (y que por lo tanto no está O-acetilado pero contiene el ácido graso de 16 carbonos) es capaz de ser acetilado por NodL de *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Fig. 6).

Existe un gen específico en *R. leguminosarum* bv. *viciae* que no está presente en todas las estirpes de esta especie y que aparentemente no interviene en la modificación directa del factor de nodulación. Este es el gen *nodO*, que presenta homología significativa con una hemolisina de *E. coli* (Downie *et al.*, 1992). Este gen es capaz de complementar la incapacidad de nodular veza de cepas mutantes de *nodFE* de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, aunque no está claro el porqué lo hace. Por otro lado, se ha demostrado que la proteína NodO (que ha sido purificada) es capaz de abrir poros en un sistema de bicapa lipídica que emula la membrana plasmática vegetal. Dado este hecho, se le ha propuesto una función de permear el factor de nodulación a través de la membrana plasmática vegetal.

El gen *nodS* se ha encontrado en varias especies de rizobios lejanamente relacionados como *R. etli*, *A. caulinodans* y *B. japonicum*. Este gen posee homología con metiltransferasas y su función es la de metilar el factor producido por estas especies (Geelen *et al.*, 1993).

Los genes *nodVW* de *B. japonicum* forman un operón sin caja de nodulación y tienen homología con sistemas regulatorios de dos componentes, donde *nodV* probablemente sea el sensor y *nodW* el regulador susceptible a fosforilación (Göttfert *et al.*, 1990). Su papel aún no está claro ya que estos genes son esenciales para la nodulación de ciertas plantas, pero no de otras. El hecho de que no exista caja de nodulación en este operón hace pensar que existen otros circuitos regulatorios que controlan la expresión de los genes *nod* independientemente de *nodD*.

El gen *nolR*, descrito en *R. meliloti* forma parte de la compleja maquinaria de regulación de los genes *nod* y *nol*. Se ha demostrado que este gen se une a la caja de nodulación actuando como represor de la transcripción de *nodD* (Schlaman *et al.*, 1992).

Otros genes *nod* específicos no han sido tan estudiados y se desconoce su papel o se sabe muy poco acerca de él. Por ejemplo, el gen *nodX* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* está involucrado en la nodulación de un cultivar de guisantes (Afganistan peas) y tiene homología con el gen *exoZ*,

involucrado en la síntesis de exopolisacáridos. De forma similar, el gen *nolA* de *B. japonicum* permite a las estirpes portadoras nodular ciertos cultivares de soja (Sadowsky *et al.*, 1991).

En resumen, existen muchas señales involucradas en el establecimiento de la simbiosis. Algunas de estas han sido bien caracterizadas pero otras faltan por elucidar. Una vez se conozcan en detalle todas las señales que intervienen en el proceso, así como los genes que participan, se logrará tener una visión más completa e integrada de la interacción *Rhizobium*-leguminosa.

II.- OBJETIVO DEL TRABAJO

OBJETIVOS

Rhizobium tropici es una estirpe de amplio espectro de hospedador, capaz de nodular un gran número de leguminosas no relacionadas genéticamente. Entre los hospederos más importantes de esta especie se encuentran plantas de gran importancia económica como *Phaseolus*, *Medicago*, *Leucaena* y *Macrottilium*. Esta especie ha sido caracterizada genéticamente y no presenta reiteraciones de los genes *nif*, en contraste con otras especies que también nodulan *Phaseolus* como *R. etli* o *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. También a diferencia de estas especies, el genoma de *Rhizobium tropici* no hibrida con el gen *psi* (involucrado en la regulación de la síntesis de polisacáridos). Los plásmidos simbióticos de diferentes estirpes de esta especie son capaces de promover un eficiente proceso simbiótico cuando son transferidos a *Agrobacterium tumefaciens*, llegando incluso a fijar nitrógeno (Martinez *et al.*, 1985). Las estirpes de *R. tropici* son tolerantes a altas temperaturas y resistentes a condiciones ácidas en el medio (Martinez *et al.*, 1991).

Se han hecho experimentos de competencia inoculando a la vez estirpes de *R. tropici* y *R. etli*. Los resultados muestran que las estirpes de *R. etli* son más competitivas en el sentido de que ocupan mayoritariamente los nódulos formados en *Phaseolus vulgaris*. Sin embargo, en condiciones ácidas del medio, la ocupación del nódulo por *R. tropici* puede ser mejorada (Martinez *et al.*, 1991). Recientemente se ha aislado un cultivar de *Phaseolus vulgaris* que es nodulado preferentemente por *R. tropici*, aún en condiciones en donde la población de *R. etli* sea del 90% (P. Graham, comunicación personal).

Actualmente, *R. tropici* se ha usado, en combinación con bacterias del género *Azospirillum*, como inóculo para árboles de *Leucaena* en un programa de reforestación de la selva baja caducifolia del estado de Morelos, en la República Mexicana (J. Caballero, comunicación personal).

Los mecanismos moleculares por los cuales una determinada especie de *Rhizobium* es capaz de nodular un amplio espectro de plantas aún se desconocen. Cabe suponer que deben de existir factores bacterianos, así como vegetales, involucrados en la síntesis y reconocimiento de señales. Así, del lado del simbiote bacteriano el conjunto de genes de nodulación que posea puede ser determinante para su espectro de hospedero. Si la proteína NodD de determinada especie es capaz de reconocer un gran número de flavonoides habrá más

posibilidades de que esta especie sea capaz de nodular un mayor número de plantas. Así mismo, si contiene un gran número de genes de nodulación específicos será capaz de sintetizar un mayor número de diversos lipo-oligosacáridos aumentando así las posibilidades de que estos sean reconocidos por un mayor número de plantas. Por el lado vegetal, aún se desconocen las barreras de especificidad, pero las lectinas podrían jugar un papel importante. Así mismo, los receptores de los factores de nodulación pudieran ser determinantes para estrechar o aumentar el espectro de nodulación.

En nuestro laboratorio se ha aislado una región del plásmido simbiótico de *R. tropici* CIAT899 que contiene un gran número de los genes de nodulación (ver Vargas, *et al.*, 1990 y RESULTADOS). Este fragmento de ADN fue aislado de un banco genómico total de la cepa CIAT899. Este banco fue introducido a una estirpe derivada de CIAT899 curada del plásmido simbiótico y el producto de la conjugación fue inoculado en masa en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. Sólo aquellas bacterias portadoras de los genes de nodulación serán capaces de formar nódulos. De los nódulos formados en las plantas de judía, se aislaron varios cósmidos sobrelapantes, siendo el más grande y más representativo el cósmido pCV38 (ver Vargas *et al.*, 1990 y RESULTADOS).

El objetivo de este proyecto consiste en el estudio de los genes de nodulación de *R. tropici* CIAT899, algunos aspectos de su regulación a través del gen *nodD*, y su función bioquímica en la síntesis de lipo-oligosacáridos. Así mismo, se estudiaron los lipo-oligosacáridos producidos por esta especie. La importancia de este proyecto estriba en lograr una mejor comprensión de los mecanismos por los cuales una cierta especie es capaz de nodular un gran número de leguminosas no relacionadas filogenéticamente. Por esta razón, este sistema ofrece la posibilidad de descubrir mecanismos muy generales de la interacción planta-bacteria.

III.- MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL Y METODOS

1.- BACTERIAS Y PLASMIDOS.

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

Tabla 3. Bacterias y plásmidos utilizados en este estudio

Cepa bacteriana o plásmido	Características relevantes	Fuente o referencia
I.- Cepas bacterianas		
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>		
RS1051	derivada Rif ^R Spc ^R de la cepa silvestre RS800	Rodriguez-Quiñones y col. (1989)
RS201	derivada de RS1051 con el fragmento <i>EcoRI-HindIII</i> de 0.6 kb	Este trabajo
<i>Rhizobium tropici</i>		
CIAT899	silvestre, Rif ^R , Cm ^R , Amp ^R	Martínez y col. (1985)
RSP900	derivada de CIAT899 curada del pSym, Rif ^R , Cm ^R , Amp ^R	M. Megías
<i>Rhizobium etli</i>		
CE3	derivada Rif ^R de la estirpe silvestre CFN42	C. Quinto
CFN2001	derivada curada del pSym de la estirpe CE3	C. Quinto
<i>Rhizobium loti</i>		
ER1	silvestre de <i>R. loti</i>	H. Spink
<i>Rhizobium</i> sp. GRH2		
GRH2	silvestre aislada de plantas de Acacia	N. Toro

Tabla 3 (continuación)

Cepa bacteriana o plásmido	Características relevantes	Fuente o referencia
<i>Escherichia coli</i>		
HB101	F ⁻ , <i>hsdS</i> , <i>hsdM</i> , <i>pro</i> , <i>leu</i> , <i>thi</i> , <i>gal</i> , <i>lacY</i> , <i>recA</i> , Str ^R	Boyer y Roulland-Dussoix (1969)
JM83	<i>ara</i> Δ (<i>lac-proAB</i>), <i>rpsL</i> (= <i>strA</i>), ø80, <i>lacZ</i> ΔM15	Yanisch-Perron y col. (1985)
II.- Plásmidos		
pVK102	cósmido derivado de pRK290, Km ^R , Tc ^R	Knauf y Nester (1982)
pRK2073	plásmido cooperador Spc ^R	Ditta y col. (1980)
pRK404	plásmido derivado de pRK290, Lac, Tc ^R	Ditta y col. (1985)
pUC19 Perron y col.	plásmido vector, Lac, Amp ^R	Yanisch- (1985)
pBSM13	plásmido vector Lac; Amp ^R	Boehringer Mannheim
pPH1J1	plásmido perteneciente al grupo de incompatibilidad IncP, Gm ^R , Spc ^R , Cm ^R	Hirsch y Beringer (1984)
pPP346	derivado de pLAFR1 llevando las regiones <i>nod</i> "común" y <i>hsn</i> de <i>R. meliloti</i> 41	Putnoky y Kondorosi (1986)
pFR15	derivado de pVK102 llevando las regiones <i>nod</i> "común" y <i>hsn</i> de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> RS1051	Rodriguez-Quiñones y col. (1989)
pFR1504	derivado delecionado Nod ⁺ de pFR15	Rodriguez-Quiñones y col. (1989)
pCV38	inserto de 28,8 kb del pSym de CIAT899 clonado en el sitio <i>HindIII</i> de pVK102	Vargas y col. (1990)
pCV61	inserto de 26.4 kb del pSym de CIAT899 clonado en el sitio <i>HindIII</i> del pVK102	Vargas y col. (1990)

Tabla 3. (continuación)

Cepa bacteriana o plásmido	Características relevantes	Fuente o referencia
pJF611	derivado delecionado en <i>EcoRI</i> del cósmido pCV61	Este trabajo
pJFM1	fragmento <i>HindIII-EcoRV</i> del cósmido pJF611 clonado en el plásmido pBSM13	Este trabajo
pJFM2	fragmento <i>KpnI-PstI</i> del plásmido pJFM1 clonado en pMP220	Este trabajo
pCV3802	fragmento <i>HindIII</i> de 2,4 kb de pCV38 subclonado en pRK404	Vargas y col. (1990)
pCV3804	fragmento <i>HindIII</i> de 6,4 kb (digestión parcial) de pCV38 subclonado en pRK404	Vargas y col. (1990)
pCV3805	fragmento <i>HindIII</i> de 2,4 kb de pCV3804 subclonado en pUC19	Vargas y col. (1990)
pCR1	fragmento <i>HindIII</i> de 3,7 kb de pFR1504 subclonado en pVK102	Sousa y col. (1993)
pCR3827	fragmento <i>EcoRI</i> de 0,52 kb de pCV3805 subclonado en pCR1	Este trabajo
pCR3884	fragmento <i>HindIII-XhoI</i> de 0,62 kb de pCV3805 subclonado en pVK102	Este trabajo
pMP154	<i>nodA::lacZ</i> clonado en pMP190 Cm ^R , Str ^R	Zaat y col. (1987)
pMP281	<i>nodD</i> de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> , Tc ^R , IncP	H. Spaink
pMP2107	<i>nodD, nodL</i> de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> , IncP Tc ^R	H. Spaink
pMP2109	<i>nodD</i> de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> , IncW, Spc ^R	H. Spaink
pMP2112	<i>nodD, nodL</i> de <i>R. leguminosarum</i> <i>viciae</i> , IncW, Spc ^R	H. Spaink
pMP604	<i>nodD</i> FITA, Tc ^R , IncP	H. Spaink

2.- MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Las estirpes de *Rhizobium* se cultivaron a 28°C en medio TY (Beringer, 1974) o en medio mínimo GGM, o GSM y como medio mínimo para la producción de factores de nodulación se usó el medio B⁻ (Spaink, *et al.*, 1992). Las cepas de *E. coli* se cultivaron en medio LB a 37°C (Maniatis y col. 1982).

La composición del medio TY fué la siguiente:

Triptona	5,00.g
Extracto de levadura.....
3,00 g	
CaCl ₂ . 6H ₂ O	0,84.g
H ₂ O dest.	1.l.p.

La composición del medio GGM fué la siguiente:

NH ₄ Cl	1,0.g..
KH ₂ PO ₄	0,2.g...
Glutamato sódico.....	2,0.g
Solución de sales(a).....	100.ml
Solución de FeCl ₃ (b).....	1.ml
Solución de vitaminas(c).....	1.ml
Solución de nutrientes(d).....	1.ml

(a)Solución de sales:

MgSO ₄ . 7H ₂ O	1,0.g
CaCl ₂	0,4.g...
H ₂ O dest.	1.l.p.

(b)Solución de Fe₃Cl:

Fe ₃ Cl	20.g...
H ₂ O dest.	1.l.....

(c)Solución de vitaminas:

Biotina	10.mg.
Tiamina	10.mg.
Ac. pantoténico	10mg
H ₂ O dest.	10ml

(d) Solución de micronutrientes:

MnSO ₄ . 4H ₂ O	0,2200 g
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,0024 g
ZnSO ₄	0,0030 g
H ₃ BO ₃	0,0186 g
Na ₂ MoO ₄	0,0004 g
Citrato férrico	2,5000 g
H ₂ O dest.	c.s.p.1L

La composición del medio mínimo GSM es exactamente igual a la del medio GGM, excepto en el glutamato sódico, que se substituyó por ácido succínico (2,0 g/l).

La composición del medio LB es la siguiente:

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5.g...
NaCl	10.g.....
H ₂ O dest.	1.l.c.s.p.

La composición del medio B⁻ es la siguiente:

Manitol	10.g.....
MgSO ₄	0.55.g..
KNO ₃	0.55.g..
Ca(NO ₃) ₂	1.3.g...
Fe(III)-NaEDTA	33.mg
Biotina	0.2.mg.
Thiamina	5.mg...
Sol. Trazas	1.ml...
H ₂ O dest.	csp. 1L.

La solución de elementos trazas se preparó de la siguiente manera:

MnSO ₄	0.609.g
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.1.g...
H ₃ BO ₃	1.27.g..
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.4.g..
CuSO ₄	0.04.g...
H ₂ O	csp. 1.L..

3.- ANTIMICROBIANOS Y PRODUCTOS QUIMICOS AÑADIDOS A LOS MEDIOS DE CULTIVO

Los antimicrobianos ampicilina, cloramfenicol, espectinomicina, estreptomycin, gentamicina, kanamicina, ácido nalidíxico y neomicina se disolvieron en agua destilada y se esterilizaron por filtración con membrana (nitrato de celulosa) de 0,45 μm de diámetro de poro; la rifampicina se disolvió en metanol, y la tetraciclina en una mezcla a partes iguales de etanol/agua destilada. Todas estas soluciones se conservaron a -20°C hasta su posterior utilización, añadiéndose a los medios a las concentraciones finales abajo indicadas:

Ampicilina.....	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Espectinomicina	80 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Estreptomycin.....	500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (<i>Rhizobium</i>) 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (<i>E. coli</i>)
Kanamicina	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Acido nalidíxico	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Neomicina	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Rifampicina.....	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Tetraciclina.....	15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (<i>E. coli</i>) 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (<i>Rhizobium</i>)

El producto X-gal (Boehringer-Mannheim) se conservó al 2% en dimetil-formamida a -20°C y se añadió a los medios a una concentración final de 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$. El inductor IPTG (Boehringer-Mannheim) se disolvió al 2,5% en agua bidestilada estéril y se conservó a -20°C añadiéndose a los medios de cultivo a una concentración final de 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Los flavonoides naringenina, apigenina 7-hydroxyflavona, chrysin y genisteína se disolvieron en etanol a una concentración de 1.5 milimolar y se conservaron a 4°C . Para ser añadidos al medio de cultivo se diluyeron mil veces quedando a una concentración final de 1.5 micromolar.

4.- ENZIMAS, ISOTOPOS Y KIT

Las endonucleasas de restricción, la enzima T4 ligasa y la fosfatasa alcalina de intestino de ternera se adquirieron en Boehringer Mannheim y se utilizaron según las instrucciones de los suministradores.

El isótopo radiactivo α - ^{32}P -dCTP se adquirió a Amersham Int. en forma de solución acuosa. Los fragmentos de ADN usados como sondas radioactivas se marcaron mediante el sistema "multiprime" utilizando para ello el kit "Multiprime DNA labelling system" (Amersham Int.), siguiendo las instrucciones y recomendaciones de la casa suministradora.

Para la obtención de fragmentos purificados de ADN se utilizaron los kits "Geneclean[®] I y Geneclean[®] II" (Bio 101) siguiendo las instrucciones de los suministradores.

5.-MEDIOS DE CULTIVO PARA PLANTAS

Solución nutritiva usada para el ensayo en plantas de frijol y leucena. Soluciones stock:

A.- Medio Australiano:

H ₃ BO ₃	2,86.g.....
MnSO ₄ . H ₂ O.....	4,06.g...
ZnSO ₄ . H ₂ O	0,44.g..
CuSO ₄ . 5H ₂ O.....	0,15.g.
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂ . 4H ₂ O.....	0,02.g
H ₂ O dest.....	1.l.c.s.p.

B.- Solución deFeEDTA:

FeEDTA	3,45.g..
H ₂ O dest.	1.l.c.s.p.

La solución se esteriliza por filtración.

C.- Solución de CaCl₂:

CaCl ₂ . 6H ₂ O.....	10.g.....
H ₂ O dest.	1.l.s.p.

Para la preparación de 1 litro de solución nutritiva se toman las siguientes cantidades de las soluciones stock:

Medio Australiano	0,25.ml
CaCl ₂	5,00.ml...
KH ₂ PO ₄	0,10.g.....
MgSO ₄ . 7H ₂ O.....	0,10.g.
KCl.....	0,10.g.....
H ₂ O dest.....	1.l.c.s.p.

Se esteriliza en autoclave a 121°C y 1 atmósfera de presión y cuando está frío se le añaden 0,25 ml de FeEDTA.

6.- ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

El ADN purificado, total o digerido, se analizó en geles horizontales de agarosa sumergidos en tampón TBB (Tris-base 89 mM; Na₂EDTA 2,5 mM; H₃BO₃ 89 mM; pH 8,2) y preparados, por lo general, al 1% en el mismo tampón, tal como indican Maniatis y col. (1982). El ADN se visualizó por tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/ml en agua destilada), durante una hora, los geles se destiñeron durante 20 minutos en agua destilada y se observaron en transiluminador de luz ultravioleta a 300 nm, fotografiándose con película Kodak Tri-X Pan 400 ASA y filtro Kodak Wratten N° 23 A.

Los pesos moleculares de los fragmentos de ADN se calcularon según la curva log peso molecular-movilidad, obtenida en función de las distancias de migración de los fragmentos *Hind*III de ADN del estándar λ cI857Sam7 (Boehringer Mannheim): 23,1; 9,4; 6,6; 4,4; 2,3; 2,0; 0,6 y 0,1 kb.

Para el cálculo de pesos moleculares de fragmentos de ADN de tamaño elevado, se empleó como patrón λ/*Xho*I (bandas de 15,0 y 33,5 kb) o una mezcla λ/*Xho*I + λ/*Hind*III, disponiendo dichos patrones en pocillos vecinos a los de las muestras, y empleándose

en este caso geles de agarosa de baja concentración (generalmente 0,6%), mantenidos a 20 - 40 voltios entre 12-20 horas.

Para la realización de mapas físicos de restricción se utilizaron distintas concentraciones de agarosa (0,5%; 1%; 1,5%).

7.- RECUPERACION DE ADN A PARTIR DE LOS GELES

Los fragmentos de ADN se recuperaron de los geles de agarosa mediante dos técnicas 1) electroelución (Maniatis y col. 1982; Maniatis y col. 1989), seguida de purificación con fenol/cloroformo y precipitación con etanol del 96 % y 2) por utilización de los kit "GeneClean[®] I y GeneClean[®] II".

8.- EXTRACCION Y PURIFICACION DE ADN

8.1.- ADN total

El ADN genómico total de las especies de *Rhizobium* se obtuvo por lisis con SDS/pronasa (Sigma), seguida de sucesivas purificaciones con fenol, fenol/cloroformo y cloroformo, precipitación con etanol del 96% y lavado con etanol del 70%, tal y como se describe en Maniatis y col. (1989).

8.2.- ADN plasmídico

8.2.1.- Para plásmidos de *E. coli*

Los plásmidos o cósmidos, tanto a gran escala como en minipreparaciones (a partir de 1 litro o de 1 ml de cultivo respectivamente), se aislaron por el método de lisis alcalina descrito por Maniatis y col. (1989).

En los aislamientos a gran escala, el ADN se purificó adicionalmente por centrifugación en gradiente de CsCl-bromuro de etidio, utilizándose por cada litro de muestra un gradiente de 34 ml, que se centrifugó en un rotor vertical Sorvall TV 850 durante 20 horas, a 39000 rpm y 18°C.

Cuando se precisó una mayor purificación, el ADN obtenido en la primera ultracentrifugación se recuperó del gradiente y se cargó directamente en otro gradiente de 4,5 ml, que se centrifugó a 39000 rpm durante 48 horas en un rotor basculante Sorvall AH650.

Tras la última centrifugación, el bromuro de etidio se extrajo con alcohol isoamilico y el CsCl se eliminó por diálisis prolongada frente a Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 y Na₂EDTA 1 mM. Cuando fue requerido, el ADN se concentró por precipitación con etanol.

8.2.2.- Para plásmidos de *Rhizobium* de bajo peso molecular

Los plásmidos y cósmidos recombinantes contenidos en *Rhizobium* se aislaron por una modificación del método Ish-Horowics y Burke (1981). Las células de 5 ml de cultivo en fase estacionaria temprana se recogieron y lavaron con 150 µl de TEN (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; Na₂EDTA 1 mM; NaCl 100mM) conteniendo 0,1% de sarcosil (Sigma). Después de la centrifugación, las células se resuspendieron en 160 µl de solución I (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; Na₂EDTA 1 mM; glucosa 50 mM; pH 8,0) y se dejaron 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron a continuación 200 µl de solución II (NaOH 0,2 N; SDS 1%) recién preparada y una vez pasado 10 minutos en hielo se adicionaron 250 µl de solución III (acetato potásico 5 M, pH 4,8), dejando la reacción otros 10 minutos en hielo. Una vez centrifugado, el sobrenadante se fenolizó y el ADN se precipitó con etanol de 96% y se lavó con etanol de 70%.

9.- MARCAJE RADIOACTIVO DE LAS SONDAS DE ADN

Por lo general, y para una reacción estándar de 50 µl de volumen final, se marcaron 0,5-1 µg de ADN utilizando 50 µCi de α-³²P-dCTP mediante el kit "Multiprime DNA labelling system". En todos los casos, se consiguieron actividades entre 1x10⁸ y 1x10⁹ cpm/mg de ADN.

Una vez finalizado el tiempo de la reacción de marcaje, dicha reacción se paró por adición de 30 µl de tampón de terminación (16 µl de EDTA 100 mM; 2,5 ml de SDS al 20%; 0,5 µl de ADN de esperma de salmón 20 µg/ml y 11 µl de agua bidestilada). La

eliminación de los nucleótidos no incorporados se llevo a cabo mediante precipitación de la sonda radiactiva con etanol de 96% (-20°C), se centrifugó y la sonda se disolvió en agua bidestilada y se desnaturalizó por adición de 1/10 de volumen de NaOH 3N.

10.- HIBRIDACIONES DE ADN

Las hibridaciones de ADN se realizaron de acuerdo con la técnica descrita por Kondorosi y col. (1982) con mínimas modificaciones.

10.1.- Preparación de las membranas

Los geles de agarosa se desnaturalizaron con NaOH y se neutralizaron con Tris-HCl pH 8,0 como se describe en el manual de Maniatis y col. (1982). El ADN de los geles se transfirió a membranas de nylon (Hybond-N, Amersham Int., 0,45 μ m de diámetro de poro) por capilaridad, siguiendo la técnica de Southern (1975) y utilizando SSC 20X como solución de transferencia (SSC 1X: NaCl 0,15 M; citrato sódico, 0,015 M; pH 7,0).

Una vez efectuada la transferencia, las membranas se lavaron en SSC 2X y se secaron durante 2 horas a 80°C (para lograr la fijación del ADN a la membrana).

10.2.- Prehibridación

Las membranas se prehibridaron durante 12 horas a 42°C en bolsas herméticamente selladas y que contenían aproximadamente 15 ml de tampón de hibridación SSC 3X, 30% de formamida desionizada, SDS al 1%; Na₂HPO₄ 25 mM; NaH₂PO₄ 25 mM; 0,02% de BSA, PVP y Ficoll 400 (Pharmacia) y 500 μ g/ml de ADN de esperma de salmón (Sigma) previamente desnaturalizado con NaOH, desproteinizado con proteinasa K (Boehringer Mannheim) y fenolizado.

10.3.- Hibridación

La hibridación se llevó a cabo durante 24 horas en las mismas condiciones que la prehibridación, pero añadiendo a la solución anterior la sonda radioactiva (10^8 - 10^9 cpm/mg de ADN), previamente desnaturalizado por la adición de 1/10 de volumen de NaOH 3 N.

10.4.- Lavado de las membranas

Tras la hibridación, las membranas se lavaron a temperatura ambiente durante 15 minutos, posteriormente a 55°C durante 30 minutos y por último 30 minutos a temperatura ambiente, en todos los casos con una solución que contenía SDS al 0,1% y SSC 2X.

10.5.- Exposición de las membranas

Una vez secas, las membranas se expusieron sobre película Kodak X-Omat R, con pantalla amplificadora a -70°C durante varios días, al cabo de los cuales se procedió al revelado de las películas utilizando soluciones de revelador y fijador igualmente suministradas por Kodak.

11.- TECNICAS DE TRANSFERENCIA DE ADN

11.1.- Conjugación

11.1.1.- Conjugación en filtro

La conjugación triparental se realizó según la técnica descrita por Ditta y col. (1980). Se mezclaron en la proporción 1:1:0,5 (células donadoras, células receptoras y células portadoras del plásmido ayudador pRK2073) cultivos en fase estacionaria temprana y se filtraron por membrana (de nitrato de celulosa) de 0,45 μ m de diámetro de poro y se depositaron sobre placas de Petri con medio TY. Tras 8 horas de incubación a 30°C, la masa bacteriana se recogió en 5 ml de solución salina estéril al 0,85%,

una vez realizadas la diluciones oportunas se sembró en los medios selectivos apropiados.

11.1.2.- Conjugación en placa

Se realizó directamente en placa de TY mezclando un asa de cultivos frescos en medio rico sólido de células donadoras, receptoras y ayudadores. La mezcla se incubó en las mismas condiciones descritas en el método anterior y los transconjugantes se seleccionaron extendiendo la masa de conjugación directamente sobre placas de medio selectivo hasta la obtención de células aisladas.

11.2.- Transformación

Las células de *E. coli* se hicieron competentes mediante tratamiento con cloruro cálcico en frío. Se tomaron 50 ml de un cultivo de *E. coli* HB101 o JM109 y se incubaron a 37°C con agitación hasta que la D.O.600nm estuvo comprendida entre 0,4 y 0,6. Las células se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos. Los cultivos se resuspendieron en 25 ml de CaCl₂, 100 mM, previamente enfriado en hielo. Después de mantenerlas 10 minutos en hielo, las células se sedimentaron y resuspendieron de nuevo en 5 ml de la misma solución de cloruro cálcico.

Para la transformación se añadieron entre 0,4 y 0,6 µg de ADN por cada 100 ml de células competentes, y se les mantuvo en hielo durante 30 minutos, exponiéndolas luego a un choque térmico de 42°C durante 2 minutos y medio. Posteriormente se añadió 1 ml de LB estéril sin antibiótico y se incubó de 30 a 60 minutos a 37°C para permitir la expresión de los marcadores. Finalmente, las células se concentraron por centrifugación, se resuspendieron en 200 µl de LB estéril, y se sembraron en los medios adecuados para seleccionar los transformantes.

12.- ENSAYOS DE NODULACION

Para los ensayos de nodulación de frijol y leucena se emplearon plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. Negro Jamapa y de

Leucaena esculenta respectivamente. Las semillas fueron amablemente proporcionadas por el Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Debido a su dureza, las semillas de *L. esculenta* se calentaron en agua a 80°C durante 10 minutos antes de proceder a su esterilización superficial. Las semillas de frijol y leucena se esterilizaron superficialmente mediante el tratamiento con etanol del 96% durante 3 minutos y lejía comercial diluída al 20% durante 15 minutos, tras lo cual se enjuagaron abundantemente con agua destilada ésteril.

Todas la semillas se dejaron germinar a 25°C en placas de agar-agua (9 g de agar/1 de H₂O dest.) durante el tiempo que fue necesario según el tipo de semilla.

Una vez germinadas, las semillas se colocaron en recipientes estériles que contenían vermiculita empapada en solución nutritiva de plantas, adecuada para cada tipo de semilla. Las semillas de frijol y leucena se colocaron 2 semillas por frasco. Las semillas germinadas se inocularon con 1 ml de una suspensión bacteriana que contenía aproximadamente 10⁸ células/ml. Cuando las plantas se elevaron un centímetro sobre la superficie, se cubrió la vermiculita con una capa de arena parafinada ésteril. Los recipientes con las plantas inoculadas se mantuvieron en una cámara de plantas a 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

La presencia o ausencia de nodulación se analizó periódicamente, dándose por finalizado el ensayo, en el caso de frijol a las 2 semanas y leucena a las 4 semanas

13.- PREPARACION DE EXUDADOS DE RAIZ DE *PHASEOLUS VULGARIS* Y *LEUCAENA ESCULENTA*

Los exudados radicales de *Phaseolus vulgaris* L. y *Leucaena esculenta* se obtuvieron siguiendo el método de Zaat *et al.*, (1987). Los exudados radicales estériles se concentraron 10 veces usando vacío a 0°C y se usaron como stocks para ser añadidos al medio de cultivo diluyéndose diez veces.

14.-DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE β -GALACTOSIDASA

Los ensayos de β -galactosidasa se llevaron a cabo de acuerdo con la técnica de Zaat *et al.* (1987). Los flavonoides naringenina, apigenina y genisteina fueron añadidos a una concentración final de 1.5 micromolar. Los cultivos se hicieron en medio mínimo GSM y después de 12 horas de cultivo se concentraron 10 veces en una solución de MgSO_4 10mM. De esta solución se usó 0.1 ml para la determinación de acuerdo al método de Miller (1972). Los ensayos se hicieron por triplicado, mostrando una desviación estándar de menos del 20%.

15.- ANALISIS POR CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA (TLC)

Los análisis por cromatografía en Capa Fina se llevaron a cabo de acuerdo al método de Spink *et al.* (1992). Las distintas especies de *Rhizobium* fueron cultivadas en un mililitro de medio B⁻ con el antibiótico apropiado y para el marcaje radioactivo se añadieron los siguientes compuestos: 25 μCi de acetato ^{14}C (actividad específica 45-60 mCi/mmol NEC-084 obtenido de New England Nuclear, Boston, MA) ó 100 μCi de MgSO_4 ^{35}S (actividad específica 602 mCi/mmol obtenido de Amersham Int.) ó 0.5 μCi de hidrocloreuro de glucosamina ^{14}C (actividad específica de 52 mCi/mmol, obtenida de Amersham Int.) ó 1 μCi de L-(methyl- ^{14}C) metionina (actividad específica 55 mCi/mmol, obtenida de Amersham Int.). Como inductor de la síntesis de lipo-oligosacáridos se usó naringenina a una concentración final de 1.5 micromolar en todos los casos en donde se indica. Después de 12h horas de cultivo, se añadió 0.5 ml de n-butanol saturado en agua destilada y se incubó esta mezcla durante un mínimo de 4h. El n-butanol fue recuperado y evaporado totalmente. El polvo resultante se resuspendió en 40 μl de n-butanol saturado en agua y se aplicaron 5 μl de esta solución a la placa de Cromatografía en Capa Fina de fase reversa de sílica C18 (ODS:100% octadecyl silanization) obtenida de la compañía Sigma. La separación de los factores de nodulación se llevó a cabo mediante el uso de acetonitrilo al 50% en agua (v/v) como fase móvil. Las placas de TLC fueron expuestas en película radiográfica Kodak X-Omat R durante 15 días al cabo de los cuales se procedió al

revelado de las películas utilizando soluciones de revelador y fijador igualmente suministradas por Kodak.

16.- ANALISIS POR HPLC DE LOS FACTORES DE NODULACION

Para el análisis de los factores de nodulación producidos por *Rhizobium tropici* se cultivó la estirpe CIAT899/pMP604 en 6 litros de medio B⁻ y al cabo de 12h de cultivo a 28°C se añadieron 3 litros de n-butanol. Esta mezcla se incubó durante 12 horas y se procedió a la separación de las fases acuosa y butanólica por centrifugación en una centrífuga Sorvall usando el rotor Sorvall AH650 durante 20 minutos a 5000 r.p.m. El extracto butanólico fue evaporado en su totalidad usando un rotaevaporador y el polvo resultante se resuspendió en una solución de acetonitrilo/agua al 40% (v/v). Esta solución se mantuvo a 4°C hasta su posterior uso.

En un paso de pre-purificación, 20 ml de la solución de acetonitrilo al 40% se diluyeron a una concentración del 20% de acetonitrilo/agua mediante la adición de un volumen de agua bidestilada. Una vez al 20%, los 40 ml resultantes se pasaron por una columna Baker sílica C18 en donde los lipo-oligosacáridos quedan atrapados de acuerdo a sus características de hidrofobicidad. Después se procedió a eluir los factores de nodulación usando concentraciones crecientes de acetonitrilo/agua (40%, 60% y 80%). Las distintas fracciones se inyectaron al HPLC por una columna de fase reversa (5µm, 4 x 250 mm Pharmacia LKB) usando 30/70 acetonitrilo/agua como fase móvil con un flujo de 0.7 ml/min. Los compuestos fueron subsecuentemente fraccionados aumentando la concentración de acetonitrilo/agua a una proporción de 40/60 después de media hora de usar la solución 30/70. La detección de los factores de nodulación se llevó a cabo usando una longitud de onda de 206 nm.

Los diferentes picos de absorción se recolectaron y el solvente fue evaporado en su totalidad. El material resultante se resuspendió en 0.5 ml de acetonitrilo/agua a una concentración de acuerdo a su patrón de elución (30/70 acetonitrilo/agua para los picos 1-6 y 40/60 acetornitrilo/agua para los picos 7 y 8). Estas muestras fueron enviadas para su análisis por espectrometría de masas.

17.-ANALISIS DE LOS FACTORES DE NODULACION POR ESPECTROMETRIA DE MASAS

Los factores de nodulación purificados según el método descrito en el apartado anterior, fueron enviados para su análisis por espectrometría de masas a la Universidad de Utrech, Holanda en colaboración con la Dra. Jane Thomas Oates. El método utilizado es el que aparece publicado por Spaink, *et al* en 1991.

Los espectros de masas FAB (Fast Atom Bombardment) se obtuvieron en el modo de iones positivos en un espectrometro de masas en tandem JEOL JMS-SX/SX102A usando un voltaje de aceleración de 10kV. El disparador FAB se operó a 6kV con una corriente de emisión de 10mA usando xenon como gas bombardeante. Los espectros se leyeron a una velocidad de 30 s y se recogieron y procesaron en un sistema de datos Hewlett Packard HP9000 usando un software complementario JEOL. Los espectros de masas en tandem se obtuvieron con el mismo instrumento usando helio como gas de colisión. De uno a tres ml de muestra se cargaron en solución de thioglycerol.

IV.- RESULTADOS

RESULTADOS

a) LOCALIZACION FISICA DE LOS GENES DE NODULACION DE *RHIZOBIUM TROPICI* CIAT899

En nuestro laboratorio, se ha aislado una región de ADN del plásmido simbiótico de *R. tropici* CIAT899 en donde se encuentran varios genes de nodulación. Este clon (pCV38, Fig.7) fue aislado por su capacidad de complementar el fenotipo de nodulación a una cepa curada del plásmido simbiótico derivada de CIAT899 (RSP900, Tabla 3) y consta de un fragmento de 29 kb en el cual no se encuentran los genes de fijación de nitrógeno por lo que produce nódulos Fix⁻ (Vargas *et al.*, 1990).

Usando sondas heterólogas marcadas radioactivamente (Tabla 4) se han localizado por la técnica de Southern los siguientes genes de nodulación en el cósmido pCV38: *nodABCDEFGHIJ* (Vargas *et al.*, 1990) *nodMN*, *nodFE*, *nodH*, *nodPQ*, *nodSU* y *nodD* (Fig. 7).

Tabla 4.- SONDAS UTILIZADAS PARA LA LOCALIZACION DE GENES DE NODULACION.

ESPECIE DONADORA	SONDA	REFERENCIA
<i>Rhizobium. meliloti</i>	<i>nodD, nodP, nodQ, SyrM</i> y <i>nodH</i>	Long <i>et al.</i> , 1989
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	<i>nodABCDEFGHIJ, nodLMN</i> y <i>nodFE</i>	Downie <i>et al.</i> , 1985
<i>Rhizobium etli</i>	<i>nodSU</i>	C. Quinto

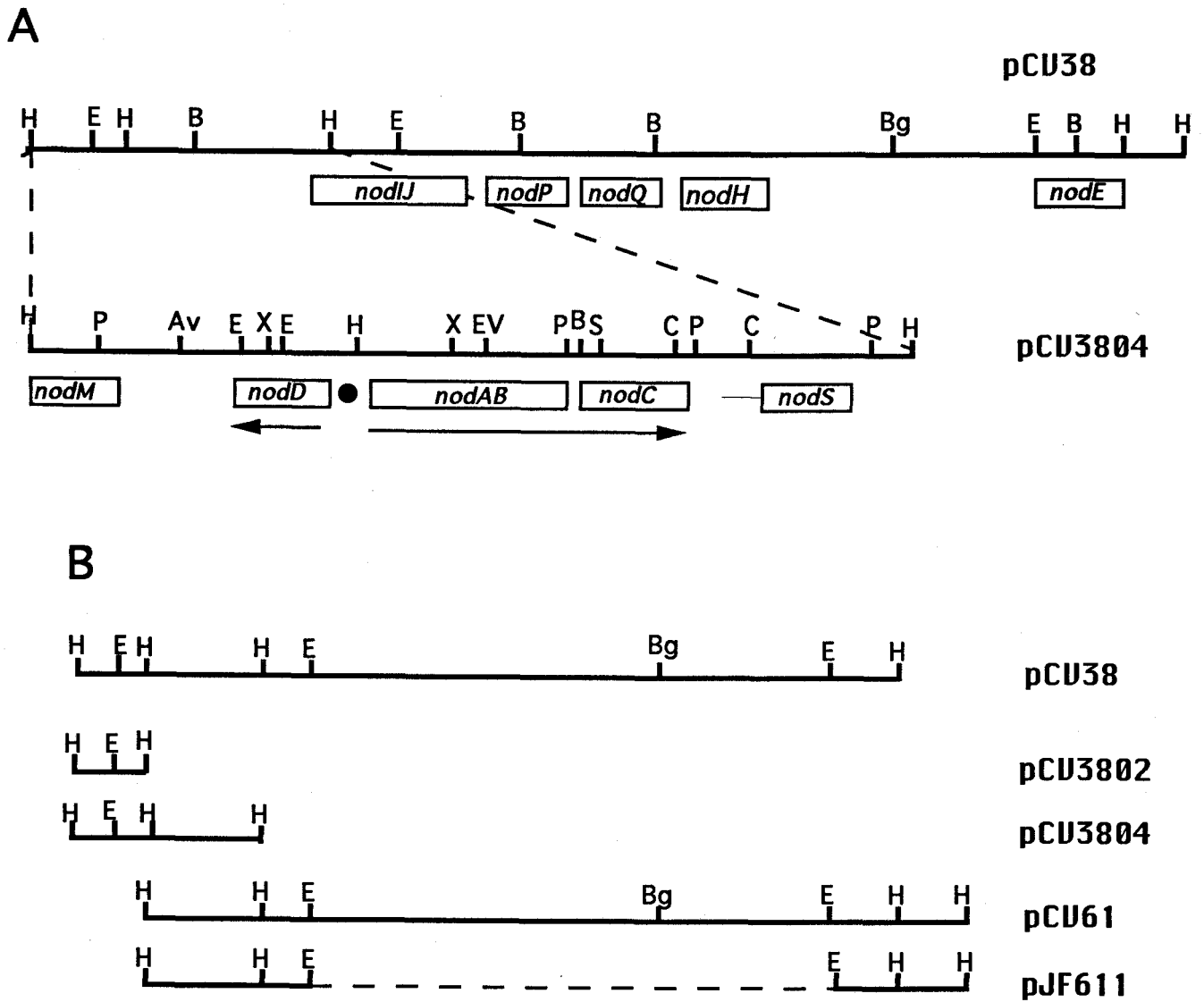


Figura 7.- A). Localización de los genes de nodulación en los cósmidos pCV38 y pCV3804. El punto indica una caja de nodulación. B). Otros cósmidos usados en este trabajo. B, *Bam*HI; H, *Hind*III; E, *Eco*RI; Bg, *Bg*II; EV, *Eco*RV; C, *Cl*I; P, *Pst*I; X, *Xho*I; Av, *Ava*I; S, *Sal*I.

La figura 8 muestra la hibridación correspondiente a la sonda *nodMN* de *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Pueden observarse señales de hibridación en el cósmido pCV3805.

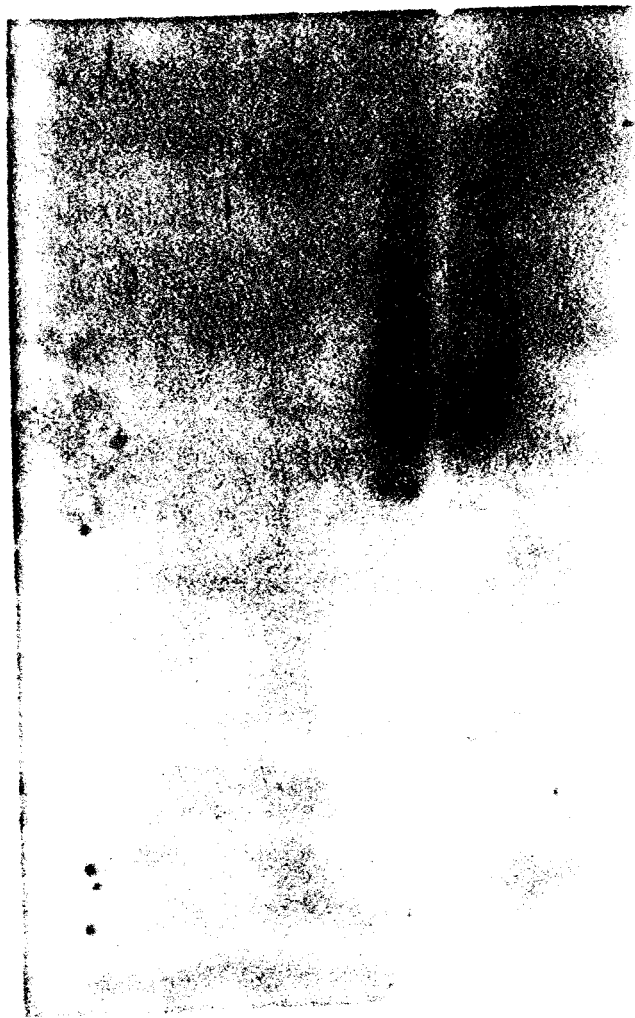


Figura 8.- Hibridación del plásmido pCV3805 contra la sonda *nodM* de *R. meliloti*. Carril 1: Digestión con *HindIII-PstI*, carril 2: digestión con *HindIII-XhoI*.

La figura 9 muestra la presencia de los genes *nodPQ* (A y B) y del gen *nodH* (C) en el cósmido pCV38 y en ADN total de la estirpe silvestre CIAT899. Puede observarse también la existencia de una copia cromosomal en la estirpe RSP900 del gen *nodP* (Figura 9 A carril 2).

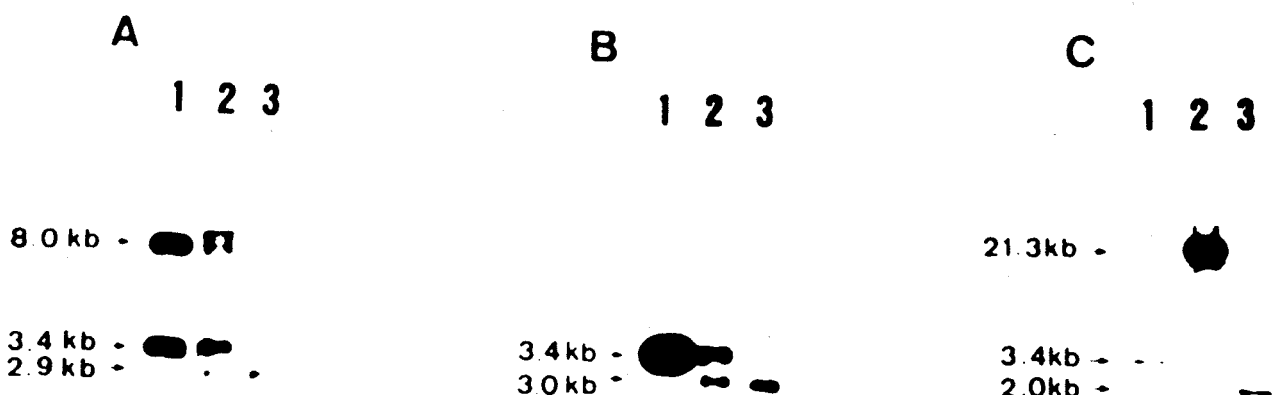


Figura 9.- Hibridación de ADN de *R. tropici* contra las sondas *nodH*, *nodP* y *nodQ* de *R. meliloti*. A).- *nodP*, carril 1: ADN total de CIAT899 digerido con *Bam*HI; carril 2: ADN total de RSP900 digerido con *Bam*HI y carril 3: pCV38 digerido con *Bam*HI. B).- *nodQ*, carril 1: ADN total de CIAT899 digerido con *Bam*HI; carril 2: ADN total de RSP900 digerido con *Bam*HI y carril 3: pCV38 digerido con *Bam*HI. C).- *nodH*, carril 1: ADN total de *R. meliloti* digerido con *Bam*HI; carril 2: pCV38 digerido con *Hind*III y carril 3: pCV38 digerido con *Bam*HI.

Usando una sonda de los genes *nodSU* de *R. etli*, se ha demostrado la presencia de estos genes en los cósmidos pCV38 y pCV3804 (Figura 10).

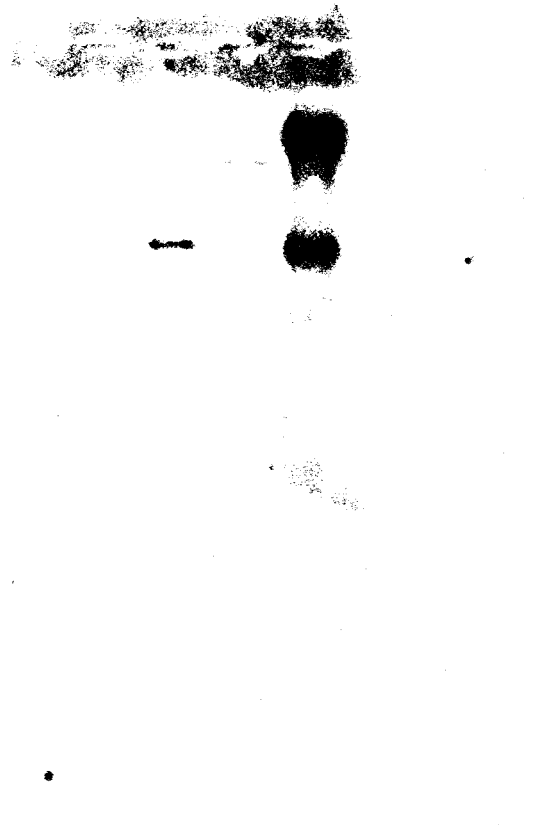


Figura 10.- Hibridación de los cósmidos pCV38 y pCV3804 contra la sonda *nodS* de *Rhizobium etli* CE3. carril 1: pCV38 digerido con *HindIII*; carril 2: pCV38 digerido con *BamHI* y carril 3: pCV3804 digerido con *HindIII*.

El gen *nodF* también se ha detectado en la misma región que el gen *nodE* (Vargas, *et al.*, 1990) en concordancia con estudios llevados a cabo en otras estirpes por lo que probablemente también se encuentren formando un operón (Figura 11).

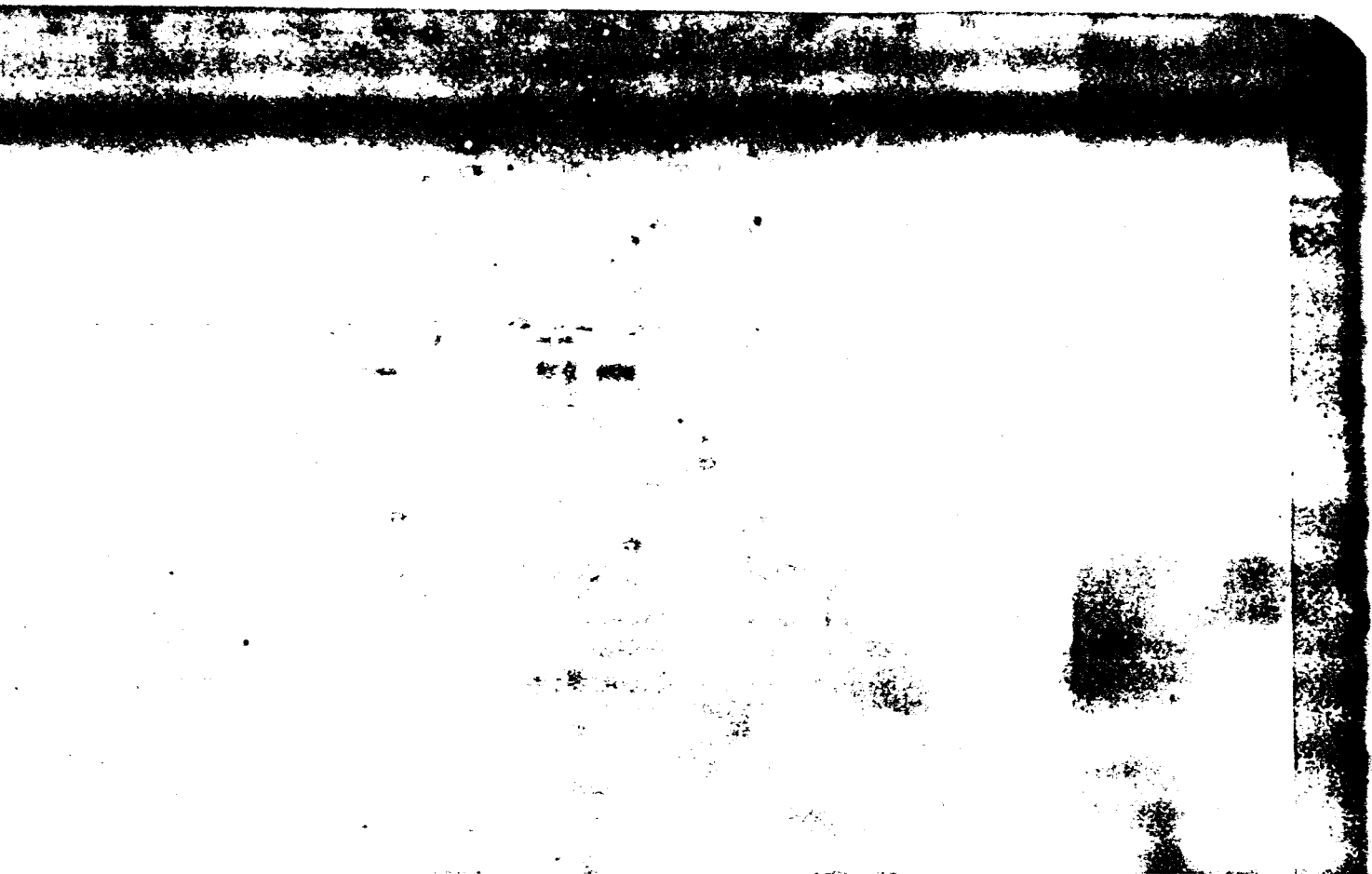


Figura 11.- Hibridación de ADN de *R. tropici* CIAT899 contra la sonda *nodF* de *R. meliloti*. Carril 1: pCV38 digerido con *EcoRI*; carril 2: pCV38 digerido con *BamHI*; carril 3: pCV3805 digerido con *HindIII*; carril 4: pCV61 digerido con *BamHI* y *EcoRI*; carril 4: pJF611 digerido con *HindIII* y *BamHI*.

A partir del cósmido pCV38 se han generado varios subclones encontrándose que la región mínima capaz de complementar el fenotipo de nodulación de la cepa curada RSP900 se encuentra representada por el cósmido pCV3804 y contiene los genes *nodMN*, *nodD* y *nodABCSU* (Fig. 7). La presencia de estos genes en la estirpe CIAT899 concuerda con la estructura química de los factores reportados en esta Tesis y para la estirpe CFN299 de *R. tropici*, ya que estos son quitopentasacáridos (*nodABC*), sulfatados (*nodPQ* y *nodH*) y metilados (*nodS*) (ver más adelante y Poupot *et al.*, 1993).

Así mismo cuando el cósmido pCV38, así como ADN total de *R. tropici* fueron hibridados contra sondas de *syrM* y *nodL*, no se detectó señal alguna indicando así que probablemente esta estirpe carezca de estos genes (datos no mostrados). El hecho de no haber detectado el gen *nodL* en esta estirpe, también concuerda con la estructura química de los factores de nodulación reportados para *R. tropici*, ya que estos carecen del grupo O-acetilo en el extremo no reductor del lipooligosacárido (ver más adelante y Poupot *et al.*, 1993).

Como se ha mencionado en la Introducción, algunas especies de rizobios contienen en su genoma más de una copia del gen *nodD*. Así, decidimos explorar el número de copias de este gen en *R. tropici*, ya que en otras especies que nodulan judías como *R. etli* y *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* se han descrito varios alelos del gen *nodD* (Johnston *et al.*, 1988). En la Figura 12 se muestra una hibridación de genoma total de *R. tropici* contra una sonda que consta del fragmento *EcoRI-HindIII* de 0.6 kb del plásmido pCV3802 y en donde se encuentra parte del gen *nodD* homólogo (Fig. 7). Como puede observarse, se detectan 4 copias de este gen en el genoma de *R. tropici*. Una de estas copias está presente en el cósmido pCV38 y algunos de sus subclones. Por otro lado, al aislar la región de nodulación de *R. tropici* CIAT899, se aisló un cósmido que también da señal de hibridación con la sonda antes mencionada. Este cósmido se denominó pCV64 y no sobrelapa con el cósmido pCV38. Al volver a comprobar su fenotipo de nodulación en la estirpe RSP900 este resultó ser Nod⁻, ya que no contiene ninguno de los demás genes de nodulación (Fig. 7). Dado que la señal de hibridación en este caso se encuentra en un fragmento *HindIII* interno en el cósmido, es de suponerse que el gen *nodD* presente en el cósmido pCV64 está completo.

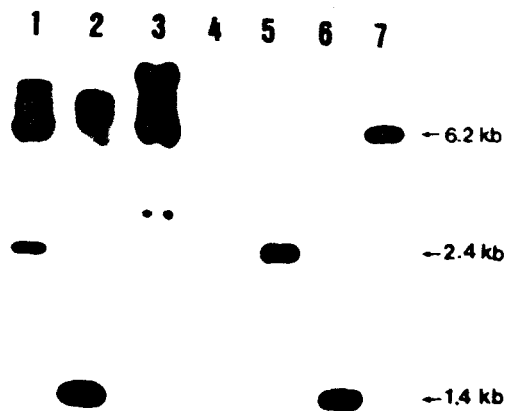


Figura 12.- Hibridación de ADN de *R. tropici* contra la sonda *nodD* homóloga (fragmento *HindIII-EcoRI* del plásmido pCV3802). carril 1: ADN total de CIAT899 digerido con *HindIII*; carril 2: ADN total de CIAT899 digerido con *XhoI*; carril 3: ADN total de CIAT899 digerido con *EcoRI*; carril 4 ADN total de RSP900 digerido con *HindIII*; carril 5: pCV38 digerido con *HindIII*; carril 6: pCV38 digerido con *XhoI* y carril 7: pCV38 digerido con *EcoRI*.

b) ACTIVIDAD INDUCTORA DE LA PROTEINA NodD

Se ha descrito ya en el apartado a) de esta Tesis, la localización de una copia del gen *nodD* en el cósmido pCV38; sin embargo, al utilizar una sonda homóloga (el fragmento *Eco* RI-*Hind*III de 0.6 kb del cósmido pCV3804 que contiene parte del gen *nodD*, (Fig.7) para hibridar contra genoma total de la estirpe CIAT899, se han localizado otras tres copias del gen *nodD* en esta cepa (Fig. 12)

Como se mencionó en la Introducción, el producto del gen *nodD* interactúa con flavonoides para activar la transcripción de los genes de nodulación. Dado que este es uno de los pasos importantes para determinar la especificidad de hospedador, se estudió la actividad inductora de la proteína NodD codificada por el cósmido pCV38 en respuesta a varios flavonoides. Para esto, se utilizó un sistema en el cual se ha fusionado el gen reportero *lacZ* al promotor del gen *nodA* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* (plásmido pMP154, Tabla 3), de modo que si la proteína NodD responde al flavonoide, activa la transcripción a partir del promotor de *nodA* y puede medirse la actividad de β -galactosidasa. Con este sistema se han probado dos clonas portadoras de un gen *nodD* de *R. tropici* CIAT899: el cósmido pCV38 y el plásmido pCV3802 (Tabla 3, Fig 7). Estas clonas fueron probadas con varios flavonoides para determinar cual o cuales de ellos funcionan como activadores en esta estirpe de amplio espectro de hospedador. La Tabla 5 muestra los resultados obtenidos usando los flavonoides naringenina, apigenina, genisteína, chrysin y 7-hydroxyflavona, así como exudados radicales de dos hospederos: *Phaseolus vulgaris* y *Leucaena esculenta*. El gen *nodD* de CIAT899 es capaz de responder positivamente a todos estos inductores mostrando una activación de 10 veces aproximadamente, con excepción de la genisteína al cual no responde. Al inducir los cultivos con exudados radicales de *Phaseolus* o *Leucaena*, también se observa una inducción de la actividad de β -galactosidasa de entre 7 y 9 veces, sugiriendo así que este gen *nodD* es el responsable de la inducción de los genes de nodulación en *R. tropici* CIAT899 (Tabla 5).

Por otro lado, también se probó la funcionalidad del gen *nodD* presente en el cósmido pCV64 (Fig. 7). Como puede observarse en la Tabla 5, este cósmido es incapaz de inducir la actividad de β -galactosidasa, aún en el caso de usar exudados radicales de las plantas hospederas como inductores. Este resultado indica que esta copia del gen *nodD* o bien no es

funcional, o tal vez esté involucrada en la regulación del gen *nodD* funcional presente en el cósmido pCV38.

Tabla 5. ACTIVIDAD INDUCTORA DE DIFERENTES CLONES PORTADORES DEL GEN *nodD* ANTE DISTINTOS FLAVONOIDES

Actividad de β -galactosidasa (nmol/min/OD ₆₅₀ ml)				
Flavonoide Inductor	pMP154 (control)	pCV38	pCV3802	pCV64
ninguno	29	30	28	31
Naringenina	38	311	296	34
Apigenina	35	377	256	32
Genisteina	31	36	25	38
7-hydroxyflavona	19	326	N.D*	35
Chrysin	22	533	N.D	29
Exudado de Frijol	21	197	92	29
Exudado de Leucaena	25	182	80	27

* No Determinado

c) EXTENSION DEL ESPECTRO DE NODULACION POR UN FRAGMENTO DE ADN QUE CONTIENE LA REGION AMINO TERMINAL DE *nodD* Y UNA CAJA DE NODULACION.

Previamente, en nuestro laboratorio se identificaron dos subclones del cósmido pCV38 que al ser introducidos en la estirpe CE3 de *R. etli* extienden su espectro de nodulación a plantas de *Leucaena*. Así mismo, estos subclones son capaces de extender el espectro de nodulación a la estirpe silvestre de *R.*

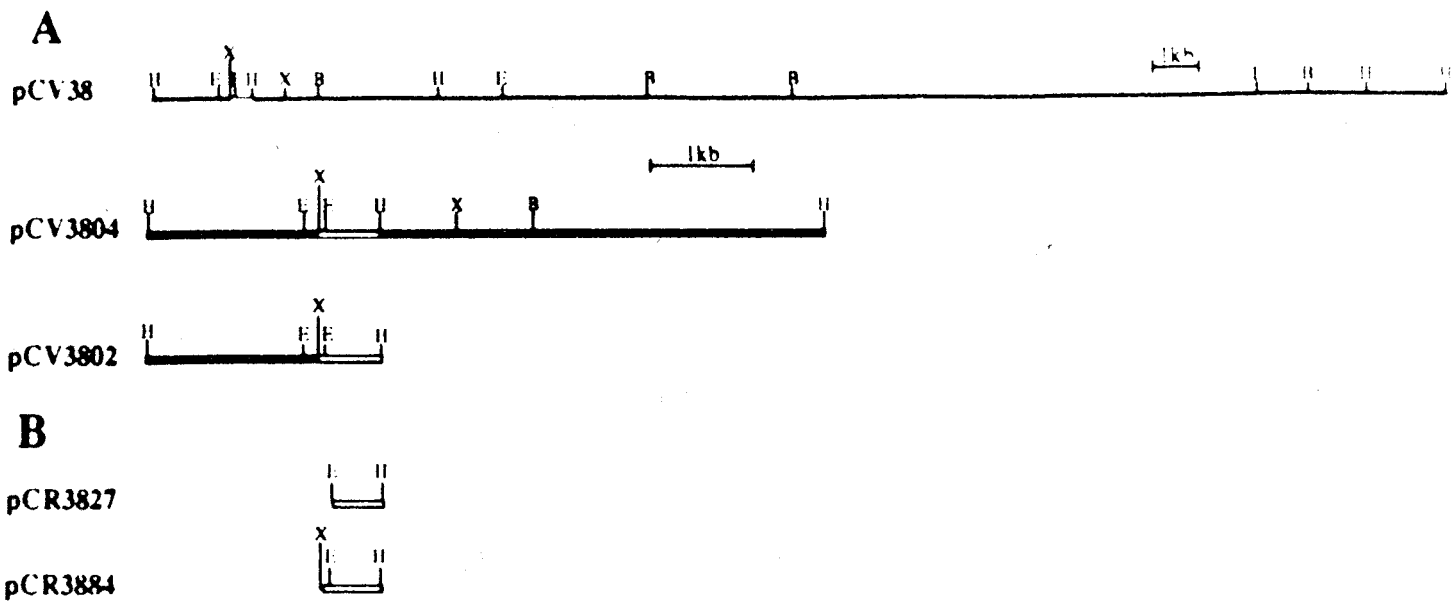


Figura 13.- Cósmidos utilizados en el estudio de ampliación de espectro de nodulación. A) pCV38, pCV3804 y pCV3802. B).- pCR3827 y pCR3884. Las abreviaturas de los sitios de restricción corresponden a las usadas en la Figura 7.

leguminosarum bv. *trifolii* RS1051 para nodular plantas de *Phaseolus vulgaris* (Vargas *et al.*, 1990). Estos subclones decidimos introducir este fragmento de ADN a las estirpes CE3 (pCV3804 y pCV3802) se sobrelapan en un fragmento *EcoRI-HindIII* de 0.52 kb (Fig. 13A) por lo que presumiblemente la información responsable de la extensión de espectro de nodulación está codificada en dicho fragmento. Por este motivo, decidimos introducir este fragmento de ADN a las estirpes CE3 y RS1051 para verificar el fenotipo de extensión de espectro de nodulación a plantas de *Leucaena* y *Phaseolus*, respectivamente. Para esto se usaron dos estrategias distintas: una de ellas fue introducir esta región en los cósmidos pCR3884 (en CE3 y RS1051) y pCR3827 (en RS1051) (Fig. 13B). La otra fué integrar el fragmento *EcoRI-HindIII* de 0.52 kb en el plásmido simbiótico de la estirpe RS1051.

El cósmido pCR3884 se construyó clonando un fragmento *HindIII-XhoI* de 0.62 kb. obtenido del plásmido pCV3805 en el cósmido pVK102 (Fig. 14). Esta construcción se introdujo en las estirpes CE3 y RS1051 y las cepas resultantes fueron probadas en su habilidad para nodular plantas de *Leucaena esculenta*, *Phaseolus vulgaris* y *Trifolium subterraneum*. La Tabla 6 muestra los fenotipos de nodulación de este experimento. Los nódulos formados en plantas de *L. esculenta* por la estirpe CE3/pCR3884 son pequeños y blancos, además de que su número es muy reducido. Por otro lado, la estirpe RS1051/pCR3884, es capaz de nodular plantas de *P. vulgaris* pero no de *L. esculenta*. También en este caso, los nódulos formados en plantas de judía son pequeños, blancos y poco abundantes (unos 10 por planta) (Fig. 15, Tabla 6). El hecho de introducir este fragmento de ADN en las estirpes CE3 y RS1051 no afecta su espectro de nodulación en sus plantas hospederas habituales (judía y trébol, respectivamente).

Además del fenotipo descrito, es de hacerse notar que la cepa silvestre CIAT899 tarda unos 15 días en formar nódulos completamente desarrollados, mientras que la estirpe RS1051/pCR3884 nunca llega a formar nódulos del mismo tamaño ni color y tarda unos 30 días en nodular plantas de *Phaseolus*.

Estos resultados indican que un fragmento de 0.5-0.6 kb aproximadamente de *R. tropici* CIAT899, es suficiente para extender el espectro de nodulación de *R. etli* CE3 y *R. leguminosarum* bv. *trifolii* RS1051 a plantas no hospederas habituales como lo son *L. esculenta* y *P. vulgaris*, aunque los nódulos formados son mucho más pequeños y menos abundantes que los formados por la estirpe silvestre CIAT899.

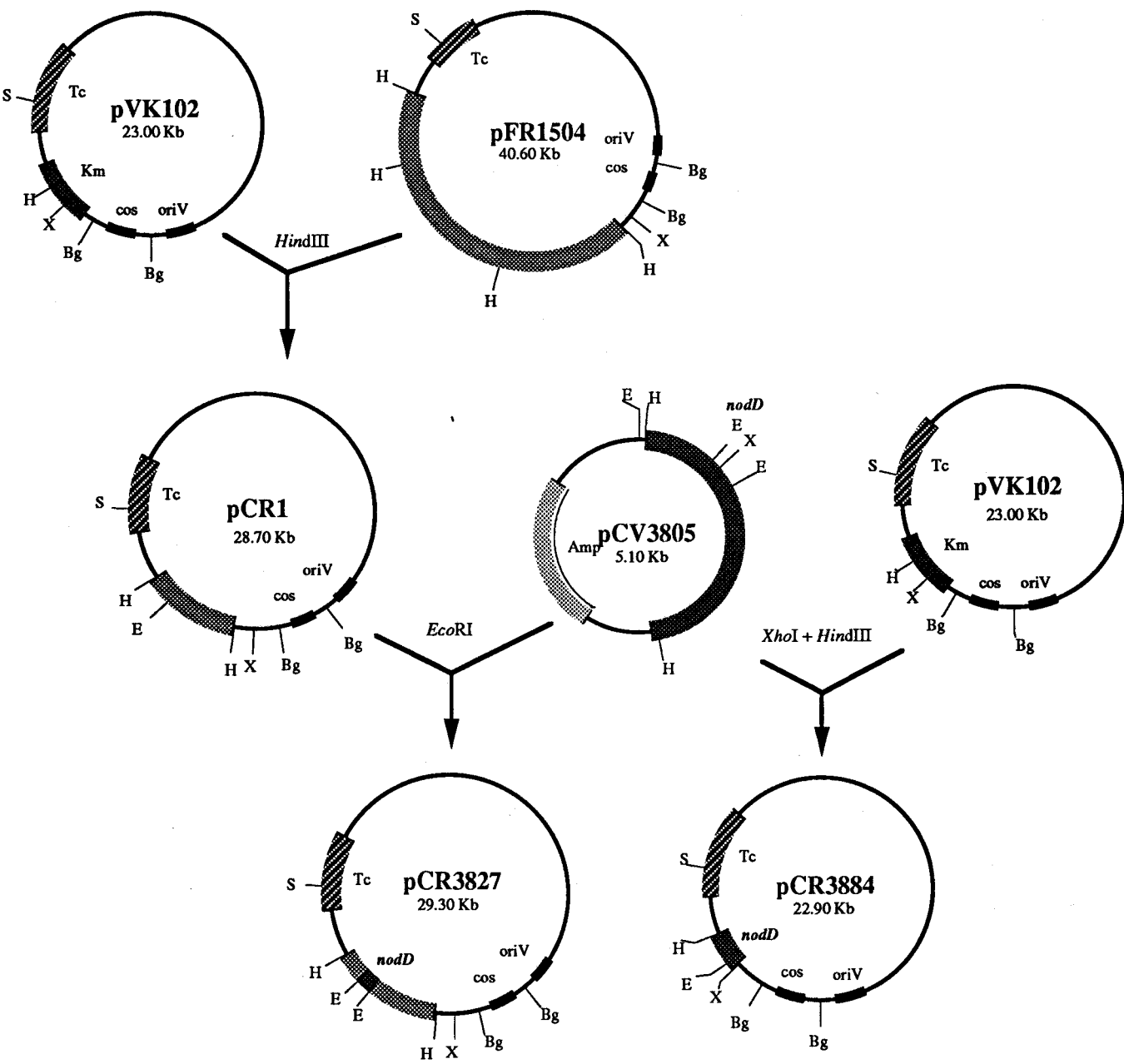


Figura 14.- Construcción de los plásmidos pCR3827 y pCR3884.

Tabla 6.- Fenotipos de Nodulación en Plantas de *P. vulgaris*, *L. esculenta* y *T. subterraneum* de las cepas RS1051 de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, RSP900 de *R. tropici* y CE3 de *R. etli* portando distintos clones

Clona Introducida	Estirpe Receptora								
	RS1051			RSP900			CE3		
	Trébol	Frijol	Leucena	Trébol	Frijol	Leucena	Trébol	Frijol	Leucena
ninguna	+	-	-	-	-	-	-	+	-
pCV38	+	+	+	-	+	+	-	+	+
pCV3802	+	+ ^a	-	-	-	-	-	+	+ ^a
pCR3827	+	+ ^a	-	-	-	-	-	+	+ ^a
pCR3884	+	+ ^a	-	-	-	-	-	+	+ ^a
RS201	+	+	-	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D.	N.D

N.D. No Determinado, ^a Nódulos blancos y pequeños.

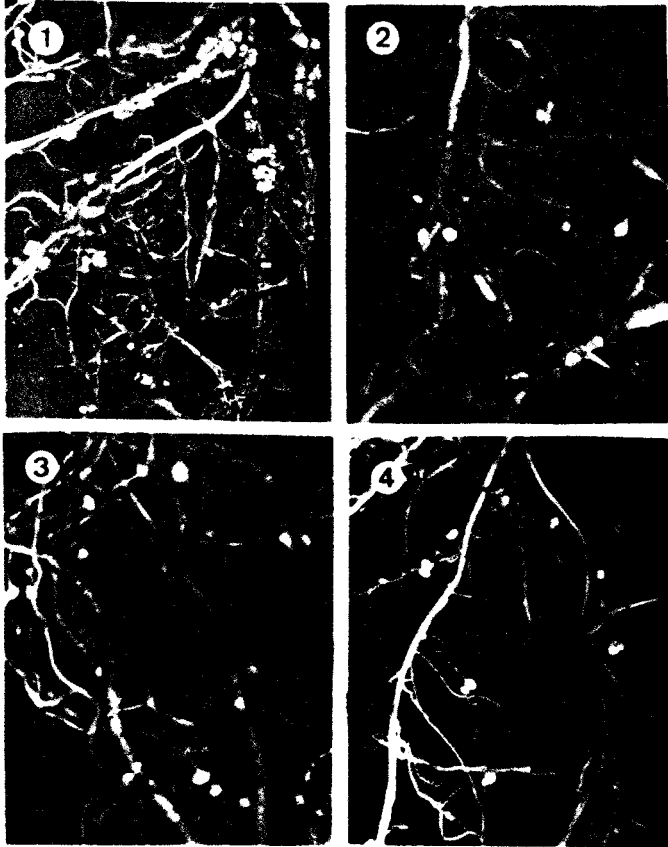
Para descartar un efecto del número de copias del fragmento de 0.62 kb. en el fenotipo observado, decidimos integrar un fragmento similar en el plásmido simbiótico de la estirpe RS1051. Para tal efecto se construyó el cósmido pCR3827 a partir del cósmido pFR1504 (Rodríguez Quiñones *et al.*, 1989), el cual contiene una región del plásmido simbiótico de la estirpe RS1051 (Fig. 14). Un fragmento de 3.7 kb presente en el cósmido pFR1504 que no muestra ningún fenotipo en la nodulación fue clonado en el vector pVK102 (resultando el cósmido pCR1) y también en un pUC19 para facilitar su análisis de restricción. Este fragmento de 3.7 Kb contiene un sitio único para la enzima de restricción *EcoRI* en el cual fue clonado un fragmento *EcoRI-EcoRI* obtenido del plásmido pCV3805 dando como resultado el cósmido pCR3827 (ver Fig. 14).

El cósmido pCR3827 fue entonces introducido por cruce triparental a la estirpe RS1051 y las transconjugantes fueron probadas para nodulación en plantas de *T. subterraneum*, *P. vulgaris* y *L. esculenta* (Tabla 6), mostrando resultados muy similares a los obtenidos con el cósmido pCR3884. Por otro lado, el fragmento de 0.52 kb se integró en el plásmido simbiótico de la estirpe RS1051 por marcador de cambio al introducirse el plásmido pPH1 y seleccionar la resistencia a gentamicina y la pérdida de la resistencia a tetraciclina. La integración de este fragmento en el plásmido simbiótico de una de las transconjugantes (RS201) fue verificada por la técnica de Southern (datos no mostrados). A esta transconjugante se le probó su capacidad para nodular plantas de *T. subterraneum*, *P. vulgaris* y *L. esculenta*, obteniéndose resultados similares a los obtenidos con la estirpe RS1051/pCR3827. Sin embargo, hay que hacer notar que el número de nódulos formados en plantas de *P. vulgaris* cuando se usa la estirpe RS201 es consistentemente mayor que cuando se usa la estirpe RS1051/pCR3827 (Fig. 15). De todos modos, la estirpe RS1051 conteniendo el fragmento de 0.52 kb. integrado o no, tarda también aproximadamente 30 días en formar nódulos en plantas de *P. vulgaris* y es incapaz de hacerlo en plantas de *L. esculenta*.

Dado que la región sobrelapante de 0.62 kb presente en los cósmidos pCV3802 y pCV3804 presenta una señal de hibridación con una sonda heteróloga de *nodD* (Vargas *et al.*, 1990), decidimos secuenciar esta región y probar su actividad inductora de los genes de nodulación.

Los resultados de secuencia, muestran la presencia de un marco de lectura abierta de 308 aminoácidos que comparte un

(A)



(B)

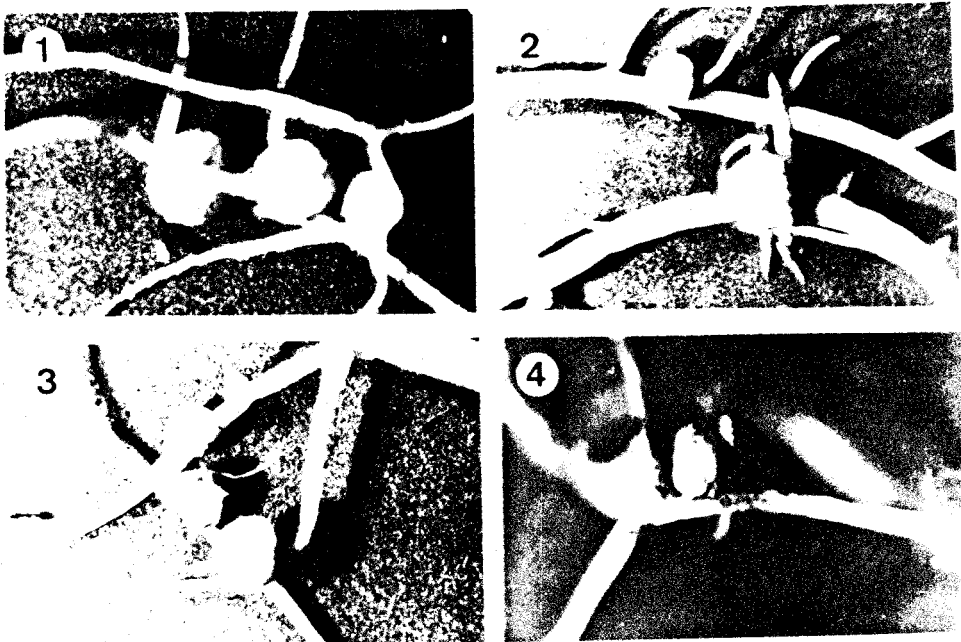


Figura 15.- Nódulos formados en plantas de *Phaseolus vulgaris* (A) o *Leucaena esculenta* (B) por las siguientes estirpes: 1A: *R. tropici* CIAT899; 2A: *R. leguminosarum* bv. *trifolli* RS1051 portando el plásmido pCR3827; 3A: *R. leguminosarum* bv. *trifolli* RS1051 portando el plásmido pCR3884 y 4A: RS201. 1B: *R. tropici* CIAT899; 2B: *R. etli* CE3 portando el plásmido PCR3802; 3B: *R. etli* CE3 portando el plásmido pCV3827 y 4B: *R. etli* CE3 portando el plásmido pCR3884.

64 AAGCTTACGCCGATGTA CTCTGCTGCTAATCGACATACTTGT CAGGTTATCGACATTTTCCTCA

128 TGCACCATCATGCCGAATCGGTAAAAATGATTGTTTGGATGGCAACCATOCACATCTTGAATGA

193 AGGAAAAGATGCGCTTCAAAGGACTGGACTTAAATCTTCTCGTCGCGCTCGACGCATTGATGACC
 19 MetArgPheLysGlyLeuAspLeuAsnLeuLeuValAlaLeuAspAlaLeuMetThr

258 GAGCGTAACTGACGGCCGGCAGCAGCATCAATCTCAGCCAGCCTGCGATGAGCGCTGCTGT
 41 GluArgAsnLeuThrAlaAlaAlaArgSerIleAsnLeuSerGlnProAlaMetSerAlaAlaVa

323 GGGCCGATTGCGTGTCTATTTGAGGATGAACTGTTTACGATGAATGGTCCGGAACCTTGCTCTGA
 62 lGlyArgLeuArgValTyrPheGluAspGluLeuPheThrMetAsnGlyArgGluLeuValLeuT

388 CGCCGCGTGCGAAGGGCCTTGTTTCGGCCGTACGTGAAGCCTTACTCCATATCCAGCTTTCGATC
 84 hrProArgAlaLysGlyLeuValSerAlaValArgGluAlaLeuLeuHisIleGlnLeuSerIle

452 ATTTCTGGGAGCCGTTTGATCCCTTTCAGTCCGATCGCCGTTTCAGGATCATTCTTTCCGATTT
 106 IleSerTrpGluProPheAspProPheGlnSerAspArgArgPheArgIleIleLeuSerAspPh

517 CCTCACACTCGTGTTFATGGAAAAGGTCGTGAAGCGTCGTGCGCGGAAGCCCCAGGCGTGAGCT
 127 eLeuThrLeuValPheMetGluLysValValLysArgArgAlaArgGluAlaProGlyValSerP

582 TCGAATTCCTGCCCTCGCCGATGATTACGACGAGCTTTTGGCCGCGGGGAAGTCGATTTTATC
 149 heGluPheLeuProLeuAlaAspAspTyrAspGluLeuLeuArgArgGlyGluValAspPheIle

647 ATTCTCCCGACGTTTCATGCCAACTGGACATCCTCGAGCGAAACTGTTTGAGGAAAGGCTCGT
 171 IleLeuProAspValPheMetProThrGlyTyrProArgAlaLysLeuPheGluGluArgLeuVa

712 ATGCGTGGGCTGTGGCAGGAACCAAGAGCTATCACAGCCGCTTACATTGACAGATACATGTCCA
 192 lCysValGlyCysGlyArgAsnGlnGluLeuSerGlnProLeuThrPheAspArgTyrMetSerH

777 TGGGGCACGTCGGCGCCAAATTCGGGAATTCACGAAGACCATCAATCGAAGAAATGGTATTTGCTC
 214 etGlyHisValAlaAlaLysPheGlyAsnSerArgArgProSerIleGluGluTrpTyrLeuLeu

842 GAACACGGTTTTAAGACAGTATCCAGGTGCTGTCGAGGGCTTCAGCATGATCCTGCCCGTTCT
 236 GluHisGlyPheLysArgArgIleGluValValValGlnGlyPheSerMetIleLeuProValLe

907 GTCCAATACCAATCGCATAGCGACCGTGCCGTTGCGACTGGCGCAACATTTCCGAGAAGTTTTGC
 257 uSerAsnThrAsnArgIleAlaThrValProLeuArgLeuAlaGlnHisPheAlaGluValLeuP

968 CCCTTCGGATCATGGACCTTCCA CTGCCGTTCCCCATTACAGAGGCCGTTCAATGGCCTGGC
 279 roLeuArgIleMetAspLeuProLeuProLeuProProPheThrGluAlaValGlnTrpProAla

1033 CTTCAAAAACAGTGATCCGGCGAGCCTATGGATGCGCGGGATTTTATTACAGGAAGCATCGCGCCT
 301 LeuGlnAsnSerAspProAlaSerLeuTrpMetArgGlyIleLeuLeuGlnGluAlaSerArgLe

1063 TGCCCTCCCGTCGGCAGAGCATTGAGTGGATGCCAGCAATGTT
 308 uAlaLeuProSerAlaGluHisTer

Figura 16.- Secuencia nucleotídica del marco de lectura abierta que codifica para la proteína NodD presente en el cósmido pCV38. Las bases subrayadas indican la secuencia Shine-Dalgarno. Las bases en la caja corresponden a la caja de nodulación orientada divergentemente del ORF D.

homología del 80% con la proteína *nodD1* de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* 8002. Así mismo, se ha detectado la presencia de una secuencia homóloga a una caja de nodulación con una orientación divergente del marco abierto de lectura (Fig. 16). Estos resultados se obtuvieron en colaboración con la Dra. Carmen Quinto, del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El siguiente paso, fue probar la actividad inductora del fragmento de 0.62 kb. para explorar si la parte de *nodD* que contiene es capaz de activar la transcripción de los genes de nodulación al reconocer los exudados de *Leucaena* y *Phaseolus* y de este modo explicar su efecto de ampliación de espectro de nodulación al ser introducida en las estirpes CE y RS1051. Para tal efecto se utilizó el plásmido pMP154 (Tabla 3) que contiene una fusión del promotor de *nodA* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* con la enzima β -galactosidasa de *E. coli*. de modo que la expresión de esta está regulada por *nodD*. Este plásmido fue introducido a la estirpe CFN2001, derivada curada de la estirpe CE3, junto con diferentes clones portadores de la región *nodD*. Los resultados de este experimento pueden verse en la Tabla 7 donde se muestra una inducción de ocho a diez veces cuando se usa el cósmido pCV38 como fuente de *nodD* y los flavonoides naringenina y apigenina como inductores. No se detectó inducción alguna cuando se usa genisteína como flavonoide inductor o en la cepa CFN2001/pMP154 (control). Cuando se usa el cósmido pCV3802, que contiene al gen *nodD* completo, se observan resultados similares en concordancia con los resultados obtenidos anteriormente (Tabla 5, sección b)). Así mismo, estas cepas responden a los exudados de *Leucaena* y *Phaseolus* mostrando una inducción de 9 a 7 veces (Tabla 7). Sin embargo, cuando se usan los clones pCR3827 y pCR3884, que sólo contienen la región amino terminal de *nodD*, no se observa ninguna inducción significativa con ninguno de los flavonoides probados ni con exudados radicales (Tabla 7). Estos resultados indican que en el fondo genético de la estirpe CFN2001, la región amino terminal de esta proteína NodD de *R. tropici* no responde a la inducción por flavonoides, ya que los niveles de β -galactosidasa detectados son tan bajos como en la cepa control (CFN2001/pMP154).

Tabla 7.- ACTIVIDAD INDUCTORA DE DIFERENTES CLONES EN LA CEPA CFN2001 DE *R. etli*

Actividad de β -galactosidasa (nmol/min/OD ₆₅₀ ml)					
Flavonoide Inductor	pMP154 (control)	pCV38	pCV3802	pCV3827	pCR3884
ninguno	25	27	28	22	20
Naringenina	37	342	304	25	21
Apigenina	35	356	275	27	30
Genisteina	30	33	30	20	26
Exudado de Frijol	24	206	106	39	34
Exudado de Leucena	29	190	89	40	27

La inducción por flavonoides y exudados de raíz también se probó usando a la estirpe CE3 como fondo genético introduciendo las clonas pCV38, pCV3802, pCR3827 y pCR3884. La actividad de β -galactosidasa se midió usando apigenina, genisteina y exudado de raíz de *Leucaena* como inductores. Cuando se usó apigenina como inductor, se detectó, una inducción de 18 veces al probar el cósmido pCV38, una inducción de 15 veces al probar el cósmido pCV3802 y sólo una inducción de dos veces al usar los clones pCR3884 y pCR3827 (Tabla 8). Los resultados al usar genisteina como inductor son diferentes como puede observarse en la Tabla 8. Las estirpes CE3/pCV38 y CE3/pCV3802 muestran una inducción de 7.5 a 4 veces, mientras que en las estirpes CE3/pCR3827 y CE3/pCR3884 no se detecta inducción ninguna. Además, al usar exudado de raíz de *Leucaena* como inductor, se aprecia una inducción de 25 y 12 veces al usarse los cósmidos pCV38 y pCV3802 respectivamente, mientras que los cósmidos pCR3827 y pCR3884, sólo muestran una inducción de dos a tres veces.

**Tabla 8.- ACTIVIDAD INDUCTORA DE DIFERENTES CLONES
EN LA CEPA CE3 de *R. etli***

Flavonoide Inductor	Actividad de β -galactosidasa (nmol/min/OD ₆₅₀ ml)				
	pMP154 (control)	pCV38	pCV3802	pCV3827	pCR3884
ninguno	29	24	41	39	38
Apigenina	28	529	453	48	53
Genisteina	100	755	395	98	105
Exudado de Leucena	39	979	459	92	123

Decidimos también explorar la actividad inductora del fragmento de 0.6 kb en el fondo genético de la estirpe RS1051, de modo que le fue introducido el plásmido pMP154 (control) y diferentes clones portadores del gen *nodD* o parte de él. En este caso, se usaron como inductores naringenina, apigenina, genisteina y exudado radical de *P. vulgaris*. Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 9 donde se observa una inducción de tres veces al usar naringenina como inductor de los cósmidos pCV38 y pCV3802. Por su parte los cósmidos pCR3827 y pCR3884 son incapaces de inducir la actividad de β -galactosidasa cuando se usa el mismo inductor. Así mismo, estos cósmidos también son incapaces de inducir la actividad de β -galactosidasa cuando se usa apigenina como inductor, en contraste con la inducción de 1.8 a 1.6 veces detectada al usar los cósmidos pCV38 y pCV3802 (Tabla 9). La genisteina es incapaz de inducir la actividad de β -galactosidasa en ninguno de los casos probados. Sin embargo, al usar exudados radicales de *Phaseolus* como inductor, en todos los casos se observa una inducción de entre 2 y 4 veces (Tabla 9).

Tabla 9.- ACTIVIDAD INDUCTORA DE DIFERENTES CLONES EN LA CEPA RS1051 DE *R.hizobium leguminosarum* bv. *trifolii*

Flavonoide Inductor	Actividad de β -galactosidasa (nmol/min/OD ₆₅₀ ml)				
	pMP154 (control)	pCV38	pCV3802	pCV3827	pCR3884
ninguno	45	30	29	40	35
Naringenina	111	376	342	100	99
Apigenina	236	435	390	202	199
Genisteina	138	32	31	120	102
Exudado de Frijol 43		165	93	87	89

Estos resultados indican que la extensión de espectro de hospedador provocada por el fragmento de 0.6 kb se debe a una activación de los genes de nodulación en las estirpes RS1051 y CE3 en presencia de exudados radicales de *Phaseolus* y *Leucaena*, respectivamente; si bien el mecanismo por el cual se lleva a cabo esta activación no está claro, ya que el fragmento de 0.6 kb por sí sólo no es capaz de activar la transcripción de la fusión *nodA-lacZ* en las estirpes CFN2001/pMP154/pCR3827 y CFN2001/pMP154/pCR3884 (ver Discusión).

d)ANALISIS DE LOS LIPO-OLIGOSACARIDOS PRODUCIDOS POR *R. tropici* CIAT899

Se ha demostrado que tanto las bacterias del género *Rhizobium*, así como aquellas pertenecientes a los géneros *Azorhizobium* y *Bradyrhizobium*, producen, a través de los genes de nodulación, lipo-oligosacáridos en respuesta a compuestos flavonoides excretados por la planta. Estos lipo-oligosacáridos constan de un "esqueleto " formado por 3, 4 ó 5 moléculas de N-acetilglucosamina al cual se le añaden varios grupos funcionales dependiendo de la especie que los produzca. En todos los casos se encuentra un lípido unido a este esqueleto pero la compocisión de dicho lípido también varía de

acuerdo a la especie productora (Fig.4, Tabla 2 en Introducción). Estas moléculas son las responsables de la iniciación de la organogénesis del nódulo y en algunos casos como el de alfalfa-*R. meliloti* son capaces de desarrollar completamente un nódulo en ausencia de bacterias (Lerouge *et al.*, 1990).

Usando técnicas de Cromatografía en Capa Fina (TLC, por Thin Layer Chromatography) y de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC, por High Performance Liquid Chromatography) hemos estudiado los factores de nodulación de *R. tropici* CIAT899. Así mismo, se usaron técnicas de espectrometría de masas para determinar la composición química de los lipo-oligosacáridos producidos por esta estirpe.

En un primer experimento, se cultivó a la cepa silvestre CIAT899 en presencia de acetato ^{14}C con o sin el inductor naringenina. Después de 24 horas de cultivo, se añadió *n*-butanol saturado con agua al medio para extraer de esta manera los lipo-oligosacáridos producidos por esta estirpe. El extracto butanólico fue concentrado por evaporación y se aplicaron 5 microlitros a una placa de TLC en donde se separaron los compuestos usando acetonitrilo al 50% como solvente. La placa de TLC fue expuesta a una película radiográfica durante 15 días. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 17A. En la condición inducida (carril 2) pueden observarse tres bandas que no están en el extracto del cultivo sin inducir (carril 1) y que corresponden a compuestos sintetizados en respuesta al flavonoide y por lo tanto muy probablemente sean lipo-oligosacáridos. Dado el patrón de migración de estos compuestos se deduce que dos de ellos son bastante hidrofóbicos, mientras que el de más rápida movilidad es más hidrofílico, lo cual podría deberse a la presencia de un grupo sulfato en esta molécula. Para demostrar esta posibilidad, se marcó un cultivo inducido por naringenina de la cepa silvestre CIAT899 con sulfato ^{35}S y puede verse que sólo la molécula de rápida movilidad se marca demostrando, así que está sulfatada, mientras que las otras dos no lo están (Fig. 17B). En un experimento similar, se usó glucosamina ^{14}C , ya que este precursor de la síntesis de lipo-oligosacáridos se incorpora más eficientemente a las moléculas que nos interesa marcar. En este experimento se puede observar una cuarta banda con una migración intermedia a las anteriormente mencionadas (Fig. 17C). Así, se concluye que *R. tropici* CIAT899 produce cuando menos 4 factores de nodulación, de los cuales uno está sulfatado. Estos resultados concuerdan con la presencia de los genes *nodH* y *nodPQ* descritos en el apartado a) de esta Tesis y

A

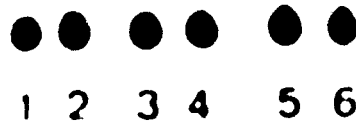


Figura 17.- Cromatografía en capa fina de los factores de nodulación producidos por *R. tropici* CIAT899 en presencia de: carriles 1 y 2: acetato ¹⁴C; carriles 3 y 4: glucosamina ¹⁴C y carriles 5 y 6: sulfato ³⁵S. Los carriles ones corresponden a cultivos sin inducir, mientras que los carriles pares corresponden a cultivos inducidos con narngenia 1.5 μM.

demuestran que estos genes son funcionales en *R. tropici* CIAT899 llevando a cabo la misma función propuesta para sus homólogos en *R. meliloti* (i. e. sulfatar el lipo-oligosacárido).

Decidimos entonces explorar el papel de distintos flavonoides en la producción de factores de nodulación en *R. tropici* CIAT899, ya que esta estirpe es de amplio espectro de nodulación y podría esperarse que ante distintos hospederos se sintetizaran diferentes lipo-oligosacáridos específicos para cada hospedero. El resultado del análisis por TLC marcando los cultivos con glucosamina ^{14}C y usando naringenina, apigenina, 7-hidroxyflavona y chrysin como inductores se muestra en la Figura 18. Como puede observarse, el patrón de factores producidos por los distintos inductores es idéntico en todos los casos. Este resultado no descarta la posibilidad de que ante distintos hospederos, que excretan mezclas de distintos flavonoides, pudieran sintetizarse diferentes familias de lipo-oligosacáridos que harían el proceso de nodulación más eficiente de acuerdo a los requerimientos de la planta. Para demostrar esta hipótesis es necesario hacer un experimento similar usando exudados radicales de distintos hospederos para comprobar si el patrón de factores de nodulación es distinto.

En el apartado a) de esta Tesis se ha descrito la presencia del gen *nodS* en *R. tropici* CIAT899. Al producto de este gen se le ha atribuido el papel de metilar el factor de nodulación en otras especies (ver Introducción). Por este motivo decidimos averiguar si el gen *nodS* encontrado en *R. tropici* CIAT899 lleva a cabo la misma función que en *Azorhizobium caulinodans* o *Rhizobium* sp. NGR234. Para tal efecto, analizamos los lipo-oligosacáridos producidos por la estirpe CIAT899 en presencia de L-(methyl- ^{14}C) metionina ya que este compuesto es un donador de grupos metilo en varios procesos del metabolismo celular. También decidimos probar otras especies que contienen al gen *nodS* en este experimento. Así, se incubaron cultivos inducidos con naringenina de *R. tropici*, *R. etli* (que también contiene al gen *nodS*, M. Villalobos, comunicación personal), *Rhizobium* sp. GRH2 (una cepa aislada de *Acacia* que también presenta amplio espectro de nodulación) y la estirpe CFN2001 conteniendo un cósmido en el que se encuentra el gen *nodS* de *R. etli* interrumpido por el transposón Tn5, como control negativo. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 19. En los diferentes carriles se observa la incorporación de marca radioactiva, indicando así que los

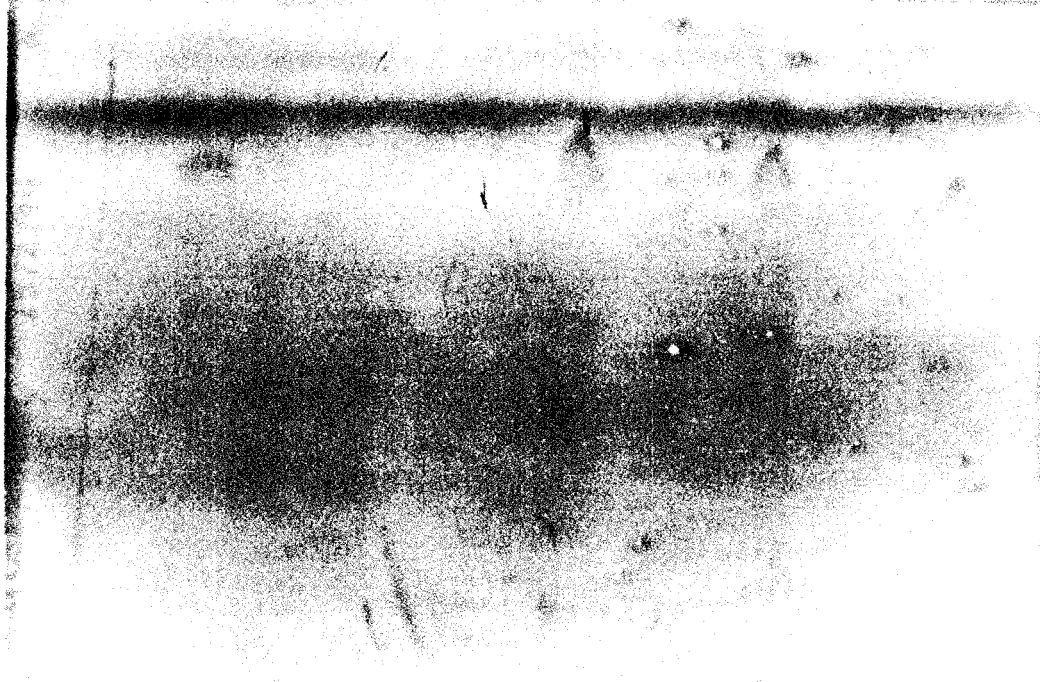


Figura 18.- Cromatografía en capa fina de los factores de nodulación producidos por la estirpe CIAT899 en presencia de glucosamina ^{14}C usando diferentes flavonoides como inductores. Carriles 1 y 2: naringenina; carriles 3 y 4: genisteína; carriles 4 y 5: 7-hidroxyflavona; carriles 8 y 9: apigenina; carriles 9 y 10: chrysin. Los carriles nones corresponden a cultivos sin inducir, mientras que los carriles pares corresponden a cultivos inducidos con el flavonoide indicado a una concentración de 1.5M

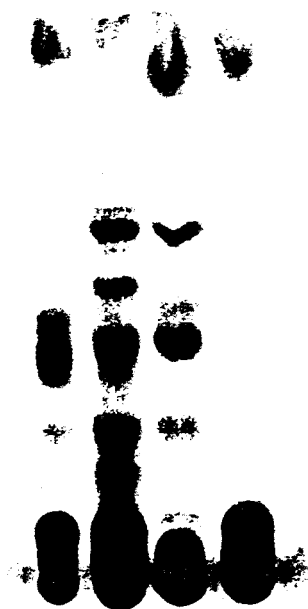


Figura 19.- Cromatografía en capa fina de los factores de nodulación producidos en presencia de L-(methyl- ^{14}C) metionina de las estirpes CE3 de *R. etli* (carril 1); *Rhizobium* sp. GRH2 (carril 2); *R. tropici* CLAT899 (carril 3) y CFN2001::*Tn5 nodS* (carril 4). En todos los casos se usó naringenina 1.5 μM como inductor.

factores de nodulación de las tres especies especies están metilados. En el caso de CIAT899 se observa que dos de los factores, uno de ellos el sulfatado, están también metilados, demostrando así la funcionalidad del gen *nodS* en *R. tropici* CIAT899. En el caso de la estirpe CE3 de *R. etli* se observa una banda muy ancha que probablemente corresponda a una familia de factores de nodulación muy similares. Estos datos se ven apoyados por el análisis por HPLC llevado a cabo con la estirpe CE3, ya

que se observan varios picos de absorbancia en la zona donde migran los lipo-oligosacáridos (datos no mostrados, L. Cárdenas, comunicación personal). En la estirpe GRH2 se observa la producción de cuando menos 4 factores metilados. Por otro lado, la inserción del transposón Tn5 en el gen *nodS* de *R. etli* CE3 inactiva este gen por lo que no hay incorporación de marca en los factores de nodulación, demostrando así que la incorporación del metilo radioactivo a los factores de nodulación es específica y requiere de la actividad de NodS.

Hasta aquí, se ha demostrado que *R. tropici* CIAT899 produce al menos cuatro factores de nodulación, de los cuales algunos están metilados y sulfatados. Estos resultados están en concordancia con la presencia de los genes de nodulación *nodPQ*, *nodH* y *nodS* detectados en esta estirpe.

Usando técnicas de HPLC se analizaron los factores de nodulación producidos por *R. tropici* CIAT899. Como primer paso, se construyeron distintas cepas derivadas de la cepa silvestre CIAT899 para obtener una cepa sobreproductora de factores de nodulación. Esta estrategia consistió en introducir distintos genes *nodD* en la cepa silvestre CIAT899, ya que en otros sistemas se ha comprobado que la introducción de genes *nodD* heterólogos, o en combinación con *nodL*, y en multicopia, resulta en una sobreproducción de lipo-oligosacáridos (Spaink, *et al.*, 1991). Así, a la estirpe CIAT899 se le introdujeron los siguientes plásmidos: pMP281 (*nodD* de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, IncP), pMP2107 (*nodD* y *nodL* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* IncP), pMP2109 (*nodD* y *nodL* de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, IncW), pMP2112 (*nodD* de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, IncW), y pMP604 (*nodD* FITA de *R. leguminosarum* bv. *viciae*) (ver tabla 3 en Material y Metodos). De este modo, se probaron distintos genes *nodD* en plásmidos de distintos grupos de incompatibilidad para obtener una cepa sobreproductora y estable a partir de la cual purificar a gran escala los factores de nodulación. Para escoger a la mejor cepa sobreproductora, se hizo un análisis por TLC usando glucosamina ¹⁴C y naringenina como inductor de estas estirpes y los resultados de este

experimento se muestran en la Figura 20. Como puede observarse todas estas cepas producen aproximadamente la misma cantidad de lipo-oligosacáridos al ser inducidas por naringenina. En un principio, decidimos usar la cepa CIAT899/pMP281 dado que el cultivo sin inducir produce un menor fondo (Fig. 20, carriles 2 y 3).

Para llevar a cabo el análisis por HPLC de los factores de nodulación producidos por estas estirpes, es necesario cultivar al menos dos litros de medio e inducir los cultivos con el flavonoide apropiado para producir los lipo-oligosacáridos; así mismo es necesario tener un cultivo no inducido para usarlo como control negativo. A estos cultivos se les hace una extracción butanólica, el butanol se evapora totalmente y el polvo resultante se resuspende en acetonitrilo al 40%. Como un primer paso de purificación, esta solución se pasa por una columna de sílica a la que está acoplada una cadena de 18 carbonos que sirve como matriz para que los lipo-oligosacáridos se adhieran de acuerdo a sus características de hidrofobicidad. Después, los factores son eluidos con distintos porcentajes de acetonitrilo/agua y las fracciones son analizadas por HPLC (ver Material y Métodos)

En un primer análisis por HPLC usando la cepa CIAT899/pMP281 inducida por naringenina, se detectó un pico con absorbancia específica a 290nm de longitud de onda que comigra con NodRmIV(S), el lipo-oligosacárido mayoritario producido por *R. meliloti* (Fig. 21). Sin embargo, un análisis más a fondo nos permitió identificar este pico como el flavonoide naringenina. Decidimos entonces trabajar con la cepa CIAT899/pMP604 ya que al tener un *nodD* FITA no es necesaria la adición de naringenina para la producción de factores de nodulación. Esto resultó ser importante porque la naringenina comigra con el factor sulfatado de CIAT899, enmascarándolo en el análisis por HPLC (fig 21).

La figura 22 muestra los cromatogramas de un cultivo no inducido de la cepa CIAT899/pMP281 y un cultivo de la cepa CIAT899/pMP604 (que produce factores de nodulación independientemente de la adición del flavonoide). En el cromatograma correspondiente a la cepa CIAT899/pMP604 puede observarse la presencia de 8 picos específicos que no aparecen en el cultivo sin inducir. Estos resultados pueden ser comparados con el patrón de TLC y son consistentes, ya que es posible que dentro de una misma banda en la TLC se encuentren varios factores de estructura química sutilmente distinta. Estos resultados sugieren la producción de una familia

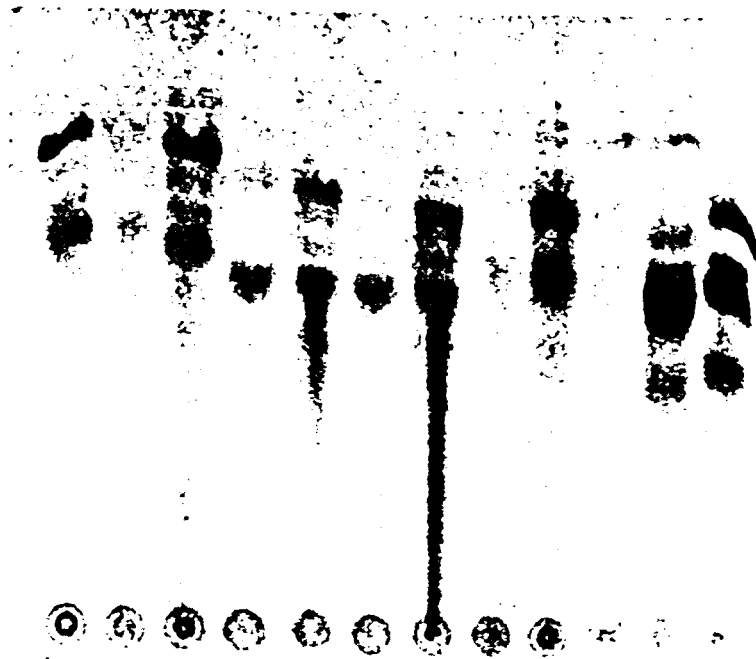


Figura 20.-Cromatografía en capa fina de los factores de nodulación producidos en presencia de glucosamina ^{14}C de las siguientes estirpes: 1: CIAT899/pMP604; 2: CIAT899/pMP281 (-); 3: CIAT899/pMP281 (+); 4: CIAT899/pMP2107 (-); 5: CIAT899/pMP2107 (+); 6: CIAT899/pMP2109 (-); 7: CIAT899/pMP2109 (+); 8: CIAT899/pMP2112 (-); 8: CIAT899/pMP2112 (+). Los signos (+) indican la adición de naringenina a una concentración final de 1.5 μM .

I1: JORD_003.D2

[au]

0.1983

-0.028

190.0

370.0

[nm]

190.0

[nm]

220.0

240.0

260.0

280.0

300.0

320.0

340.0

370.0

[au]

0.0567

-8.4-3

0.08

15.00

20.00

25.00

30.00

40.00

45.00

50.00

55.00

60.00

[min]

Figura 21.- Cromatograma de HPLC de los factores de nodulación producidos por *R. tropici* CIAT899/pMP281. Como inductor se usó naringenina a una concentración final de 1.5 μ M

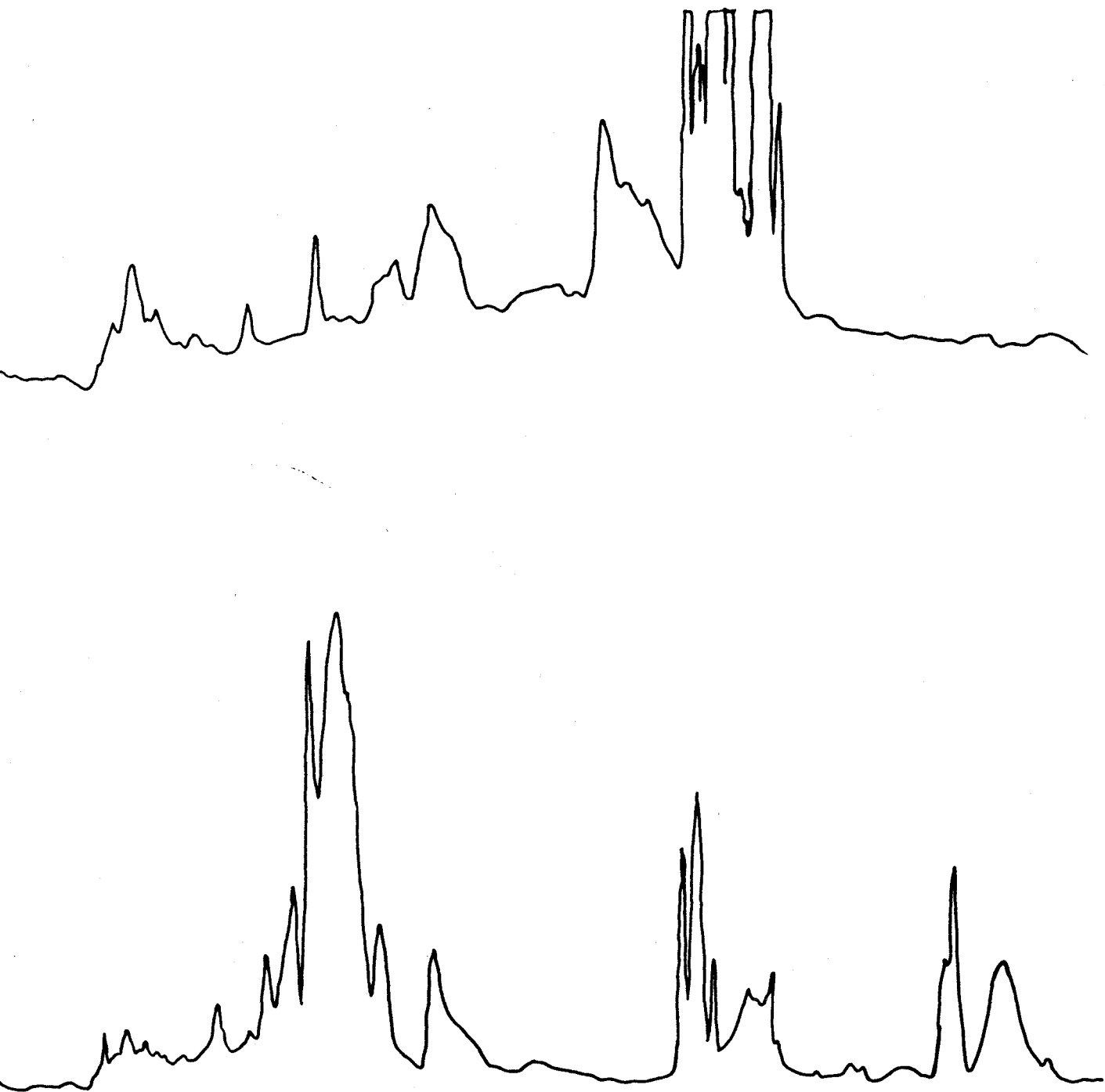


Figura 22.- A.) Cromatograma de HPLC de un extracto crudo de un cultivo sin inducir de la cepa CIAT899/pMP281 (control). B) Cromatograma de HPLC de un extracto crudo de la estirpe CIAT899/pMP604. Las flechas señalan los picos que fueron recolectados para el análisis por espectrometría de masas.

de factores sulfatados (picos 1-6) y no sulfatados (picos 7 y 8) en *Rhizobium tropici* CIAT899. Los picos específicos fueron

Tabla 10.- COMPOSICION QUIMICA DE LOS LIPO-OLIGOSACARIDOS PRODUCIDOS POR LA ESTIRPE CIAT899 DE *Rhizobium tropici*.

pico ^a	n ^b	acido graso	sulfato	metilo	hexosa
1					
1a	5	C16:1	+	-	-
1b	5	C16:0	+	-	-
1c	5	C16:0	+	+	-
2	5	C16:0	+	+	-
3	5	C18:1	+	-	-
4					
4a	4	C18:1	+	-	-
4b	5	C16:2	+	-	-
4c	5	C16:1	+	-	-
4d	5	C18:2	+	-	-
4e	5	C18:1	+	+	-
5	5	C18:1	+	+	-
6	5	C18:1	+	+	-
7					
7a	4	C18:1	-	-	+
7b	5	C18:1	-	-	-
8	5	C18:1	-	+	-

a: Cada pico consta de una familia de varios lipo-oligosacáridos
b: número de residuos de N-acetilglucosamina

purificados y sometidos a un análisis por espectrometría de masas para determinar su composición química. La tabla 10 muestra la composición química de los distintos picos del cromatograma de la figura 22. El pico 1 está compuesto por 3 factores de 5 unidades de N-acetilglucosamina que están sulfatados; uno de ellos además está N metilado y se detecta la presencia de dos lípidos distintos, ambos de 16 carbonos pero con distinto número de insaturaciones. El pico 2 consiste de un sólo factor de nodulación que contiene 5 residuos de N-

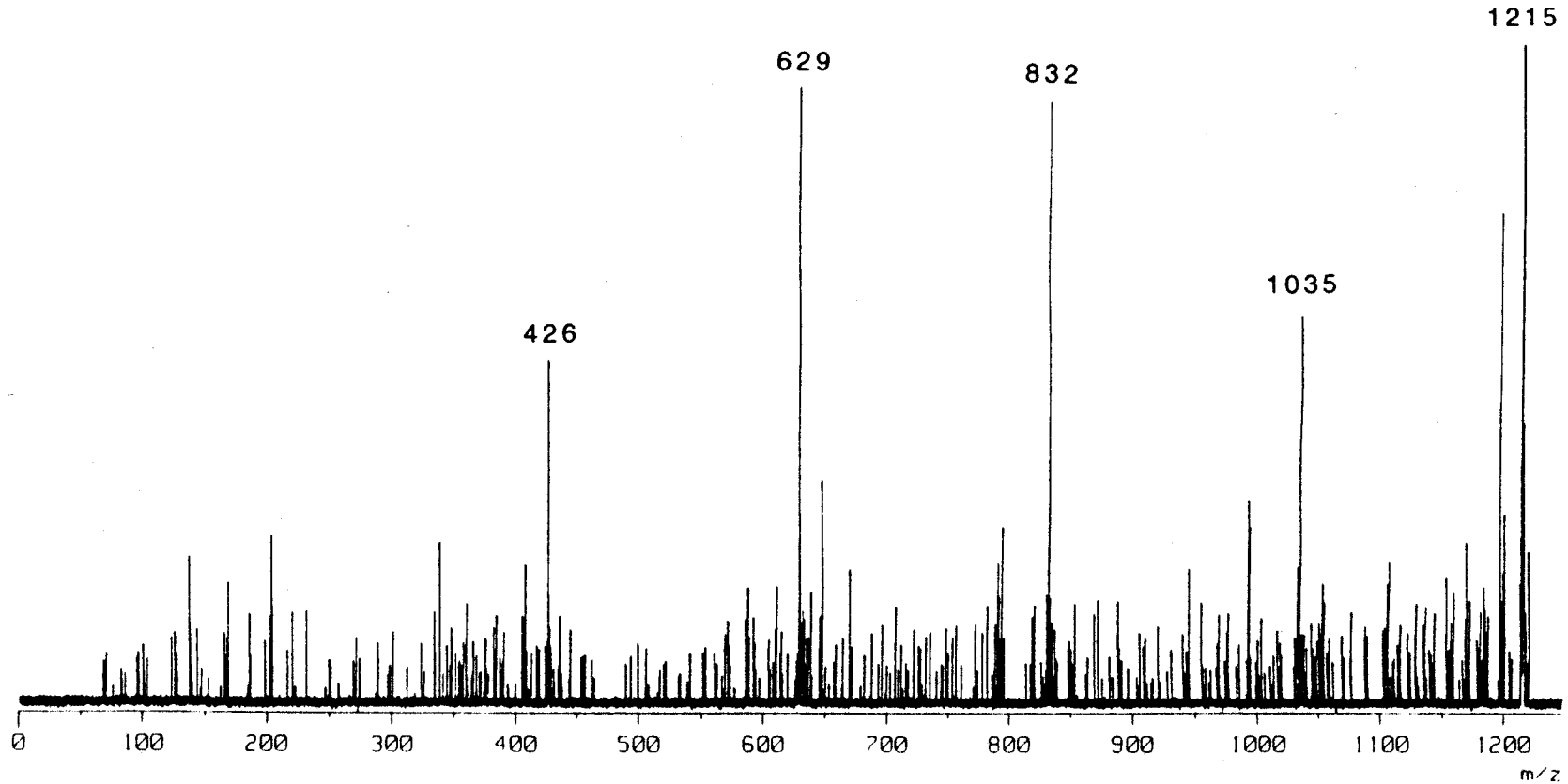
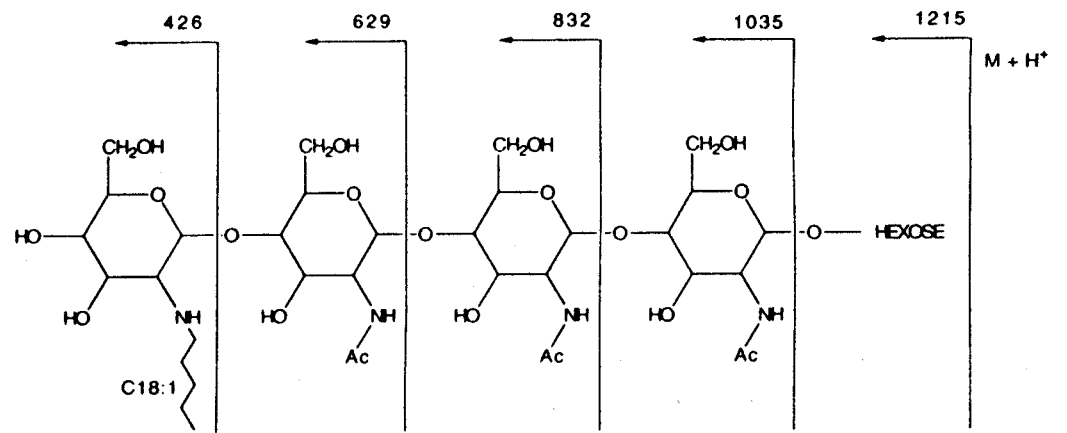


Tabla 11.- Espectro de masas del factor de nodulación tetramérico conteniendo una hexosa correspondiente al pico 7.

acetilglucosamina, un grupo sulfato, un grupo metilo y un ácido graso de 16 carbonos sin insaturaciones. El pico tres también presenta un sólo componente de 5 residuos de N-acetilglucosamina sulfatado pero el ácido graso es de 18 carbonos con una insaturación; este compuesto no está N metilado. El pico 4 consta de 5 factores, 4 de ellos contienen 5 residuos de N-acetilglucosamina mientras que el restante contiene sólo 4 residuos de este azúcar. Todos ellos están sulfatados y uno además metilado. En esta familia encontramos varios lípidos distintos tanto de 16 como de 18 carbonos y con una o dos insaturaciones. Los picos 5 y 6 corresponden al mismo compuesto siendo este un quitopentasaacárido metilado y sulfatado con un lípido de 18 carbonos y una insaturación. El pico 7 contiene dos componentes de los que ninguno está sulfatado, ambos contienen un ácido graso de 18 carbonos, pero uno consta de 4 residuos de glucosamina y otro de 5, además el tetrámero contiene una hexosa en el extremo reductor de la molécula. Por último, el pico 8 contiene un quitopentasaacárido N metilado y con un lípido de 18 carbonos y una insaturación. Así, se han detectado 11 factores de nodulación de composición diferente en *R. tropici* CIAT899. En la Tabla 11 se muestra el resultado del análisis por espectrometría de masas del tetrámero que contiene la hexosa en el extremo reductor de la molécula, correspondiente a uno de los componentes del pico 7 (Fig 22) Estos resultados coinciden parcialmente con los resultados obtenidos por Poupot *et al.* (1993) para la estirpe CFN299 de *R. tropici*, aunque estos autores sólo reportan la estructura de dos factores de nodulación que probablemente sean los más abundantes en esta estirpe.

Al hacer análisis por TLC de las cepas que contienen al gen *nodL* y compararlas con aquellas que no lo llevan, se observó una diferencia de migración en el patrón de factores producidos (Fig. 20, carriles 6, 7, 8 y 9). Es de esperarse que al introducir el gen *nodL* a cualquier estirpe de *Rhizobium* esta produzca lipo-oligosacáridos O-acetilados, ya que se ha demostrado que el producto de *nodL* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* es capaz de O-acetilar al lipo-oligosacárido de *R. meliloti* (ver Introducción). Para demostrar esta hipótesis, se analizaron distintas especies de *Rhizobium* con o sin el gen *nodL*. Así, se introdujeron los plásmidos pMP2112 y 2109 a la estirpe E1R de *Rhizobium loti*, y los plásmidos pMP281 y pMP2107 a las estirpes CIAT899, CE3 y GRH2. Estas estirpes fueron cultivadas con glucosamina ¹⁴C y se hizo un análisis por TLC de los factores producidos con el inductor naringenina. Los resultados

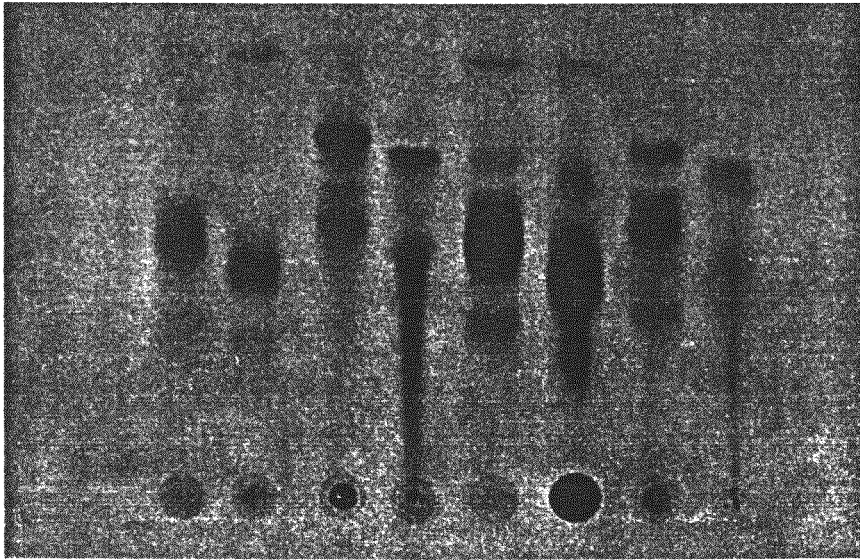


Figura 23.-Cromatografía en capa fina de los factores de nodulación producidos en presencia de glucosamina ^{14}C de las siguientes estirpes: 1: ER1/pMP2112; 2: ER1/pMP2109; 3: CIAT899/pMP281; 4: CIAT899/pMP2107; 5: CE3/pMP281; 6: CE3/pMP2107; 7: GRH2/pMP281 y 8: GRH2/pMP2107.

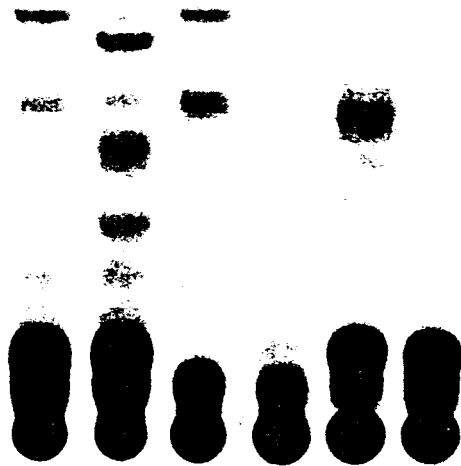


Figura 24.- Cromatografía en capa fina de los factores de nodulación producidos en presencia de L-(methyl- ^{14}C) metionina de las siguientes estirpes: 1:GRH2/pMP281; 2: GRH2/pMP2107 3: CIAT899/pMP281; 4: CIAT899/pMP2107; 5: CE3/pMP281 y 6: CE3/pMP2107.

de este experimento se muestran en la figura 23 y puede observarse que en todos los casos la presencia del gen *nodL* provoca un retardo en la migración de los factores de nodulación, sugiriendo así un cambio en su estructura química, probablemente debido a la O-acetilación de los lipo-oligosacáridos. Decidimos entonces explorar más a fondo la estructura química de los factores de nodulación sintetizados en presencia de *nodL* para lo cual se hizo un experimento similar con las mismas cepas pero en presencia de L-(methyl-¹⁴C) metionina para comprobar si estas moléculas están o no metiladas. El resultado de este experimento se muestra en la Figura 24 y puede observarse que en presencia de *nodL* los factores no se metilan contribuyendo así al retardo en la migración de estos compuestos (Fig. 24, carriles pares). De este experimento se deduce que al O-acetilarse los factores de nodulación, se previene su metilación, ya que probablemente el producto del gen *nodS* no sea capaz de reconocer los lipo-oligosacáridos O-acetilados como sustrato. Es importante hacer notar que pese al cambio en la estructura química de estos compuestos, no se observa una diferencia en el patrón de nodulación de estas cepas cuando se inoculan en plantas de *Phaseolus vulgaris* (datos no mostrados). Sin embargo, queda por explorar el patrón de nodulación de estas estirpes en otras plantas como *Leucaena* o *Macroptilium* para determinar la importancia de los grupos O-acetilo y N-metilo en la especificidad de hospedero.

**e) ANALISIS DE LOS REQUERIMIENTOS
ESTRUCTURALES DE LOS LIPO-OLIGOSACARIDOS DE *R.*
tropici PARA LA NODULACION DE PLANTAS DE
Phaseolus y *Leucaena***

Decidimos entonces analizar algunos de los requerimientos estructurales de los lipo-oligosacáridos producidos por *R. tropici* CIAT899 para nodular distintos hospederos. Para tal efecto se usaron las cepas RSP900/pCV38 y RSP900/pCV3804, ya que muchos de los genes de nodulación presentes en estos cósmidos son conocidos, y se ha demostrado su funcionalidad.

Como primer paso, se hizo un análisis por TLC de estas estirpes usando acetato ¹⁴C y naringenina como inductor. Puede observarse en la figura 25 que la estirpe RSP900/pCV38 produce dos familias de factores de nodulación, siendo una de ellas los compuestos sulfatados, mientras que la cepa RSP900/pCV3804 sólo es capaz de producir la familia de

A

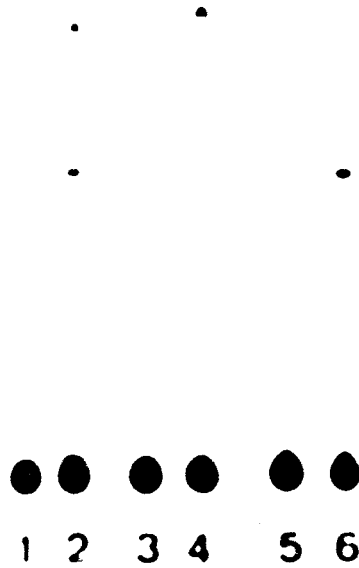
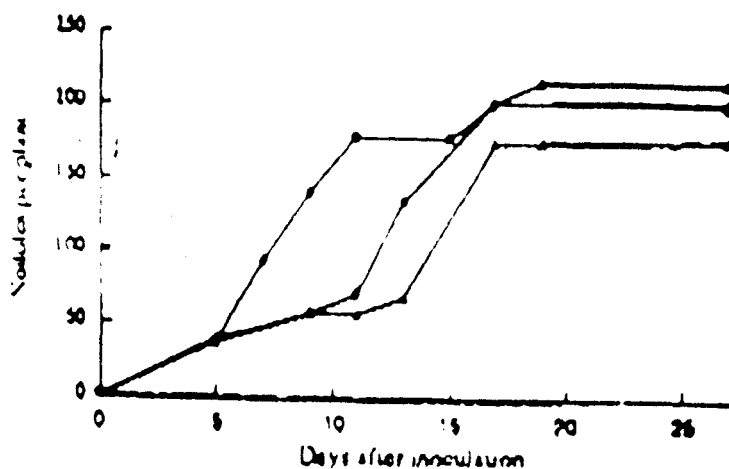


Figura 25.- Cromatografía en capa fina de los factores de nodulación producidos en presencia de acetato ^{14}C por las siguientes estirpes: carriles 1 y 2: CIAT899; carriles 3 y 4: RSP900/pCV38 y carriles 5 y 6: RSP900/pCV3804. Los carriles pares corresponden a cultivos sin inducir, mientras que en los carriles nones se usó naringenina $1.5 \mu\text{M}$ como inductor.

A



B

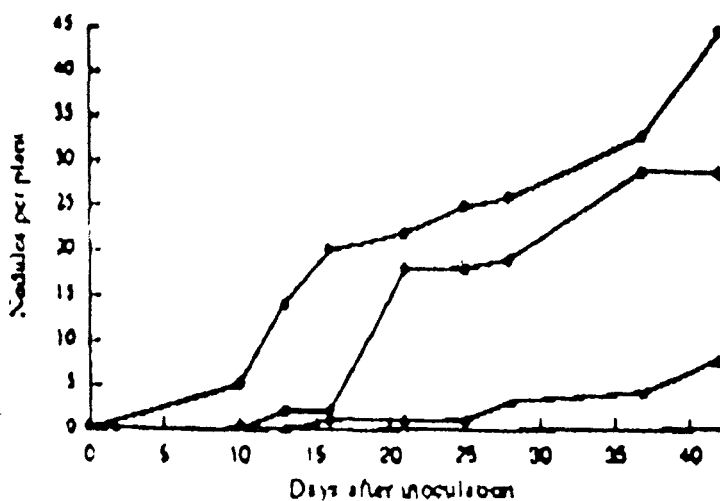


Figura 26.- Cinética de nodulación de diferentes estirpes en plantas de *Phaseolus vulgaris* (A) o de *Leucaena leucocephala* (B). CIAT899 (0), RSP900/pCV38 (0), y RSP900/pCV3804 ().

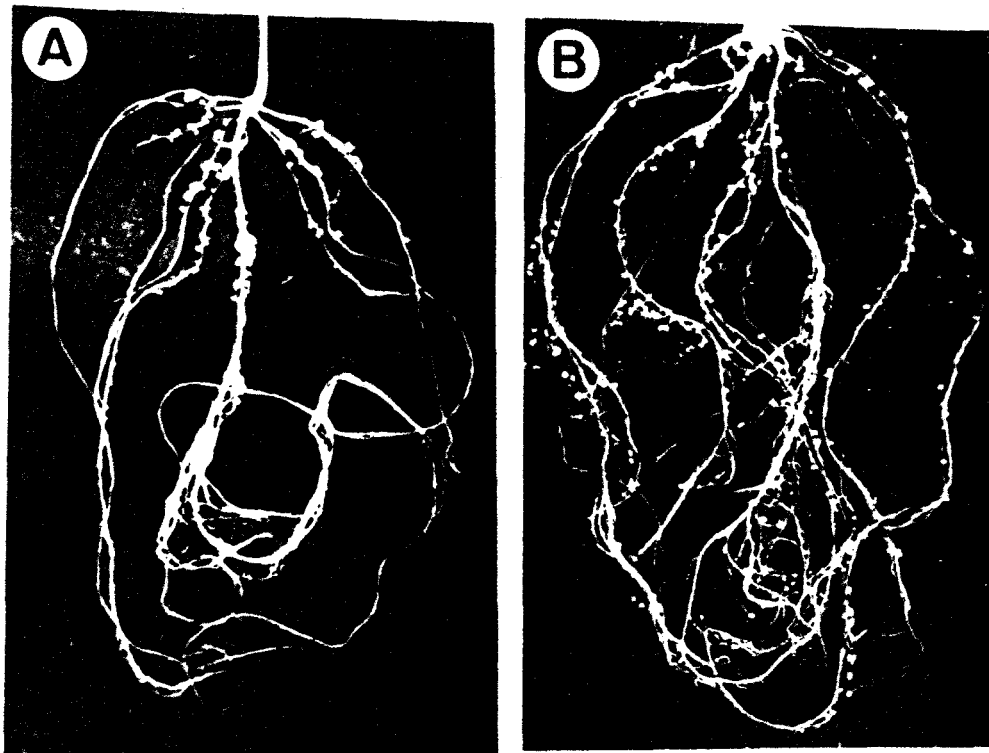


Figura 27.- Nódulos formados en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. por las estirpes CIAT899 (A) y RSP900/pCV38 (B).

factores de nodulación no sulfatados, ya que este plásmido carece de los genes *nodH* y *nodPQ*. Entonces, decidimos explorar la cinética de nodulación de estas estirpes en dos de los hospederos de *R. tropici* para determinar la importancia del grupo sulfato como requerimiento para nodular plantas de *Phaseolus* y *Leucaena*. La Figura 26 muestra los resultados de este experimento. En la parte A se muestra la cinética de nodulación en plantas de *Phaseolus* mientras que en la parte B se ilustra el experimento en plantas de *Leucaena*. Puede observarse que tanto la cepa RSP900/pCV38 como la cepa RSP900/pCV3804 son capaces de formar el mismo número de nódulos que la cepa silvestre CIAT899 en plantas de *Phaseolus*, aunque se observa un retraso en la nodulación de las cepas portadoras de los cósmidos con respecto a la silvestre (Fig. 26 A). El tamaño y aspecto de los nódulos formados por estas dos estirpes en estas plantas son muy similares a aquellos formados por la cepa CIAT899 (Fig. 27). Sin embargo hay que hacer notar que la cepa silvestre CIAT899 forma nódulos únicamente en la parte superior de la raíz, mientras que las cepas RSP900/pCV38 y RSP900/pCV3804 lo hacen a todo lo largo de la raíz, tal vez en respuesta a una limitación de nitrógeno, ya que estas cepas son incapaces de fijar nitrógeno por carecer de la región *nif-fix* (Fig. 27). Es evidente que, para la nodulación en plantas de *Phaseolus*, el grupo sulfato presente en el (los) factor(es) de nodulación de *R. tropici* CIAT899 juega un papel poco importante, en contraste con los resultados obtenidos en la simbiosis *R. meliloti*-alfalfa, en donde la presencia del grupo sulfato es absolutamente indispensable para que la nodulación se lleve a cabo.

El caso de la nodulación en plantas de *Leucaena* es, sin embargo, muy distinto. Como puede observarse en la sección B de la figura 26, las dos cepas portadoras de los cósmidos pCV38 y pCV3804 muestran diferencias considerables con respecto a la cepa silvestre CIAT899. La estirpe RSP900/pCV38, además de presentar un retraso en la nodulación es incapaz de formar el mismo número de nódulos que la cepa silvestre a lo largo de diferentes estadios de la nodulación (Fig. 26B). Estos nódulos, sin embargo, mantienen una apariencia similar a los formados por la cepa silvestre en cuanto a tamaño y color. El caso de la estirpe RSP900/pCV3804 es mucho más drástico, ya que la eficiencia de nodulación de esta cepa, que produce factor(es) de nodulación que carecen del grupo sulfato, es muchísimo más baja al compararla con la de la cepa silvestre o la estirpe RSP900/pCV38. Además, el tamaño de los nódulos formados por esta estirpe en plantas de

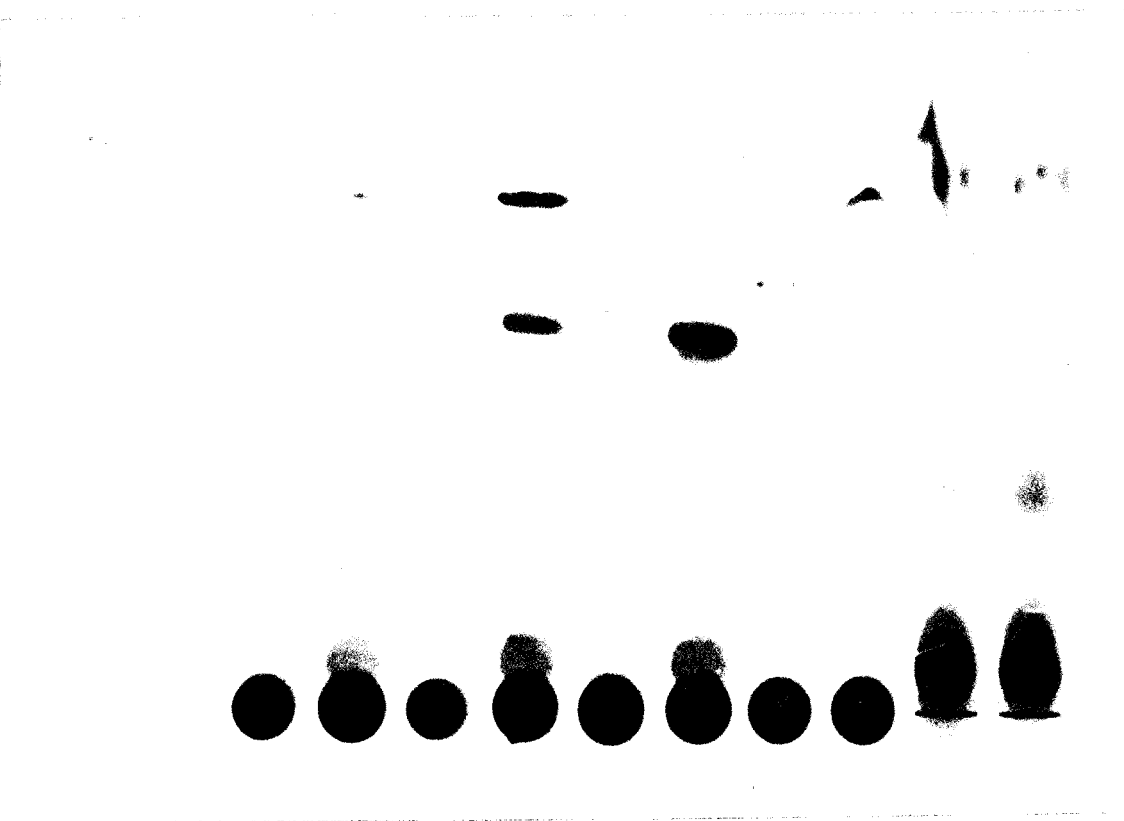


Figura 28.- Cromatografía en capa fina en presencia de L-(methyl-¹⁴C) metionina de las siguientes cepas: carriles 1 y 2: CIAT899; carriles 3 y 4: RSP900/pCV38; carriles 5 y 6: RSP900/pCV3804; carriles 7 y 8: RSP900/pCV61; carriles 9 y 10: *A. caulinodans* ORS571 (control). Los carriles pares corresponden a cultivos inducidos con naringenina 1.5 μ M. Los carriles nones corresponden a cultivos sin inductor.

Leucaena es mucho más reducido que en el caso de la estirpe CIAT899. Estos resultados sugieren que la presencia del grupo sulfato es de suma importancia para que las plantas de *Leucaena* reconozcan de manera eficiente los factores de nodulación producidos por *R. tropici* CIAT899 y se dispare la organogénesis eficientemente.

Al hacer un análisis por TLC de los factores de nodulación producidos por estas estirpes en presencia de L-(methyl-¹⁴C) metionina se ha demostrado que tanto el cósmido pCV38 como el cósmido pCV3804 son capaces de producir la familia de factores de nodulación metilados, descartando así que la baja eficiencia de nodulación observada en la estirpe RSP900/pCV3804 se deba a la ausencia del grupo metilo (Figura 28).

Actualmente, se están llevando a cabo experimentos similares para estudiar el papel de los genes *nodFE* y *nodS* sobre los requerimientos estructurales de los lipooligosacáridos que provocan la nodulación en distintos hospederos de *Rhizobium tropici* CIAT899.

f) ANALISIS DEL COSMIDO pCV61

Al conjugar en masa una genoteca de *R. tropici* a la cepa curada RSP900 y probar en planta para aislar la región de nodulación de CIAT899, se aisló también el cósmido pCV61 que sobrelapa con el cósmido pCV38 (Fig.7; Vargas *et al.*, 1990). Esta región de ADN es capaz de restaurar el fenotipo de nodulación a la estirpe curada RSP900 en plantas de *Phaseolus*, *Leucaena* y *Macroptilium*. Así mismo, cuando este cósmido es introducido en una estirpe silvestre de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (RS1051) amplía el espectro de nodulación de esta estirpe, que ahora es capaz de nodular plantas de *Phaseolus*, *Macroptilium* y *Leucaena*. (Tabla 12; ver también Vargas *et al.*, 1990). Los resultados anteriores obtenidos con el cósmido pCV38 sitúan al gen *nodD* a la izquierda de un sitio *HindIII* mismo que es la frontera en el cósmido pCV61 y por lo tanto carece de esta copia de *nodD* (ver Fig. 7). Como se ha mencionado en la Introducción, el gen *nodD* es indispensable para activar la transcripción de los genes de nodulación y si no está presente, o está inactivado, el fenotipo de la cepa resultante será Nod⁻. Para explicar el fenotipo de nodulación conferido por el cósmido pCV61 a la estirpe curada RSP900 y su ampliación de espectro de nodulación a la cepa de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* RS1051, decidimos explorar este cósmido en busca de una segunda copia funcional de *nodD*.

Tabla 12.- Fenotipos de Nodulación en Plantas de *P. vulgaris*, y *L. esculenta* y *Macroptilium atropurpureum* de las cepas RSP900 de *R. tropici* y RS1051 de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* portando los clones pCV61 y pJF611

Clona Introducida	Estirpe Receptora					
	RSP900			RS1051		
	Siratros	Frijol	Leucena	Siratros	Frijol	Leucena
ninguna	-	-	-	-	-	-
pCV38 (control)	+	+	+	+	+	+
pCV61	+	+	+	+	+	+
pJF611	+	+	+	+	+	+

N.D No Determinado

Una primera estrategia fue usar técnicas de hibridación utilizando tanto sondas heterólogas (*nodD* 1 y *SyrM* de *R. meliloti*) como sondas homólogas (el fragmento *Eco* RI-*Hind*III de 0.6 kb del cósmido pCV3804 que contiene parte del gen *nodD* (Fig.13B), pero no se ha detectado ninguna copia de este gen en este cósmido (datos no mostrados) Así mismo, tampoco se han detectado homólogos cromosomales del gen *nodD* en esta estirpe, ya que no hay señal de hibridación en el genoma de la estirpe RSP900 con ninguna de las sondas probadas (datos no mostrados).

Decidimos entonces deletar una región *Eco*RI - *Eco*RI de 16 kb del cósmido pCV61 para delimitar la zona de estudio. Este nuevo clon (pJF611, Fig. 7) presenta el mismo fenotipo simbiótico que el cósmido original, es decir, sigue siendo capaz de conferir capacidad de nodulación a las estirpes RSP900 y RS1051 en plantas de *Phaseolus* y *Leucaena*, indicando así que en la región delecionada no hay ningún gen indispensable para la nodulación (Tabla 12). Sin embargo, es de hacerse notar que carece de los genes *nodPQ* y *nodH* (Fig. 7; ver más adelante).

Se utilizó otra estrategia para tratar de demostrar la existencia de un gen *nodD* funcional en este cósmido, ya que es posible que no exista homología suficiente para detectarlo por hibridación. Esta estrategia consiste en medir la inducción de la enzima β -galactosidasa que ha sido fusionada al promotor del gen *nodA* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* y que por lo tanto está regulada por *nodD*. El plásmido pMP154 (Tabla 3), donde está la fusión *nodA-lacZ*, se introdujo en una estirpe curada de *R. etli* (CFN2001), ya que esta cepa presenta una menor actividad residual de β -galactosidasa que la derivada curada de la estirpe CIAT899. Después, a la estirpe CFN2001/pMP154 se le introdujeron los cósmidos pCV61 y su derivado delecionado pJF611. En la Tabla 13 se muestran los resultados de actividad de β -galactosidasa usando distintos inductores. Entre estos, se probaron varios flavonoides puros, de los cuales la naringenina y la apigenina han demostrado ser buenos inductores del gen *nodD* presente en el cósmido pCV38 (ver Tabla 5 y apartado de Actividad de *nodD*). Sin embargo, ninguno de los flavonoides probados fue capaz de inducir la actividad de β -galactosidasa en las cepas 2001/pMP154/pCV61 y 2001/pMP154/pJF611, indicando que en estos cósmidos no hay un gen *nodD* que reconozca estos flavonoides (Tabla 13). Una manera de demostrar la existencia de un gen *nodD* funcional en estos cósmidos es usar exudados de raíz de las plantas hospederas como inductores, ya que la mezcla de flavonoides exudados por *Phaseolus* o *Leucaena*

debería ser reconocida por el gen *nodD*, dado que las estirpes RSP900/pCV61 y RSP900/pJF611 son capaces de nodular estas leguminosas. En la Tabla 13 se muestran las actividades de β -galactosidasa en las cepas 2001/pMP154/pCV61 y 2001/pMP154/pJF611 inducidas por exudados de raíz de *Phaseolus vulgaris* y *Leucaena esculenta*. Como puede observarse, este exudado es incapaz de activar la fusión *nodA-lacZ* en estas cepas, sugiriendo así que en el cósmido pCV61 y su derivado deleciónado no hay un gen *nodD* funcional. Por otro lado, los exudados son capaces de inducir la actividad de β -galactosidasa del plásmido pMP154 cuando se usa el cósmido pCV38 como fuente de *nodD*, demostrando que los exudados son funcionales.

Tabla 13.- ACTIVIDAD INDUCTORA DE LOS COSMIDOS pCV61, pJF611 Y pJFM2 EN LA CEPA CFN2001 DE *R. etli*

Flavonoide Inductor	Actividad de β -galactosidasa (nmol/min/OD ₆₅₀ ml)				
	pMP154 (control)	pCV38	pCV61	pJF611	pJFM2
ninguno	28	34	30	22	25
Naringenina	38	310	23	34	33
Apigenina	34	377	21	27	N.D.*
Genisteina	30	36	23	20	N.D.
Exudado de Frijol	24	254	34	39	N.D.
Exudado de Leucena	26	205	32	28	N.D.

*N.D.: No Determinado

En colaboración con el grupo de la Doctora Carmen Quinto del Instituto de Biotecnología de la U.N.A.M., se ha secuenciado el gen *nodD* y algunas regiones circundantes presentes en el cósmido pCV3802 (ver fig. 7 y apartado c) de esta Tesis). Los datos de secuencia indican que el sitio de restricción *HindIII* separa a los genes *nodABCSIJ* de una región conservada de 50

pares de bases (pb) conocida como *nod*-box o caja de nodulación (Fig. 7). Esta secuencia es reconocida por la proteína NodD que se une a ella para regular la transcripción de los genes de nodulación y se encuentra corriente arriba en casi todos los operones *nod* de muy diversas especies de *Rhizobium*. (ver Introducción). Una posible hipótesis para explicar que el cósmido pCV61 sea capaz de restaurar el fenotipo de nodulación de la cepa RSP900 es que, al perder la caja de nodulación, los genes *nodABCSIJ* hayan perdido su regulación y se estén expresando constitutivamente, es decir, sin la necesidad de ser activados por NodD. De este modo, estarían produciendo factores de nodulación que, al ser reconocidos por la planta dispararían la organogénesis del nódulo. Para demostrar esta posibilidad se usaron dos estrategias distintas:

La primera consistió en hacer un análisis en Cromatografía de Capa Fina (TLC) de las cepas RSP900/pCV61 y RSP900/pJF611 para ver si estas estirpes son capaces de producir lipo-oligosacáridos. Así mismo, el experimento se diseñó para ver la dependencia de flavonoides en la producción de factores de nodulación. Las cepas RSP900/pCV61 y RSP900/pJF611 fueron cultivadas en presencia de glucosamina ¹⁴C durante 24 horas, al término de las cuales se hizo una extracción butanólica del medio para aislar los factores de nodulación. El extracto butanólico fue evaporado totalmente y los factores se resuspendieron en 40 microlitros de n-butanol. Estos extractos se corrieron en placas de TLC usando como solvente acetonitrilo al 50% y fueron expuestas a una película fotográfica durante 15 días. El resultado de este experimento se muestra en la Figura 29; los carriles pares corresponden a cultivos sin inductor (en este caso el flavonoide naringenina), mientras que los carriles impares corresponden a cultivos a los cuales se les añadió naringenina a una concentración final de 1.5 micromolar. Puede observarse que tanto en los cultivos inducidos como en los no inducidos hay producción de factores de nodulación, lo cual demuestra la independencia de su producción por flavonoides en estas estirpes. En contraste, la cepa silvestre CIAT899 sólo produce los factores de nodulación cuando el cultivo es inducido por naringenina. Es de hacer notar que el clon pJF611 sólo produce factor(es) de nodulación no sulfatado(s), ya que carece de los genes *nodH*, y *nodPQ* (ver apartado de Factores de Nodulación y DISCUSION). De este modo, se propone que los genes de nodulación en los cósmidos pCV61 y pJF611 están siendo leídos constitutivamente por haber perdido su secuencia regulatoria (la caja de nodulación).

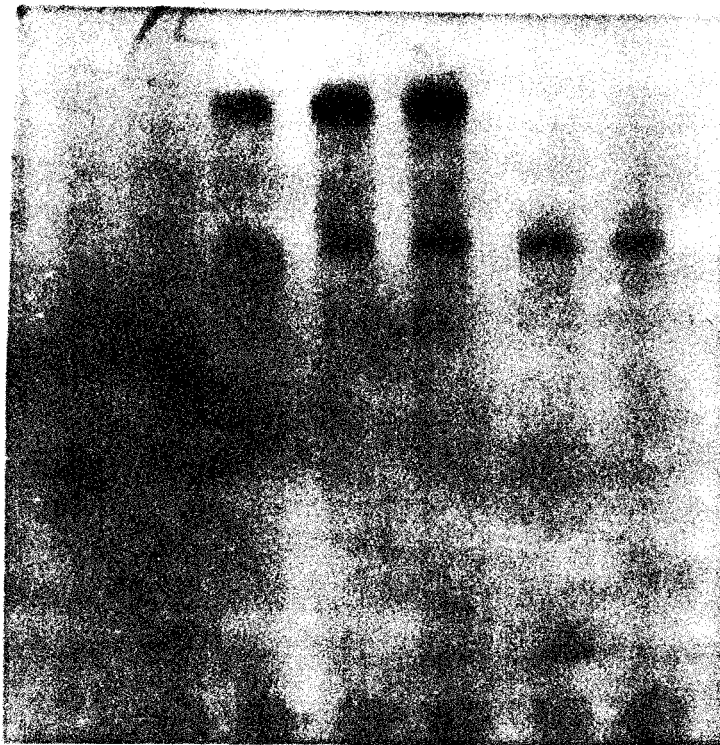


Figura 29.- Cromatografía en capa fina de los lipo-oligosacáridos producidos por los cósmidos pCV61 y pJF611. Carriles 1 y 2: CIAT899; carriles 2 y 3: RSP900/pCV61 y carriles 4 y 5: RSP900/pJF611. Los carriles nones corresponden a cultivos sin inducir. Los carriles pares corresponden a cultivos inducidos por naringenina 1.5 μ M. Todos los cultivos se marcaron con glucosamina 14 C.

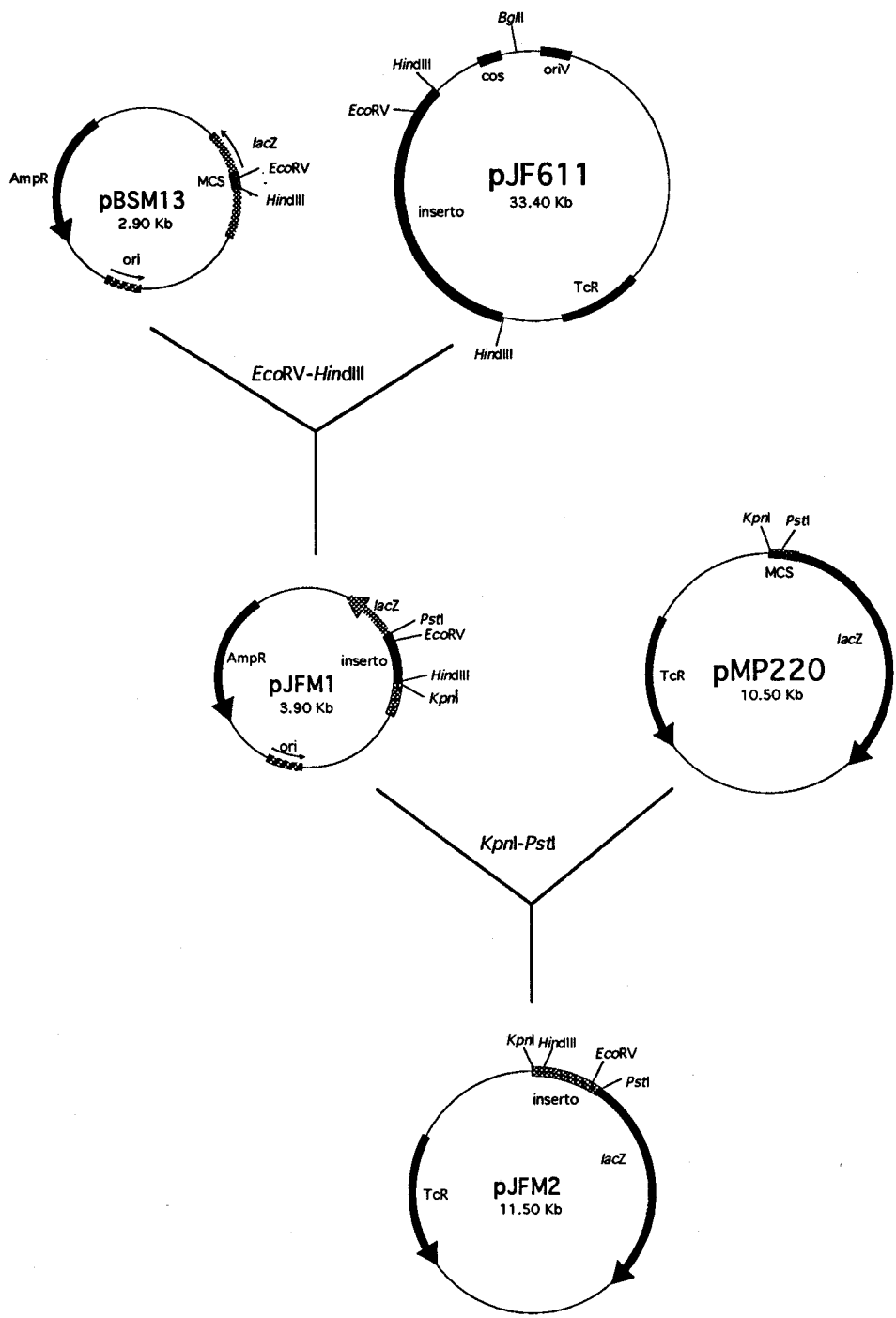


Figura 30. Construcción del plásmido pJFM2

Ahora bien, en todos los Rizobios estudiados hasta la fecha la caja de nodulación resulta ser indispensable para la transcripción de los genes de nodulación y se propone que esta secuencia forma parte del promotor. Por este motivo, exploramos la posibilidad de que existiera una secuencia promotora localizada entre el sitio *Hind*III y el inicio del gen *nodA*. Para tal efecto, decidimos clonar un fragmento *Hind*III-*Eco*RV de 1 kilobase en el plásmido pMP220 resultando el plásmido pJFM2 (Tabla 3; Fig. 30). El plásmido pMP220 ha sido diseñado para la búsqueda de secuencias promotoras en *Rhizobium* ya que contiene un sitio de clonación múltiple (MCS) situado corriente arriba de un gen *lacZ* al cual le ha sido deletado el promotor. Sólo cuando una secuencia promotora sea insertada en el MCS, podrá expresarse la actividad de β -galactosidasa. La Tabla 13 muestra que en esta construcción (plásmido pJFM2) la actividad de β -galactosidasa no es detectable, descartando así que exista una secuencia promotora en el fragmento *Hind*III-*Eco*RV.

Estos resultados experimentales nos han llevado a concluir que los genes de nodulación en el cósmido pCV61 y en el derivado deletado pJF611 son expresados constitutivamente, sin necesidad de NodD, por haber perdido su secuencia regulatoria. Así mismo, debe existir una secuencia promotora en el vehículo de clonación (pVK102, Tabla 3) desde la cual estos genes se están expresando. De esta manera, al ser expresados los genes de nodulación, se sintetizan lipo-oligosacáridos que permiten que estos clones confieran el fenotipo de nodulación positiva cuando son introducidos en la estirpe curada RSP900 y en la estirpe de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* RS1051. Actualmente se está buscando el promotor a partir del cual estos genes son expresados.

V.-DISCUSIÓN

DISCUSION

a) LOCALIZACION FISICA DE LOS GENES DE NODULACION EN *Rhizobium tropici* CIAT899.

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

En este proyecto de investigación, nos hemos centrado en estudiar algunos aspectos moleculares que determinan la capacidad de la estirpe CIAT899 de *R. tropici* de nodular un gran número de leguminosas no relacionadas filogenéticamente. Principalmente, hemos estudiado los aspectos tempranos de la nodulación, ya que es en esta parte del proceso en donde se encuentran las barreras de especificidad en las simbiosis *Rhizobium*-leguminosas. Estas barreras de especificidad en el simbionte bacteriano se encuentran determinadas principalmente por los llamados genes de nodulación y las rutas metabólicas que estos codifican.

En nuestro laboratorio se ha aislado una región del plásmido simbiótico de la estirpe silvestre de *R. tropici* CIAT899 en donde se encuentran un gran número de genes de nodulación. Esta región de ADN fue aislada al complementar con un banco de genoma total de la estirpe CIAT899 a una cepa derivada curada llamada RSP900. Esta estirpe es Nod⁻ dado que carece de los genes de nodulación. Sólo aquellas receptoras que adquieran los genes de nodulación serán capaces de formar nódulos en plantas de judía. Así, se aislaron varios cósmidos capaces de complementar el fenotipo Nod⁻ de la estirpe RSP900, siendo el más grande y representativo el cósmido pCV38 (Fig. 7) (Vargas *et al.*, 1990).

Como primer enfoque, decidimos localizar en esta región de ADN el mayor número de genes de nodulación posibles. Esto se llevó a cabo mediante técnicas de hibridación de ADN, buscando homologías con sondas previamente descritas en otros sistemas (Tabla 4). Estas sondas se escogieron de acuerdo a su importancia como determinantes de especificidad en otras especies de *Rhizobium*.

Así, se han localizado en *R. tropici* CIAT899 los genes *nodABC*, (Vargas, *et al.*, 1990) que han sido descritos en todas las especies de rizobios estudiadas hasta la fecha y son esenciales para la nodulación. Estos genes son llamados genes

nod comunes dado que son funcionalmente intercambiables entre especies muy distintas de rizobios sin afectar el espectro de nodulación de la estirpe receptora. Actualmente se ha propuesto una función bioquímica para cada uno de estos genes que están involucrados, como casi todos los genes de nodulación, en la síntesis de pequeños lipo-oligosacáridos que son los responsables de disparar la organogénesis del nódulo por parte de la planta. Los genes *nodABC* son los responsables de la síntesis de la molécula "base" de estos lipo-oligosacáridos, es decir, un esqueleto de quitina el cual contiene un lípido en el extremo no reductor del azúcar (Figura 4). Así, se ha demostrado que la proteína producto del gen *nodC*, posee homología con algunas quitina sintetas bacterianas o de levadura. Por esta razón se propone que NodC es responsable de unir, a través de enlaces β 1-4, las moléculas de N-acetilglucosamina que forman el esqueleto de quitina del lipo-oligosacárido. Sin embargo, aún está por determinarse el mecanismo a través del cual se determina la longitud del esqueleto de quitina en los factores de nodulación, ya que en casi todas las especies estudiadas se han encontrado familias de estos compuestos en donde el número de unidades de N-acetilglucosamina varía entre tres y cinco (Figura 6).

Recientemente se han llevado a cabo estudios comparando homologías a nivel de proteína entre las proteínas NodB y EnvA, una proteína involucrada en la división celular y cuya función, al parecer, es desacetilar precursores de N-acetilglucosamina involucrados en la síntesis del lípido A en *E. coli* y *S. typhimurium* (Donachie *et al.*, 1987). Los estudios de homología revelan varias regiones con una secuencia similar entre las proteínas NodB y EnvA, además de que el tamaño de ambas es muy similar. Dado que la desacetilación del esqueleto de quitina en los factores de nodulación puede ser muy importante para que la parte lipídica de la molécula sea añadida, se ha propuesto que la proteína NodB lleva a cabo esta función (Figura 6).

Por último, se propone que el producto protéico del gen *nodA* es el encargado de acilar al esqueleto de N-acetilglucosamina para formar la estructura base de los factores de nodulación (Figura 6). Esta hipótesis está apoyada por el descubrimiento, a través del uso de anticuerpos, de una segunda forma de NodA de mayor tamaño que podría corresponder a la forma acilada de esta proteína en *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Spaink *et al.*, 1993). Así mismo, ha surgido la idea de que el gen *nodA* tal vez no sea tan "común" como se piensa, ya que cabe la posibilidad de que su producto sea capaz de tener distintas afinidades por diferentes lípidos dependiendo de la especie de la cual provenga. Actualmente el producto de *nodA* ha sido

purificado y se está probando esta hipótesis (H. Spaink, comunicación personal).

Los genes *nodABC* se han localizado en un subclon del cósmido pCV38 llamado pCV3804. Este clon es la región mínima capaz de conferir el fenotipo Nod⁺ a la estirpe curada RSP900 y esto concuerda con la presencia y función propuesta para los genes *nodABC*.

En este mismo subclon (pCV3804) también se han localizado los genes *nodMN*. Como se mencionó en la Introducción, el gen *nodM* presenta una homología muy significativa con la glucosamina sintasa de *E. coli* y su papel es el de proveer una mayor cantidad de este precursor para la síntesis de los factores de nodulación. Hay que mencionar, sin embargo, que en otras especies estudiadas se ha descrito un homólogo cromosomal de este gen que es capaz de suplirlo en caso de mutación, por lo que el fenotipo de las mutantes *nodM^r* resulta poco claro. El papel del gen *nodN* se desconoce hasta la fecha.

Corriente abajo de los genes *nodABC* y en concordancia con la organización genética encontrada en otras especies (Fig. 3 en Introducción), se han localizado los genes *nodIJ* en *R. tropici* CIAT899 (Vargas *et al.*, 1990) Como se ha mencionado en la Introducción, a estos genes se les atribuye la función de exportar los lipo-oligosacáridos de la célula, aunque probablemente existan mecanismos alternativos de exportación, dado el fenotipo de nodulación que presentan algunas mutantes en estos genes. Este parece ser también el caso en *R. tropici* CIAT899, ya que el subclon pCV3804 carece de estos genes y aún es capaz de nodular plantas de judía con buena eficiencia aunque con algún retraso (Fig. 16A), de manera similar a otras cepas mutantes en *nodIJ*.

Usando sondas de los genes *nodPQ* y *nodH* de *Rhizobium meliloti* (Tabla 4), se han detectado homologías significativas en un fragmento *Bam*HI-*Bam*HI del cósmido pCV38 (Fig. 9). Así mismo se ha detectado una copia cromosomal (ya que hay hibridación en la estirpe RSP900) del gen *nodP* (Fig. 9A carril 2). En *R. meliloti* también se ha descrito la existencia de homólogos cromosomales de los genes *nodPQ*, sin embargo, estudios con dobles mutantes han demostrado que estos homólogos cromosomales son incapaces de suplir completamente las funciones de los genes *nodPQ* localizados en el plásmido simbiótico. Los productos de los genes *nodPQ* poseen homología con proteínas que están involucradas en la síntesis de intermediarios activados de sulfato como el PAPS, y que son usados después por sulfotransferasas para sulfatar diversos substratos. Es posible que los genes *nodPQ* cromosomales estén

involucrados en una ruta metabólica similar pero que no sintetizan el intermediario adecuado para ser reconocido por el producto del gen *nodH*, finalmente encargado de la transferencia del grupo sulfato al los factores de nodulación. Por otro lado, el gen *nodH* descrito en esta Tesis ha demostrado ser funcional, como se verá más adelante y su función es la misma que su homólogo encontrado en *R. meliloti*. La presencia de los genes *nodPQ* y *nodH* en la estirpe CIAT899 de *R. tropici* concuerda con la estructura de los lipo-oligosacáridos producidos por esta estirpe descritos en esta Tesis (ver más adelante) y con aquellos producidos por otra estirpe de *R. tropici* (Poupot *et al.*, 1993).

En otra región más alejada y en contraste con la organización genética encontrada en otras estirpes de rizobios (Fig. 3 en Introducción), se han localizado los genes *nodFE* en la estirpe CIAT899 de *R. tropici* (Fig 11). Se ha mencionado ya que el papel de estos genes en *R. leguminosarum* bv. *viciae* y en *R. meliloti* es el de sintetizar un lípido específico que es añadido al esqueleto de glucosamina por el producto de *nodA* para formar un lipo-oligosacárido que determina la especificidad de hospedero. Los resultados obtenidos por Poupot y colaboradores (1993) no arrojan luz sobre la función de estos genes en *R. tropici*, ya que el lípido que se encuentra en los factores de nodulación mayoritarios producidos por esta estirpe es el ácido *cis*-vaccénico, el lípido más abundante en bacterias gram negativas. Sin embargo, cabe la posibilidad de que otros factores minoritarios producidos por esta estirpe contengan un lípido específico. Los resultados obtenidos en esta Tesis en colaboración con el Dr. Herman Spaink de la Universidad de Leiden y con la Dra. Jane Thomas-Oates de la Universidad de Utrecht, indican que existen factores minoritarios que contienen al menos 4 lípidos distintos del ácido *cis*-vaccénico, sugiriendo así un mecanismo de amplio espectro de hospedero que estaría determinado por los genes *nodFE* presentes en la estirpe CIAT899 de *R. tropici* (ver más adelante).

Usando una sonda de los genes *nodSU* de *Rhizobium etli* se ha detectado homología en un fragmento *Clal-PstI* del plásmido pCV3804 (Fig. 10). Como se ha mencionado en la Introducción, el papel del gen *nodU* es hasta ahora desconocido, pero presenta algunas regiones de homología con el gen *nodC*. El papel del gen *nodS* es el de metilar los lipo-oligosacáridos en diversas especies de *Rhizobium*, sin embargo en algunos casos, como en *Rhizobium fredii*, se ha descrito la presencia de *nodS* pero este gen no es transcrito, por lo que los factores de nodulación producidos por esta estirpe no están metilados. En el caso de *R. tropici* CIAT899 el gen *nodS* es funcional como se verá más adelante y su presencia concuerda con la estructura de los lipo-oligosacáridos

descritos en esta Tesis y con la estructura de los factores de nodulación reportada por Poupot y colaboradores (1993) para la estirpe CFN299 de *R. tropici*.

Por último, también se hicieron hibridaciones usando la sonda del gen *nodL* de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. En este caso no se encontró señal de hibridación con el genoma de *R. tropici* CIAT899. El hecho de no haber detectado al gen *nodL* en esta estirpe, también concuerda con la estructura química de los factores de nodulación reportados para *R. tropici*, ya que estos carecen del O-acetilo en el extremo no reductor del lipooligosacárido (ver más adelante y Poupot *et al.*, 1993).

b) ACTIVIDAD INDUCTORA DE LA PROTEINA NodD

Como se mencionó en la Introducción, el gen *nodD* es uno de los genes determinantes para la especificidad de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas ya que su producto reconoce a los flavonoides excretados por la planta para activar de manera específica la transcripción de los genes de nodulación. Por este motivo, decidimos hacer un estudio acerca de este gen en la estirpe CIAT899 de *R. tropici*. Los resultados de hibridación de ADN usando una sonda homóloga indican la presencia de cuatro copias de este gen en esta estirpe (Fig. 12). De estas cuatro copias se tienen dos clonadas, una en el cósmido pCV64 y la otra en el cósmido pCV38 y varios de sus subclones. Estos clones se probaron para detectar la actividad inductora de NodD usando distintos flavonoides y exudados radicales de algunas plantas hospederas. Los resultados muestran que el producto del gen *nodD* de *R. tropici* CIAT899 presente en el cósmido pCV38, es capaz de reconocer a los flavonoides naringenina, apigenina, chrysin y 7-hidroxyflavona para activar la transcripción del gen reportero *lacZ* a partir del promotor del gen *nodA* de *R. leguminosarum* bv. *viciae*. El flavonoide genisteína no es reconocido por esta proteína NodD, en contraste con aquella de *R. etli* CE3 (ver más adelante). Así mismo, el producto del gen *nodD* de *R. tropici* CIAT899 es capaz de reconocer a los flavonoides presentes en exudados radicales de *Leucaena* y *Phaseolus*, dos de sus hospederos habituales (Tabla 5).

Por otro lado, también se ha demostrado que la copia de *nodD* presente en el cósmido pCV64 no es capaz de activar la transcripción del gen reportero *lacZ* a partir del promotor del gen *nodA* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Tabla 5). Dado que la señal de hibridación en este caso se encuentra en un fragmento *HindIII* interno en el cósmido, es de suponerse que el gen *nodD*

presente en el cósmido pCV64 está completo. Estos resultados sugieren que el gen *nodD* presente en el cósmido pCV64 no tiene un papel directo en la activación de la transcripción de los genes de nodulación como es el caso del gen *nodD2* de *R. meliloti* o *nodD3* de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. Una posible explicación a la presencia de este gen (y tal vez de los otros alelos de *nodD* reportados en esta Tesis) en *R. tropici* CIAT899 es que sea parte del circuito regulatorio que regula al gen *nodD* como es el caso para *R. meliloti* y por lo tanto toda la transcripción de los genes de nodulación. Para demostrar esta hipótesis sería necesario construir cepas en las que las dos clonas estén juntas y ahí observar la dependencia del gen *nodD* funcional tanto de flavonoides como de la otra copia de *nodD*. Así mismo, se podría explorar la actividad de esta copia de *nodD* en otros fondos genéticos para ver si tiene algún papel en la regulación de *nodD*. De ser este el caso, podría inclusive llegar a observarse un cambio en la especificidad de hospedero en la estirpe receptora si se desregulara la expresión de los genes de nodulación como se ha observado en cepas híbridas de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* conteniendo el gen *nodD* de *R. leguminosarum* bv. *viciae*.

c) EXTENSION DEL ESPECTRO DE NODULACION POR UN FRAGMENTO DE ADN QUE CONTIENE LA REGION AMINO TERMINAL DE *nodD* Y UNA CAJA DE NODULACION.

Como una estrategia para analizar el papel del gen *nodD* en la especificidad de la simbiosis, se comprobó que la introducción de un fragmento de 0.5-0.6 kb del cósmido pCV3804 que contiene parte del gen *nodD* y una caja de nodulación en las estirpes silvestres CE3 de *R. etli* y RS1051 de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* extiende el espectro de nodulación de estas especies a plantas de *Phaseolus vulgaris* y *Leucaena esculenta*, respectivamente. Si bien los nódulos formados por estas cepas no son del tamaño ni color como aquellos producidos en estas plantas al ser inoculadas con la estirpe silvestre CIAT899, la barrera de especificidad es sobrepasada al introducir el fragmento que contiene la región amino terminal del gen *nodD* y la caja de nodulación antes descrita. Así mismo, se observa un retraso en el proceso de nodulación cuando se inoculan plantas de *Leucaena esculenta* y *Phaseolus vulgaris* con las estirpes CE3/pCV3827 y RS1051/pCV3827, respectivamente. Para descartar un efecto del número de copias en el fenotipo

observado, decidimos integrar el fragmento de 0.52 kb presente en el cósmido pCR3827 en el plásmido simbiótico de la estirpe silvestre RS1051. No se detectó ninguna diferencia en el fenotipo observado con excepción de que el número de nódulos formado por esta estirpe es significativamente mayor que cuando el fragmento permanece en trans en el plásmido pCR3827 (Tabla 6).

Los datos obtenidos en experimentos de inducción de la actividad de β -galactosidasa fusionada al promotor del gen *nodA* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* indican claramente que en un fondo genético donde no se encuentra *nodD*, el fragmento de 0.5-0.6 kb es incapaz de activar la transcripción de los genes de nodulación (Tabla 7). Esto sugiere que, o bien no hay transcripción de este fragmento, o bien la proteína formada por esta región no es funcional.

Decidimos entonces explorar la actividad inductora de este fragmento de *nodD* en el fondo genético en el cual confiere una ampliación de espectro de hospedador, es decir en las estirpes CE3 de *R. etli* y RS1051 de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Para la estirpe CE3 se usaron genisteína, apigenina y exudado de raíz de *Leucaena* como inductores. A diferencia de los resultados obtenidos en el fondo genético curado (cepa CFN2001), en este caso los plásmidos pCR3827 y pCR3884 son capaces de responder débilmente a exudados de *Leucaena* y a apigenina como inductores, mostrando una inducción de dos veces frente al control (Tabla 8).

Para el caso de la estirpe RS1051 de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* se usaron como inductores naringenina, apigenina, genisteína y exudados radicales de *P. vulgaris*. Ninguno de los inductores probados son capaces de inducir la fusión *lacZ-nodA* cuando se usan los cósmidos pCR3827 y pCR3884 como fuente de *nodD* en la estirpe RS1051; sin embargo, se observó una inducción de cuatro veces cuando se usan exudados radicales de *Phaseolus* como inductor en estas estirpes (Tabla 9).

Estos resultados indican que el fragmento de 0.5-0.6 kb donde está una parte de *nodD* y una secuencia consenso de una caja de nodulación es capaz de extender el rango de hospedero al provocar la transcripción de los genes de nodulación en respuesta a exudados radicales de *Phaseolus* para el caso de la estirpe RS1051 y a exudados radicales de *Leucaena* para el caso de la estirpe CE3. Ahora bien, el mecanismo a través del cual se dispara la transcripción de los genes de nodulación no está tan claro. Como se mencionó en la Introducción, se han identificado regiones de la proteína NodD asociadas a ciertas funciones. Así, se sabe que la parte amino terminal de esta proteína presenta una estructura típica de unión a ADN, mientras que el extremo

carboxilo terminal, más divergente entre distintas especies de *Rhizobium*, se ha involucrado en el reconocimiento a flavonoides. Un posible mecanismo a través del cual el fragmento de 0.5-0.6 kb extiende el espectro de nodulación sería que al perder el extremo carboxilo terminal la proteína NodD codificada por dicho fragmento haya perdido su regulación por flavonoides y ahora actúe de manera constitutiva activando la transcripción de los genes de nodulación independientemente del flavonoide. Sin embargo hay algunos datos que se contraponen a esta hipótesis. En primer lugar los datos obtenidos usando como fondo genético la estirpe CFN2001 apuntan a que no se esté haciendo un producto funcional a partir del pedazo de *nodD* contenido en este fragmento de ADN, ya que no hay inducción de la fusión *nodA-lacZ*. Por otro lado, en el fondo genético donde existe un *nodD* silvestre (CE3 y RS1051), hay una clara respuesta a exudados radicales, indicando así que los flavonoides siguen teniendo un papel en la inducción de los genes de nodulación en estas estirpes.

Por otro lado, se ha demostrado que una región en la parte amino terminal de la proteína NodD tiene homología con una estructura llamada módulo receptor encontrada en muchas proteínas regulatorias bacterianas. El hecho de encontrar esta estructura en la proteína NodD sugiere la posibilidad de que esta interactúe con otras proteínas o con NodD misma para llevar a cabo su función inductora. De hecho, se ha sugerido que NodD actúa como un tetrámero para activar la transcripción de los genes de nodulación (ver Introducción). Si este fuera el caso, es posible que una proteína NodD truncada pudiera aún formar asociaciones con las proteínas NodD silvestres encontradas en las estirpes CE3 y RS1051 y que estos complejos híbridos fueran los responsables del cambio de especificidad de hospedero al activar la transcripción de los genes de nodulación en respuesta a los flavonoides excretados por la planta no hospedera habitual.

Por último, una explicación alternativa sería que la caja de nodulación presente en el fragmento de 0.5-0.6 kb esté desregulando la expresión de los genes de nodulación y permita una transcripción basal de estos genes que llevaría a la síntesis de lipo-oligosacáridos para iniciar el proceso de nodulación. Este mecanismo implicaría la titulación de algún factor protéico al estilo de NolR, una proteína represora encontrada en *R. meliloti* (ver Introducción). Así, si existiera un represor de la transcripción de los genes de nodulación en las estirpes CE3 y RS1051 y este fuera "capturado" por la caja de nodulación presente en el fragmento de 0.5-0.6 kb es posible que la transcripción de los genes de nodulación se desregulara en respuesta a flavonoides extendiendo así el espectro de

hospedero. Actualmente se están haciendo algunos experimentos para comprobar cual de estas posibles hipótesis es la más adecuada para explicar la extensión de espectro de hospedero conferida por el fragmento de 0.5-0.6 kb.

Es evidente que los lipo-oligosacáridos producidos por la estirpe RS1051 de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* son capaces de ser reconocidos por *Phaseolus vulgaris*, pero no por plantas de *Leucaena* y también que los factores de nodulación producidos por *R. etli* CE3 son reconocidos por plantas de *Leucaena*. Sin embargo, es posible que estos factores no tengan la estructura o la cantidad óptima para nodular estas plantas, ya que se observa un retraso en la nodulación y los nódulos formados no son del mismo tamaño ni aspecto que aquellos producidos por la estirpe silvestre CIAT899 de *R. tropici*.

d)ANALISIS DE LOS LIPO-OLIGOSACARIDOS PRODUCIDOS POR *R. tropici* CIAT899

Otro de los factores que determinan la especificidad de hospedero, además del reconocimiento de flavonoides específicos por la proteína NodD, es la producción de pequeños lipo-oligosacáridos que, al ser reconocidos por la planta, disparan el proceso de organogénesis que da lugar al nuevo órgano en donde se lleva a cabo la fijación de nitrógeno: el nódulo. Como se ha mencionado anteriormente, la producción de estos lipo-oligosacáridos está codificada por los genes de nodulación y la estructura de estos compuestos estará determinada por el conjunto de genes de nodulación que posea la bacteria y su regulación. Como parte de los objetivos de este proyecto, decidimos analizar la estructura de los factores de nodulación producidos por *R. tropici* CIAT899. Esta parte del proyecto se llevó a cabo en colaboración con el Dr. Herman Spaink de la Universidad de Leiden, en Holanda.

En un primer enfoque, se usaron técnicas de Cromatografía de Capa Fina para el análisis de los factores de nodulación producidos por *R. tropici* CIAT899. En el primer análisis usando acetato ¹⁴C para marcar los lipo-oligosacáridos, se detectaron tres bandas específicas de cultivos inducidos por naringenina, una de las cuales presenta una movilidad muy rápida lo que sugirió que probablemente esta molécula estuviera sulfatada, ya que para otras especies se han descrito este tipo de compuestos (Fig. 17). Para comprobar esta posibilidad se marcó un cultivo inducido por naringenina con sulfato ³⁵S y se analizaron los productos por TLC. El resultado es confirmativo de que este

compuesto está sulfatado (Fig. 17). Esto está en concordancia con la presencia de los genes *nodH* y *nodPQ*, cuyo papel, como se ha mencionado es el de sulfatar los factores de nodulación. Por otro lado, también se marcaron cultivos inducidos por naringenina con glucosamina ¹⁴C, ya que este compuesto es precursor de la síntesis de los lipo-oligosacáridos y se incorpora más eficientemente a estos compuestos. El resultado de este experimento permite detectar una cuarta banda específica de la condición inducida, mostrando así la producción de al menos 4 lipo-oligosacáridos distintos en *R. tropici* CIAT899 (Fig. 17). La técnica de TLC no es suficientemente resolutive para descartar la presencia de varios compuestos de una composición similar en una misma banda, por lo que se hace necesario un análisis por HPLC para analizar con más detalle la producción de lipo-oligosacáridos como se verá más adelante.

Una posibilidad para explicar el mecanismo de amplio espectro de nodulación en *R. tropici* es que ante distintos hospederos que exudan distintos flavonoides, la bacteria sintetize diferentes factores de nodulación, de acuerdo a la planta a la cual vaya a nodular. Por este motivo decidimos explorar el patrón de factores de nodulación producidos en cultivos inducidos por distintos flavonoides. En el apartado b) de esta Tesis se ha demostrado que los flavonoides naringenina, apigenina, chrysin y 7-hydroxyflavona son inductores de los genes de nodulación para *R. tropici*, de modo que decidimos usarlos para inducir cultivos marcados con glucosamina ¹⁴C y analizar el patrón de factores de nodulación sintetizados en respuesta a estos flavonoides. Los resultados de este experimento muestran un patrón idéntico en todos los casos (Fig. 18) Sin embargo, este experimento no es conclusivo en el sentido de que dentro de las distintas bandas es posible que existan diferencias cuantitativas o sutilmente cualitativas que no es posible detectar por esta técnica. Actualmente se ha diseñado un experimento similar pero usando exudados radicales de distintos hospederos, lo cual se asemeja más a la condición natural. Otro experimento necesario para explorar la producción de factores de nodulación ante distintos hospederos es hacer un cultivo a gran escala inducido por distintos flavonoides o exudados radicales y hacer un análisis por HPLC, que es más fino y cuantitativo que el de TLC.

Siguiendo con el análisis estructural de los lipo-oligosacáridos producidos por *R. tropici* CIAT899, decidimos analizar estos factores para la presencia de un grupo metilo en ellos, ya que en apartado a) de esta Tesis se ha descrito la presencia del gen *nodS* en esta estirpe. Como se ha mencionado en la Introducción, el papel del gen *nodS* en otras estirpes donde

se ha descrito, es el de metilar los lipo-oligosacáridos. Ahora bien, no en todas las especies donde se encuentra el gen *nodS* este es funcional, como es el caso de *Rhizobium fredii*, en donde se ha detectado una copia de este gen que no se transcribe y por lo tanto los factores de nodulación producidos por esta estirpe no están metilados. Para analizar si los lipo-oligosacáridos producidos por *R. tropici* CIAT899 están o no metilados, se hicieron cultivos inducidos por naringenina en presencia de L-(methyl-¹⁴C) metionina ya que este compuesto es un donador de grupos metilo en varios procesos metabólicos. El resultado de este experimento confirma que en *R. tropici* CIAT899 el gen *nodS* es funcional y que los factores de nodulación producidos por esta estirpe están metilados, además de estar sulfatados (Fig. 19).

Así mismo, en experimentos paralelos, se probó la funcionalidad del gen *nodS* en otras especies de *Rhizobium* para demostrar su funcionalidad. Así, se probaron las estirpes CE3 de *R. etli* (una estirpe de espectro de nodulación reducido que nodula plantas de judía) y la estirpe GRH2, de amplio espectro de nodulación que fue aislada de plantas de acacia y que es capaz de nodular plantas de *Phaseolus*. Los resultados muestran que en estas tres especies, el gen *nodS* es funcional y provoca la producción de factores de nodulación metilados (Fig. 19). La inserción del transposón Tn5 en el gen *nodS* de *Rhizobium etli* inactiva este gen por lo que los lipo-oligosacáridos producidos por esta estirpe carecen del grupo metilo, demostrando así que la incorporación de este grupo funcional a los factores de nodulación es específica y requiere de la actividad de NodS (Fig. 19). Ahora bien, estos resultados no arrojan luz sobre el papel del grupo metilo como determinante para que una determinada estirpe sea de amplio espectro de nodulación, ya que este gen se ha encontrado tanto en estirpes de amplio espectro de nodulación (*R. tropici* y *Rhizobium* sp. GRH2) como en estirpes de espectro reducido de nodulación como *A. caulinodans* y *R. etli*. Actualmente se están haciendo experimentos para determinar el papel de este gen en la capacidad de nodular diversas plantas como *Phaseolus*, *Leucaena* y *Macroptilium*.

La manera más fina de analizar los factores de nodulación producidos por *Rhizobium* es por técnicas de HPLC. Esta técnica permite separar y purificar los distintos lipo-oligosacáridos y hacer mediciones cuantitativas y cualitativas, pero es necesario obtener una gran cantidad de material para hacer este tipo de análisis. Para esto, decidimos construir cepas sobreproductoras de factores de nodulación derivadas de la estirpe silvestre CIAT899, ya que en otras especies se ha demostrado que introduciendo el gen *nodD* y/o otros genes de nodulación en

multicopia, la estirpe resultante sobreproduce estos compuestos. De este modo, introdujimos a la estirpe silvestre CIAT899 distintos plásmidos de diferentes grupos de incompatibilidad que son portadores de los genes *nodD* y *nodL* con el objetivo de obtener una cepa sobreproductora y estable que nos permitiera la purificación de factores de nodulación en cantidad suficiente para hacer el análisis de estos compuestos por HPLC. El análisis por TLC de varias de estas estirpes sobreproductoras muestra que todas producen aproximadamente la misma cantidad de factores de nodulación, pero decidimos en un principio usar la estirpe CIAT899/pMP281 (que contiene el gen *nodD* de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, ver Tabla 3) ya que presenta un menor fondo en el cultivo sin inducir (Fig. 20). Sin embargo, al hacer el análisis por HPLC de cultivos inducidos por naringenina de esta cepa, notamos que el flavonoide utilizado migra en el mismo lugar que los compuestos sulfatados, por lo que los enmascara haciendo difícil su análisis (Fig. 21). Por este motivo, decidimos usar en su lugar a la cepa CIAT899/pMP604, que es portadora de un gen *nodD* FITA y por lo tanto no es necesaria la adición de flavonoides para la producción de lipo-oligosacáridos. Los resultados del análisis por HPLC de los factores producidos por esta estirpe, muestra la presencia de 8 picos específicos que no se encuentran en un cultivo no inducido de la estirpe CIAT899/pMP281 (Fig. 22). De estos picos hay un grupo de 6 que eluyen de la columna a una concentración de 30% de acetonitrilo/agua, indicando así que son bastante hidrofílicos ya que probablemente contengan un grupo sulfato. Por otro lado, los dos picos restantes eluyen al 40% de acetonitrilo/agua indicando que son más hidrofóbicos y sugiriendo la ausencia del grupo sulfato, como se ha visto en los resultados por TLC. Estos picos fueron purificados y se hizo un análisis de espectrometría de masas para determinar su composición química (Tablas 10 y 11).

El pico 1 esta compuesto por 3 factores de 5 unidades de N-acetilglucosamina que están sulfatados; uno de ellos además está N metilado y se detecta la presencia de dos lípidos distintos, ambos de 16 carbonos pero con distinto número de insaturaciones. El pico 2 consiste de un sólo factor de nodulación que contiene 5 residuos de N-acetilglucosamina, un grupo sulfato, un grupo metilo y un ácido graso de 16 carbonos sin insaturaciones. El pico tres también presenta un sólo componente de 5 residuos de N-acetilglucosamina sulfatado pero el ácido graso es de 18 carbonos con una insaturación; este compuesto no está N metilado. El pico 4 consta de 5 factores, 4 de ellos contienen 5 residuos de N-acetilglucosamina mientras que el restante contiene sólo 4

residuos de este azúcar. Todos ellos están sulfatados y uno además metilado. En esta familia encontramos varios lípidos distintos tanto de 16 como de 18 carbonos y con una o dos insaturaciones. Los picos 5 y 6 corresponden al mismo compuesto siendo este un quitopentasacárido metilado y sulfatado con un lípido de 18 carbonos y una insaturación. El pico 7 contiene dos componentes de los que ninguno está sulfatado, ambos contienen un ácido graso de 18 carbonos, pero uno consta de 4 residuos de glucosamina y otro de 5, además el tetrámero contiene una hexosa en el extremo reductor de la molécula. Por último, el pico 8 contiene un quitopentasacárido N metilado y con un lípido de 18 carbonos y una insaturación. Así, se han detectado 11 factores de nodulación de composición diferente en *R. tropici* CIAT899 (Tabla 10). Estos resultados coinciden parcialmente con los resultados obtenidos por Poupot *et al.* (1993) para la estirpe CFN299 de *R. tropici*, aunque estos autores sólo reportan la estructura de dos factores de nodulación que probablemente sean los más abundantes en esta estirpe. Los datos obtenidos por estos autores no explican el amplio espectro de nodulación de la estirpe CFN299 de *R. tropici*, ya que los lipo-oligosacáridos reportados no contienen ningún grupo funcional distinto a los factores de nodulación descritos para especies de espectro reducido de nodulación como lo son *R. meliloti* o *R. leguminosarum* bv. *viciae*. En contraste, nuestros resultados para la cepa CIAT899 de *R. tropici* sí explican su amplio espectro de nodulación. El hecho de que exista esta gran familia de factores de nodulación en *R. tropici* CIAT899 puede explicar su amplio espectro de nodulación, ya que esta variedad de moléculas podrían ser reconocidas por una gran variedad de leguminosas distintas. Es importante hacer notar que para otras especies de amplio espectro de nodulación como *Rhizobium* sp. NGR234 también se han descrito factores de nodulación que contienen otro azúcar distinto de la N-acetilglucosamina (como arabinosa o N-metilfucosa) en el extremo reductor de la molécula. Al parecer, esta característica es importante para conferir a estas especies un amplio espectro de nodulación, aunque aún se desconoce el papel exacto de este grupo funcional. Actualmente se están haciendo experimentos para determinar la actividad biológica de los distintos factores de nodulación en diferentes hospederos de la cepa CIAT899 como lo son *Phaseolus*, *Leucaena*, *Macroptilium* y *Medicago*.

La estructura química de los lipo-oligosacáridos producidos por *R. tropici* CIAT899 aquí descrita, concuerda con la presencia de los genes de nodulación encontrados en esta

especie. Así, la presencia de los genes *nodPQ* y *nodH* concuerda con la presencia del grupo sulfato encontrado en los lipo-oligosacáridos producidos por *R. tropici* CIAT899 y demuestra que estos genes son funcionales en esta estirpe. Así mismo, la presencia del gen *nodS* también concuerda con la estructura de los lipo-oligosacáridos metilados encontrados en esta cepa. Por otro lado, la presencia de una gran variedad de lípidos distintos, demuestran que los genes *nodFE* aquí descritos son funcionales y tienen un papel relevante en la producción de los factores de nodulación de *R. tropici* CIAT899.

En otra serie de experimentos exploramos el papel del gen *nodL* en la síntesis de lipo-oligosacáridos en diversas especies de *Rhizobium*. Como se ha mencionado en la Introducción, el gen *nodL* codifica para una O-acetil transferasa y su papel es el de O-acetilar los lipo-oligosacáridos producidos por *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Al construir las cepas sobreproductoras de factores de nodulación, observamos que cuando está presente el gen *nodL* en ellas se observa una diferencia en el patrón de migración de los lipo-oligosacáridos producidos (Fig. 23). Esta diferencia muy probablemente se deba a que los factores de nodulación en estirpes que normalmente no están O-acetiladas (como *R. etli*, *R. tropici* *R. loti* y *Rhizobium* sp. GRH2), ahora son reconocidos por el producto de *nodL* y son O-acetilados. Este fenómeno, se comprobó haciendo un análisis por TLC de las estirpes de *Rhizobium* antes mencionadas con o sin el gen *nodL*. En todos los casos, se observa una diferencia en la migración de los factores de nodulación, indicando así que la proteína NodL de *R. leguminosarum* bv. *viciae* es capaz de reconocer una gran variedad de lipo-oligosacáridos como substratos (Fig. 23).

En contraste, el gen *nodS* parece tener un espectro más limitado en el reconocimiento de los substratos que N-metila. Esto se comprobó usando las estirpes antes mencionadas con o sin *nodL* pero marcando los cultivos con L-(methyl-¹⁴C) metionina de modo de averiguar si los factores O-acetilados están también N-metilados. El resultado de este experimento muestra que en presencia de *nodL* los factores producidos no incorporan marca radioactiva, demostrando así que no están N-metilados (Fig. 24). Probablemente, el hecho de que estos factores estén O-acetilados por el producto de *nodL* previene su metilación, indicando así que el producto de *nodS* es incapaz de N-metilar lipo-oligosacáridos que estén O-acetilados. Actualmente se han purificado los factores de nodulación producidos por las estirpes que contienen al gen *nodL* y se está a la espera de los resultados de espectroscopía de masas para determinar su composición química. Así mismo se están

llevando a cabo pruebas de nodulación con las distintas estirpes y en distintos hospederos para determinar la importancia de los grupos O-acetilo y N-metilo en la especificidad de hospedero.

e) ANALISIS DE LOS REQUERIMIENTOS
ESTRUCTURALES DE LOS LIPO-OLIGOSACARIDOS DE *R.
tropici* PARA LA NODULACION DE PLANTAS DE
Phaseolus y *Leucaena*

En una línea similar, se hicieron experimentos para analizar los requerimientos estructurales de los lipo-oligosacáridos producidos por *Rhizobium tropici* CIAT899 para nodular dos de sus hospederos habituales: *Leucaena* y *Phaseolus*. Para esto, decidimos usar la estirpe silvestre y dos cepas derivadas de ella portadoras de dos regiones distintas en donde se encuentran genes de nodulación conocidos y cuya función ha sido demostrada. Así, se usaron los cósmidos pCV38 y pCV3804 (Fig. 7) que fueron introducidos en la estirpe RSP900, derivada curada de la estirpe silvestre CIAT899. Como un primer paso, se hizo un análisis por TLC de los factores de nodulación producidos por los dos cósmidos, usando acetato ¹⁴C para marcar estos compuestos. Los resultados indican que el cósmido pCV38 es capaz de producir un patrón de lipo-oligosacáridos muy parecido al de la cepa silvestre CIAT899. Sin embargo los factores mayoritarios producidos por este cósmido parecen ser muy similares a los de la estirpe silvestre (Fig. 25). Este resultado es de esperarse ya que este cósmido es muy grande y contiene la mayoría de los genes de nodulación encontrados en la estirpe silvestre CIAT899. Este cósmido es capaz de producir las dos familias mayoritarias de compuestos sulfatados y no sulfatados así como los factores metilados al igual que la estirpe silvestre CIAT899, ya que contiene los genes *nod* comunes, los genes *nodPQ* y *nodH* (involucrados en la sulfatación de los factores de nodulación) y el gen *nods*, involucrado en la metilación de los lipo-oligosacáridos (Fig. 28). En contraste, el cósmido pCV3804 carece de los genes *nodPQ* y *nodH* y por lo tanto, no es capaz de sintetizar la familia de compuestos sulfatados encontrados en las cepas anteriormente mencionadas. Sin embargo, este cósmido produce los factores metilados, indicando así que en esta región se encuentra el gen *nods* completo y funcional (Figs. 25 y 28).

El siguiente paso fue hacer un estudio de la cinética de nodulación de estas cepas en plantas de *Leucaena* y *Phaseolus*. Los resultados indican que para plantas de *Phaseolus*, las tres

estirpes probadas son capaces de formar aproximadamente el mismo número de nódulos, siendo estos muy similares en tamaño y color a aquellos producidos por la cepa silvestre CIAT899 (Figs. 26 y 27). Sin embargo se aprecia un ligero retraso en el fenotipo de nodulación de las cepas RSP900/pCV38 y RSP900/pCV3804. Este retraso podría deberse a la ausencia de algún gen de nodulación no esencial (como *nodIJ* en el cósmido pCV3804) o bien a la ausencia de otros genes involucrados en la simbiosis como genes de producción de exopolisacáridos. Sin embargo, estos resultados indican que la presencia del grupo sulfato en los factores de nodulación de *R. tropici* CIAT899 no es importante para la nodulación en plantas de *Phaseolus*, ya que tanto la estirpe que los produce como la cepa que no los produce muestran fenotipos muy similares (Fig. 26). Esto está en contraste con el caso de la simbiosis *Medicago-R. meliloti*, en donde la presencia del grupo sulfato es indispensable para que ocurra la nodulación.

El caso para plantas de *Leucaena esculenta* es muy distinto. Las cepas que son capaces de producir factores de nodulación sulfatados (CIAT899 y RSP900/pCV38) muestran un fenotipo de nodulación similar, aunque en este caso la estirpe RSP900/pCV38 no alcanza a formar el mismo número de nódulos que la estirpe silvestre y muestra un retraso en el tiempo de nodulación (Fig. 26). Este fenotipo podría explicarse por la ausencia de alguno de los factores de nodulación minoritarios o bien que los genes de producción de exopolisacáridos tuvieran un papel más importante en la nodulación de esta leguminosa. Ahora bien, la cepa RSP900/pCV3804, que produce solamente compuestos no sulfatados muestra una eficiencia de nodulación muy baja, además del retraso temporal en el fenotipo de nodulación (Fig. 26). Así mismo, el tamaño de los nódulos formados por esta estirpe en plantas de *Leucaena* es mucho más reducido que aquellos producidos por la estirpe silvestre. Estos resultados apuntan a que la presencia del grupo sulfato en los lipooligosacáridos producidos por *R. tropici* CIAT899 es muy importante (aunque no esencial) para la nodulación en plantas de *Leucaena*.

Actualmente se han diseñado experimentos para analizar la importancia de otros grupos funcionales como el grupo metilo y los distintos lípidos en la especificidad de hospedero en la simbiosis *R. tropici*-leguminosas.

f) ANALISIS DEL COSMIDO pCV61

En el aislamiento inicial de la región de nodulación de *R. tropici* CIAT899, se aisló también el cósmido pCV61 (Fig. 7, Tabla 3). Este cósmido sobrelapa con el cósmido pCV38, pero es más pequeño y presenta la particularidad de carecer del gen *nodD* presente en el cósmido pCV38 (Fig 7). Sin embargo, cuando este cósmido es introducido en la estirpe curada RSP900, confiere el fenotipo Nod⁺ en plantas de *Phaseolus*, *Leucaena* y *Macropodium*. Así mismo, el cósmido pCV61 es capaz de ampliar el espectro de nodulación a plantas de *Phaseolus*, *Macropodium* y *Leucaena* cuando es introducido a la estirpe silvestre RS1051 de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Tabla 12).

Como se ha mencionado en la Introducción, el gen *nodD* es indispensable para activar la transcripción de los genes de nodulación, y si está ausente o inactivado producirá un fenotipo Nod⁻. Por este motivo, decidimos buscar por técnicas de hibridación si existe un alelo de *nodD* en el cósmido pCV61 que explique su fenotipo de nodulación al ser introducido a la estirpe RSP900 (que carece de todos los alelos de *nodD* descritos para *R. tropici*)

Los experimentos de hibridación usando tanto sondas homólogas (el fragmento *HindIII-EcoRI* del cósmido pCV3802, ver Fig. 13) como sondas heterólogas (el gen *nodD1* y el gen *SyrM* de *R. meliloti*) dan un resultado negativo, sugiriendo que en caso de haber algún gen que supla a *nodD* en el cósmido pCV61 no hay homología suficiente para ser detectado por esta técnica.

Decidimos entonces delecionar una región interna *EcoRI-EcoRI* de este cósmido para delimitar la zona de estudio. El clon resultante PJF611, continúa confiriendo el fenotipo original que presenta el cósmido pCV61, por lo que es de suponerse que no existe ningún gen esencial para la nodulación en el fragmento de 16 kb que ha sido delecionado (Tabla 12).

Otra estrategia que usamos para tratar de detectar la presencia de un alelo de *nodD* en el cósmido pCV61 fue la de probar si en esta región de ADN existe algún gen que sea capaz de inducir la actividad de β -galactosidasa de una fusión del gen *lacZ* con el promotor del gen *nodA* de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, que está regulado por NodD. Tanto el cósmido pCV61 como su derivado delecionado el cósmido pJF611 se introdujeron a la cepa CFN2001 de *R. etli* (que presenta una menor actividad residual de β -galactosidasa que la estirpe

curada RSP900) junto con el plásmido pMP154 donde se encuentra la fusión *nodA-lacZ*. Los resultados del experimento usando distintos flavonoides y aún exudados radicales como inductores son negativos, indicando así que en esta región de ADN no hay ningún gen que sea capaz de activar los promotores de los genes de nodulación (Tabla 13). Así mismo, no se nota una actividad de β -galactosidasa mayor que la del control, indicando que tampoco hay una activación constitutiva a partir del promotor de *nodA* (Tabla 13).

Al analizar los datos de secuencia de ADN de esta región obtenidos en colaboración con la Dra. Carmen Quinto del Instituto de Biotecnología de la UNAM, nos percatamos de que el sitio *HindIII* en donde está clonado el cósmido pCV61 separa los genes *nodABCSIJ* de una caja de nodulación que presumiblemente regula este operón dada su orientación y la distancia a la que se encuentra. Una posible explicación al fenotipo conferido por el cósmido pCV61 y su derivado delecionado, es que los genes de nodulación se esten transcribiendo constitutivamente por haber perdido su caja de nodulación.

Una manera de demostrar que los genes de nodulación se están leyendo constitutivamente en estos cósmidos, es analizar la producción de factores de nodulación en las estirpes a las cuales confieren el fenotipo Nod⁺. Los experimentos de TLC llevados a cabo con los cósmidos pCV61 y pJF611 demuestran que ambos cósmidos son capaces de producir factores de nodulación aún en ausencia de inductores como naringenina (Fig. 29). Si bien, es de notarse que el cósmido pJF611 sólo produce lipo-oligosacáridos no sulfatados ya que carece de los genes *nodPQ* y *nodH* (ver más adelante). Este hecho, explica el fenotipo de nodulación conferido por estos cósmidos en la estirpes en donde se ha probado. Al producir los factores de nodulación independientemente de *nodD*, la estirpe receptora será capaz de nodular a los hospederos habituales de *R. tropici*, explicando así que al ser introducido en la estirpe RS1051 de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* el cósmido pCV61 confiera la extensión de espectro de nodulación a sus hospederos *Leucaena*, *Macroptilium* y *Phaseolus* dado que produce los lipo-oligosacáridos necesarios para ser reconocidos por la planta hospedera.

En todos los sistemas hasta ahora descritos, la caja de nodulación es parte indispensable de los promotores que controlan la expresión de los genes de nodulación, por lo que decidimos probar si la transcripción de los genes de nodulación en el cósmido pCV61 se está llevando a cabo desde un promotor presente en el ADN de *R. tropici* o bien si se está dando desde un

promotor del vehículo de clonación. Para tal efecto, se clonó el fragmento *HindIII-EcoRV* del cósmido pJF611 en el plásmido pMP220 (Fig. 30). Este plásmido ha sido diseñado para la búsqueda de promotores en *Rhizobium* y contiene un sitio de clonación múltiple corriente arriba de un gen *lacZ* al que se le ha deletado su promotor. Sólo cuando una región promotora entre al sitio de clonación múltiple se detectará la actividad de β -galactosidasa. De existir un promotor en el fragmento *HindIII-EcoRV* del cósmido pJF611, este debería ser constitutivo, de acuerdo con los datos obtenidos en los experimentos de producción de lipo-oligosacáridos. Sin embargo, no se detecta actividad de β -galactosidasa ni aún usando flavonoides como inductores (Tabla 13). Estos datos nos llevan a la conclusión de que los genes de nodulación en el cósmido pCV61 y en su derivado deletado pJF611 están siendo leídos desde un promotor presente en el cósmido pVK102 que es el vehículo de clonación. Actualmente se están haciendo experimentos para demostrar esta hipótesis.

Ahora bien, en casi todas las especies de *Rhizobium* (con la excepción de *R. etli*) estudiadas hasta la fecha, los genes *nodABCDEFGHI* forman un operón. El resto de los genes de nodulación están organizados en diferentes unidades transcripcionales que, con excepción de *nodPQ* y *nodVW*, todas poseen una caja de nodulación y están reguladas por *nodD*. Los resultados obtenidos con el cósmido pCV61 llaman la atención en el sentido de que los lipo-oligosacáridos producidos por este cósmido están sulfatados, indicando así que los productos de los genes *nodPQ* y *nodH* están siendo sintetizados y son funcionales. Esto implica que el gen *nodH* en *R. tropici* puede ser expresado a través de un sistema alternativo a *nodD*, ya que en este caso se producen factores de nodulación sulfatados en ausencia de *nodD* y flavonoides. Una posible explicación a este fenómeno la encontramos en un par de genes que han sido descritos en *B. japonicum* y que forman parte de un sistema regulatorio de dos componentes. Estos genes han sido denominados *nodV* y *nodW* pero sólo han sido encontrados en *B. japonicum*, aunque han sido buscados por técnicas de hibridación en otras especies (C. Quinto, comunicación personal). Este par de genes han demostrado ser indispensables en la regulación de los genes de nodulación en *B. japonicum* y se postula que *nodV*, la proteína sensora, responde a flavonoides para activar a *nodW*, la proteína reguladora. De existir un sistema similar en *R. tropici*, este es independiente de la presencia de flavonoides, por lo que tal vez no se parezca tanto al sistema *nodV-nodW* de *B. japonicum*. Actualmente, se ha diseñado un experimento para buscar homólogos de *nodV* y *nodW* en *R. tropici* que consiste en

complementar mutantes en estos genes de *B. japonicum* con una genoteca de *R. tropici*, buscando complementación funcional de las mutaciones, ya que no parece haber homología suficiente para que estos genes sean detectados por técnicas de hibridación. Así mismo, se secuenciará la región donde se encuentran los genes *nodPQ* y *nodH* para llevar a cabo un análisis de la región promotora y ver si es posible identificar una caja de nodulación o alguna otra estructura que explique la transcripción de *nodH* independientemente de *nodD*.

En este proyecto se han estudiado los genes de nodulación de *R. tropici* CIAT899 y los lipo-oligosacáridos producidos por esta estirpe en un intento de comprender mejor los eventos tempranos del proceso de nodulación. Usando técnicas de hibridación de ADN se han identificado varios genes de nodulación que son de importancia para determinar la especificidad de hospedero en otras especies. La gran mayoría de los genes aquí descritos han demostrado ser funcionales y tener un papel en la síntesis de los factores de nodulación producidos por esta estirpe. Así mismo, se han llevado a cabo estudios sobre el papel del gen *nodD* como determinante en la ampliación de espectro de nodulación y su regulación por flavonoides y exudados radicales. Por otro lado, se ha descrito la producción de una gran variedad de lipo-oligosacáridos que podrían tener un papel determinante en el amplio espectro de nodulación presentado por la estirpe CIAT899 de *Rhizobium tropici*.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Albright, C.M., Huala, E. & Ausbel, F.M. 1989. Procariotic signal transduction mediated by sensor and regulatory protein pairs. *Annual Review of Genetics*. 23, 311-336
- Anthamatten, D & Hennecke, H. 1991. The regulatory status of the *fixL* and *fixL*-like genes in *Bradyrhizobium japonicum* may be different from that in *R. meliloti*. *Molecular and General Genetics*. 225, 38-48.
- Baev, N., Endre, G., Petrovics, G., Banfalvi, Z., & Kondorosi A. 1991. Six nodulation genes of *nod* box locus 4 in *R. meliloti* are involved in nodulation signal production: *nodM* codes D-glucosamine synthetase. *Molecular and General Genetics*. 228, 113-124.
- Banfalvi, Z., Niewkoop, A., Schell, M., Best, L. & Stacey, G. 1988. Regulation of *nod* gene expression in *B. japonicum*. *Molecular and General Genetics*. 214, 420-424.
- Batut, J., Daveran-Mignot, M.L., David, M., Jacobs, J., Gamerone, A.M., & Kahn, D. 1989. *fixK* a gene homologous with *fnr* and *crp* from *E. coli*, regulates nitrogen fixation genes both positively and negatively in *R. meliloti*. *EMBO Journal* 8, 1279-1286.
- Batut, J., Santero, E. & Kustu, S. 1991. In vitro activity of the nitrogen fixation regulatory protein FixJ from *R. meliloti*. *Journal of Bacteriology* 173, 5914-5917.
- Beringer, J.E. 1974 R-factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen Microbiol.* 120, 421-429
- Better, M., Lewis, B., Corbin, D., Ditta, G. & Helinski, D.R. 1985. Structural relationships among *R. meliloti* symbiotic promoters. *Cell* 35, 479-485.
- Birkenhead, K., Nooman, B., Reville, W.J., Boesten, B., Manian, S.S., & O'Gara, F.1990. Carbon utilization and regulation of nitrogen fixation genes in *R. meliloti*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 3, 167-173.

- Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.B.J. & Spaink, H.P. 1992. In vitro transacetylating activity of the NodL protein of *R. leguminosarum* bv. *viciae* In 6th International Symposium on the Molecular Genetics of plant-Microbe Interactions, Seattle, Washington, USA. 11-16 July, 1992.
- Boyer, H.S., & Roulland-Dussoix D. 1969 A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *E. coli*. *J. Mol. Biol.* 41, 459-472
- Buck, M. & Cannon, W. 1987. Frameshifts close to the *Klebsiella pneumoniae* promoter prevent multicopy inhibition by hybrid *nifH* plasmids. *Molecular and General Genetics* 207, 492-498.
- Colonna-Romano, S., Arnold, S., Schluter, A., Boistard, P., & Puhler, A. 1990. An *fnr*-like protein encoded in *R. leguminosarum* bv. *viciae* shows structural and functional homology to *R. meliloti* *fixK*. *Molecular and General Genetics*. 223, 138-147.
- David, M., Daveran, M.L., Batut, J., Dedieu, A., Domergue, O., Ghai, J., Hertig, C., Boistard, P., & Kahn, D. 1988. Cascade regulation of *nif* gene expression in *R. meliloti*. *Cell* 54, 671-683.
- Davis, E.O., & Johnston, A. W. B. 1990. Regulatory functions of three *nodD* genes of *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. *Molecular Microbiology* 3, 1567-1577.
- De Bruijn, F., Hilgert, U., Stigter, J., Schneider, M., Meyer, H., Klosse, U. & Pawlowski, K. 1990. Regulation of nitrogen fixation and assimilation genes in free living versus symbiotic state. In: Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives. eds. Gresshof, P.M., Roth, L.E., Stacey, G., & Newton, W. E. pp. 34-44. New York. Chapman & Hall.
- deJong, A.J., Heidstra, R., Spaink, H.P., Hartog, M.V., Meijer, E. A., Hendriks, T., Lo Schiavo, F., Terzi, M., Bisseling, T., van Kamen, A., and de Vries, S.C. 1993. *Plant Cell* 5, 615-620.
- De Philip, P., Batut, J. & Boistard, P. 1990. *R. meliloti* *fixL* gene is an oxygen sensor and regulates *R. meliloti* *nifA* and *fixK* genes differently in *E. coli*. *Journal of Bacteriology* 172, 4255-4262.

- Delwiche C.C., 1970 The nitrogen cycle. *Scientific American* 223 (3) 136-146.
- Delwiche C.C., 1981. The cycle of Nitrogen and Nitrous Oxide. John Wiley y SONS, Inc. 1-15.
- Dénarié, J., Debelle, F. & Rosenberg, C. 1992. *Annual Review of Microbiology* 46, 497-531
- Ditta, G.S., Schmidhauser, T., Yacobson, E., Lu, P., Liang, X.W., Finlay, D.R., Guiney, D. & Helinski, D.R. 1985. Plasmid related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and monitoring gene expression. *Plasmid* 13: 149-153
- Ditta, G.S., Stanfield, S., Corbin, D. & Helinski, D.R. 1980. Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *R. meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 7347-7351
- Ditta, G., Virts, E., Palomares, A.J. & Kim, C.H. 1987. The *nifA* gene of *R. meliloti* is oxygen regulated. *Journal of Bacteriology* 169, 3217-3223.
- Ditta, G., Virts, E. & Helinski, D. 1988. Oxygen regulation of *nif* genes in *R. meliloti*. In: *Molecular Plant-Microbe Interactions*. eds. Verma, D.P.S., & Palacios, R. pp 109-110. St. Paul MN. APS Press.
- Djordjevic, M.A., Redmond, J.W., Batley, M. & Rolfe, B.G. 1987. Clovers secrete specific phenolic compounds which either stimulate or repress *nod* gene expression in *R. trifolii*. *EMBO Journal* 6, 1173-1179.
- Donachie, W.D. & Robinson, A.C. 1987. En: Neidhardt F.C. (ed) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology, vol 2 pp 1578-1593. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Downie, J.A., Knight, C.D., Johnston, A.W.B., y Rossen, L. 1985. Identification of genes and gene products involved in the nodulation of peas by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Gen. Genet.* 198, 255-262.

- Downie, J.A., Sutton, J.M. & Lea, E.J.A. 1992. *nodO*: a nodulation protein that forms pores in membranes. In 6th International Symposium on the Molecular Genetics of Plant Microbe Interactions. Seattle Washington, USA. 11-16 July, 1992.
- Drummond, M., Whitty, P. & Wooton, J. 1986. Sequence and domain relationship of *ntrC* and *nifA* from *Klebsiella pneumoniae*: homologies to other regulatory proteins. *EMBO Journal* 5, 441-447.
- Dusha, I., Bakos, A., Kondorosi, A., De Bruijn, F. & Schell, J. 1989. The *R. meliloti* early nodulation genes (*nodABC*) are nitrogen regulated: isolation of a mutant strain with efficient nodulation capacity on alfalfa in the presence of ammonium. *Molecular and General Genetics* 219, 89-96.
- Earl, C.D., Ronson, C.W. & Ausbel, F.M. 1987. Genetic and structural analysis of the *R. meliloti* *fixA*, *fixB*, *fixC* and *fixX* genes. *Journal of Bacteriology* 169, 1127-1136.
- Economou, A. & Downie, J.A. 1992. The nodulation of legumes by Rhizobia. In: Nitrogen Fixation and its Research in China, ed Hong Kong, G.F. pp315-339. Berlin and Heidelberg: Springer Verlag.
- Ehrhardt, D.W., Atkinson, E.M., and Long, S.R. 1992. Depolarization of Alfalfa root hair membrane potential by *R. meliloti* Nod factors. *Science* 256, 998-1000.
- Elkan H.G., 1984. Taxonomy and Metabolism of *Rhizobium* and its Genetic Relationship. En : Biological Nitrogen Fixation (Ecology, Technology and Physiology) Martin Alexander (ed.) Plenum Publication Corporation pp. 1-38
- Evans, I.J. & Downie, J.A. 1986. The *nodI* gene product of *R. leguminosarum* is closely related to ATP-binding bacterial transport proteins; nucleotide sequence analysis of the *nodI* and *nodJ* genes. *Gene* 43, 95-101.
- Fisher, R.F., Swanson, J.A., Mulligan, J.T. & Long, S.R. 1987. Extended region of nodulation genes in *Rhizobium meliloti* 1021. II. Nucleotide sequence, transcription start sites and protein products. *Genetics* 117: 191-201

- Fisher, R.F. & Long, S.R. 1992. *Rhizobium*-plant signal exchange. *Nature* 357,655-660.
- Geelen D., Goormachtig, G., Van den Eede, M., Van Monyagu, M. & Holsters, M. 1993. Functional analysis of the *nodS* gene product from *Azorhizobium caulinodans* strain ORS571. E.W. Nester and D.P.S. Verma (eds.), "Advances in Molecular Genetics of Plant- Microbe Interactions", 151-162 Kluwer Academic Publishers.
- Gilles-Gonzalez, M.A., Ditta, G.S. & Helinski, D.R. 1991. A haemoprotein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of *R. meliloti*. *Nature* 350, 170-172.
- Göttfret, M., Grobe, P. & Hennecke, H. 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
- Gussin, G.N., Ronson, C.W., & Ausbel, F.M. 1986. Regulation of nitrogen fixation genes. *Annual Review of Genetics* 20, 567-591.
- Györgypal, Z., Iyer, N. & Kondorosi, A. 1988. Three regulatory *nodD* alleles of diverged flavonoid specificity are involved in host-dependent nodulation by *R. meliloti*. *Molecular and General Genetics* 212, 85-92.
- Hennecke, H., Alvarez-Morales, A., Betancourt-Alvarez, M., Ebeling, E., Filser, M., Fischer, H.M., Gubler, M., Hahn, M., Kalusa, K., Lamb, J.W., Meyer, L., Regensburger, B., Studer, D. & Weber, J. 1985. Organization and regulation of symbiotic nitrogen fixation genes from *B. japonicum*. In: Nitrogen Fixation Research Progress, eds, Evans, H.J., Bottomley, P.J., & Newton, W.E. pp 157-163. The Hague: Nijhoff/Junk.
- Hirsch, P.R. & Beringer, J.E. 1984. A physical map of pPH1JI and pJB5JI. *Plasmid* 12: 139-141
- Hontelez, J.G.J., Mol, P., Van Dun, C., Schetgens, R., van Kammen, A. & van den Bos. 1984. Expression of sym-plasmid genes in bacteroids of *R. leguminosarum*. In Advances in Nitrogen Fixation Research, eds Veeger, C. & Newton, W.E. p 686. The Hague: Nijhoff/Junk.

- Horvath, B., Bachem, C.W.B., Schell, J. & Kondorosi, A. 1987. Host specific regulation of nodulation genes in *Rhizobium* is mediated by a plant signal interacting with the *nodD* gene product. *EMBO Journal* 6, 841-848.
- Horvath, B., Heidstra, R., Lados, M., Moerman, M., Spaink, H.P., Promé, J.C., van Kammen, A., & Bisseling, T. 1993. *Plant Journal* 4, 727-733.
- Huala, E. & Ausbel, F.M. 1989. The central domain of *R. meliloti NifA* is sufficient to activate transcription from the *R. meliloti nifH* promoter. *Journal of Bacteriology* 171, 3354-3365.
- Johnston, A.W.B., Benynon, J.L., Buchanan-Wollaston, A.V., Setchell, S.M., Hirsch, P.R. & Beringer, J.E. 1978. High frequency transfer of nodulating ability between strains and species of *Rhizobium*. *Nature* 276, 634-636.
- Kahn, D., David, M., Domergue, O., Daveran, M.L., Ghai, J., Hirsch, P.R. & Batut, J. 1989. *Rhizobium meliloti fixGHI* sequence predicts involvement of a specific cation pump in symbiotic nitrogen fixation. *Journal of Bacteriology* 171, 929-939.
- Kaminski, P.A. & Elmerich, C. 1991. Involvement of *fixL* in the regulation of nitrogen fixation in *Azorhizobium caulinodans*. *Molecular Microbiology* 5, 665-673.
- Kijne, JW. The Infection process. In: Biological Nitrogen Fixation. G. Stacey, RH Burris and HJ Evans (eds.) Chapman and Hall. New York/London, 1991.
- Knauf, V.C., & Nester, E.W. 1982. Wide host range cloning vectors: a cosmid clone bank of an *Agrobacterium* Ti plasmid. *Plasmid* 8, 45-54
- Kondorosi, E., Banfalvi, Z. & Kondorosi, A. 1984. Physical and genetical analysis of symbiotic region of *R. meliloti*: identification of nodulation genes. *Molecular and General Genetics* 193, 445-452.
- Kondorosi, E., Gyuris, J., Schmidt, J., John, M., Duda, E., Hoffman, B., Schell, J. & Kondorosi, A. 1989. Positive and negative control of *nod* gene expression in *R. meliloti* is required for optimal nodulation. *EMBO Journal* 8, 1331-1340.

- Kondorosi, E., Pierre, M., Cren, M., Haumann, U., Buiré, M., Hoffmann, B., Schell, J. & Kondorosi, A. 1991. Identification of *NolR*, a negative transacting factor controlling the *nod* regulon in *Rhizobium meliloti*. *J. Mol. Biol.* 222: 885-896
- Kustu, S., Weiss, D.S., Klose, K., Porter, S., North, A. & Wedel, A. 1992. Procariotic enhancers and enhancer proteins. In 6th International Symposium on the Molecular Genetics of Plant Microbe Interactions. Seattle Washington, USA. 11-16 July, 1992.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J.C. & Denarié, J. 1990. Symbiotic host specificity of *R. meliloti* is determined by sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 344, 781-784.
- Long, S.R. 1989. *Rhizobium*-legume nodulation: life together in the underground. *Cell* 56, 203-214.
- Long, S.R. 1992. Expression and action of *Rhizobium nod* genes : recent results. In 6th International Symposium on the Molecular Genetics of Plant Microbe Interactions. Seattle Washington, USA. 11-16 July, 1992.
- Maillet, F., Debelle, F. & Dénarié J. 1990. Role of the *nodD* and *syrM* genes in the activation of the regulatory *nodD3* and of the common and host specific *nod* genes of *R. meliloti*. *Molecular Microbiology* 4, 1975-1984.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., & Sambrook, J. 1982. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Martinez, E., Pardo, M.A., Palacios, R. & Ceballos, M.A. 1985. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *Journal of General Microbiology* 131, 1779-1786.
- Martinez E., Romero D., and Palacios R. 1990 The *Rhizobium* Genome. *Plants Science* 9: 59-93

- Martinez, E., Segovia, L., Martins-Mercante, F., Franco, A. A., Graham, P. & Pardo, M.A. 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41(3), 417-426.
- Mergaet, P., van Montagu, M., Promé, J.C. & Holsters M. 1993. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90, 1551-1555.
- Miller, J.H. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Nap, J.P. & Bisseling, T. 1990. Developmental biology of a plant-procaryote symbiosis: the legume root nodule. *Science* 250, 948-954.
- Nicolau, K.C., Bockovich, N.J., Carcanague, D. R., Hummel, C.W. & Even, L.F. 1992. *Journal of the American Chemistry Society* 114, 8701-8702.
- Norel, F., Kush, A., Deneffe, P., Chapin, N. & Elmerich, C. 1984. Nitrogen fixation in a tropical *Rhizobium* associated with *Sesbania rostrata*. In *Advances in Nitrogen Fixation Research*, eds Veeger, C. & Newton, W.E. p 686. The Hague: Nijhoff/Junk.
- Nuti, M.P., Lepidi, A.A., Prakash, P.K., Schilperoot, R.A. & Cannon, F.C. 1979. Evidence for nitrogen fixation genes on indigenous *Rhizobium* plasmids. *Nature* 282, 533-535.
- Palacios, R., Mora J. & Newton E.W. 1993. *New Horizons in Nitrogen Fixation*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Poupot, R., Martinez, E. & Promé J.C. 1993. Nodulation factors from *R. tropici* are sulfated or nonsulfated chitopentasaccharides containing a N-methyl-N-acylglucosaminyl Terminus. *Biochemistry* 32, 10430-10435.
- Price, N.P.J., Relic, B., Talmont, F., Lewin, A., Promé, D., Pueppke, S.G., Maillet, F., Denarié, J., Promé, J.C. & Broughton, W.J. 1992. *Molecular Microbiology* 6, 3575-3584.

- Putnoky, P. & Kondorosi, A. 1986. Two gene clusters of *Rhizobium meliloti* code for early essential nodulation functions and a third influences nodulation efficiency. *J. Bacteriol.* 169: 102-106.
- Recourt, K. 1991. Flavonoids in the early *Rhizobium*-legume interaction. Tesis Doctoral. Universidad de Leiden. The Netherlands.
- Roche, P., Debellé, F., Maillet, F., Lerouge, P., Faucher, C., Truchet, G., Denarié, J. & Promé, J. 1991. Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti nodH* and *nodPQ* genes encode the sulfation of lipo-oligosaccharide signals. *Cell* 67, 1131-1143.
- Rodriguez Quiñones, F., Banfalvi, Z., Murphy, P. & Kondorosi, A. 1987. Interspecies homology of nodulation genes in *Rhizobium*. *Plant Molecular Biology* 8, 61-67.
- Ronson, C.W., Nixon, B.T. & Ausbel, F.M. 1987. Conserved domains in bacterial regulatory proteins that respond to the environment stimuli. *Cell* 49, 579-581.
- Rossen, L., Shearman, C.A., Johnston, A.W.B. & Downie, J.A. 1985. The *nodD* gene of *R. leguminosarum* is autoregulatory and in the presence of plant exudates induces the *nodABC* genes. *EMBO Journal* 4, 3369-3373.
- Ruvkun, G.B & Ausbel, F.M. 1980. Interspecies homology of nitrogenase genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 77, 191-195.
- Sadowsky, M.J., Foster, E.R., Olson, V.E, & Verma, DPS. 1991 Two host-inducible genes of *Rhizobium fredii* and characterization of the inducing compound. *J. Bacteriol.* 170: 171-178
- Sanchez, F., M. Lara, H. Porta, J. Padilla, y J. Folch. 1984. Heterogeneity of Glutamine Synthetase Polypeptides in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiology* 76, 1019-1023

- Sanjuan, J., Carlson, R.W., Spaink, H.P., Bhat, U.R., Barbour, W.M., Glushka, J. & Stacey, G. 1992. A 2-O-methylfucose moiety is present in the lipo-oligosaccharide nodulation signal of *Bradyrhizobium japonicum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89, 8789-8793.
- Schlaman, H.R.M., Okker, R.J.H. & Lugtenberg, B.J.J. 1992. Regulation of nodulation gene expression by NodD in Rhizobia. *Journal of Bacteriology* 74, 5177-5182.
- Schultze, M., Quiclet-Sire, B., Kondorosi, E., Virilizier, H., Glushka, J.N., Gero, S.D. & Kondorosi, A. 1992. *Rhizobium meliloti* produces a family of sulphated lipo-oligosaccharides exhibiting different degrees of plant host specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89, 192-196.
- Shearman, C.A., Rossen, L., Johnston, A.W.B. & Downie, J.A. 1986. The *Rhizobium leguminosarum* nodulation gene *nodF* encodes a polypeptide similar to acyl-carrier protein and is regulated by *nodD* plus a factor of pea root exudates. *EMBO Journal* 5, 647-652.
- Sheldon, P.S., Kelwick, R.G.O., Sidebottom, C., Smith, C.G. & Slabas, A.R. 1990. 3-oxo-(acyl-carrier protein) reductase from avocado (*Persea americana*) fruit mesocarp. *Biochemistry* 27, 713-720.
- Smit, G. Kinje, J.W. & Lugtenberg, B.J.J. 1987. Involvement of both cellulose fibrils and Ca²⁺-dependent adhesin in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. *Journal of Bacteriology* 169, 4294-4301.
- Sousa, C., Folch, J.L., Boloix, P., Megias, M., Nava, N. & Quinto, C. 1993. A *Rhizobium tropici* DNA region carrying the amino terminal-half of a *nodD* gene and a *nod*-box like sequence confers host range extension. *Molecular Microbiology* 9 (6) 1157-1168.
- Spaink, H.P., Okker, R.J.H., Wijffelman, C.A., Tak, T., Goosen de Roo, L., Pees, E., van Brussel, A.A.N. & Lugtenberg, B.J.J. 1989. Symbiotic properties of Rhizobia containing a flavonoid independent hybrid *nodD* product. *Journal of Bacteriology* 171, 4045-4053.

- Spaink, H.P., Sheely, D.M., van Brussel, A.A.N., Glushka, J., York, W.S., Tak, T., Geiger, O., Kennedy, E.P., Reinhold, V.N. & Lugtenberg, B.J.J. 1991. A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature* 354, 125-130.
- Spaink, H.P., Aarts, A., Stacey, G., Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.J.J. & Kennedy, E.P. 1992. Detection and separation of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* Nod metabolites using Thin-Layer Chromatography. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 5, 72-80
- Spaink, H.P. A. Aarts, G.V. Bloemberg, J. Folch, O. Geiger, H.R.M. Schlaman, J.E. Thomas-Oates, A.A.N. Van Brussel, K. Van de Sande, P. Van Spronsen, A.H.M. Wijfjes and B.J.J. Lugtenberg. 1993. "Rhizobial Lipo-oligosaccharide Signals: Their Biosynthesis and Their Role in the Plant." E.W. Nester and D.P.S. Verma (eds.), "Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions", 151-162 Kluwer Academic Publishers.
- Stock, J.B., Ninfa, A.J. & Stock, A.M. 1989. Protein phosphorylation and regulation of adaptative responses in bacteria. *Microbiological Reviews* 53, 450-490.
- Szeto, W.W., Zimmerman, J.L., Sundaresan, V. & Ausbel, F.M. 1984. A *Rhizobium meliloti* symbiotic regulatory gene. *Cell* 36, 1035-1043.
- Szeto, W.W., Nixon, B.T., Ronson, C.W. & Ausbel, F.M. 1987. Identification and characterization of *Rhizobium meliloti ntr* gene: *R. meliloti* has separate regulatory pathways for activation of nitrogen fixation genes in free living and symbiotic cells. *Journal of Bacteriology* 169, 1423-1432.
- Toro, N. & Olivares, J. 1986. Analysis of *R. meliloti* sym mutants obtained by heat treatment. *Applied and Environmental Microbiology* 51, 1148-1150.
- Truchet, G., Roche, P., Lerouge, P., Vasse, J., Camut, S., De Billy, F., Promé, J.C. & Dénarié, J. 1991. Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. *Nature* 351: 670-673

Van Brussel, A.A.N., Bakhuizen, R., van Spronsen, P.C., Spaink, H.P., Tak, T., Lugtenberg, B.J.J. & Kijne, J.W. 1992. Induction of pre-infection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipo-oligosaccharides by *Rhizobium*. *Science* 257, 70-72.

Van Den Eede, G., Dreyfus, B., Goethals, K., Montagu, V.M. & Holsyders M. 1987. Identification and cloning of nodulation genes from stem nodulating bacterium ORS571. *Molecular and General Genetics* 206, 291-299.

Vargas, C., Martinez, L.J., Megias, M. & Quinto, C. 1990. Identification and cloning of nodulation genes and host specificity determinants of the broad host range *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* strain CIAT899. *Molecular Microbiology* 4, 1899-1910.

Vazquez, M., Santana, O., Villalobos, M.A. & Quinto, C. 1992. Similarity of the *nodI* and *nodJ* products with proteins from gram-negative bacteria. Organization and function of nodulation genes related sequences in *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* strain CE3. In 6th International Symposium on the Molecular Genetics of Plant Microbe Interactions. Seattle Washington, USA. 11-16 July, 1992.

Virts, E.L., Stanfield, S.W., Helinski, D.R. & Ditta, G.S. 1988. Common regulatory elements control symbiotic and microaerobic induction of *nifA* in *Rhizobium meliloti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 85, 3062-3065.

Yanisch-Perron C., Vieira, J., & Messing, J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119

Young, J.P.W. & Johnston, A.W.B. 1989. The evolution of specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Tree* 4, 341-349.

Zaat, S.A., Wiffjelman, C.A., Spaink, H.P., van Brussel, A.A.N., Okker, R.J.H., & Lugtenberg, B.J.J. 1987. Induction of the *nodA* promoter of *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1JI by plant flavanones and flavones. *J. Bacteriology* 169, 198-204.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D. Jorge Luis FALCH MALLOR titulada Estudio de los genes de modulación y la síntesis de lipopolisacáridos en *Plutobium tropici* CIAT 899 acordó otorgarle la calificación de Apto "cum laude"

Sevilla, 29 de Junio 1974

El Vocal,

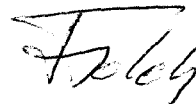
El Vocal,

El Vocal,

El Presidente

El Secretario,

El Doctorado,



x