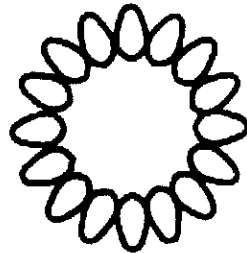


3
03088²ej.



Universidad Nacional Autónoma de México
Unidad Académica de los ciclos Profesionales y de posgrado /CCH
Instituto de Biotecnología



“ Respuesta del citoesqueleto y niveles de calcio en pelos radicales de frijol a factores Nod de Rhizobium etli ”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA

Biol. Luis Cárdenas Torres

Cuernavaca, Mor., 1998

263790

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología/UNAM, bajo la asesoría de la Dra. Carmen Quinto Hernández. Para el desarrollo de este trabajo se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y del Programa de Apoyo de la División de Estudios de Posgrado (PADEP-Tesis Doctoral)

Agradezco el gran apoyo y confianza de la Dra. Carmen Quinto por hacer posible la realización de este trabajo y darme la oportunidad de emprenderlo. Al Dr. Federico Sánchez por compartir grandes ideas y sabios consejos. Al Dr. Héctor Pérez por dejarnos grandes inquietudes en el estudio del citoesqueleto vegetal. Al Dr. Peter K. Hepler y Luis Vidali por su gran apoyo.

A la dulce y bendita memoria de mi Padre

A mi madre y mis hermanos

A mis amigos

y a mi esposa.

INDICE

RESUMEN (Español).....	III
RESUMEN (Inglés).....	IV
Capítulo 1:	
1.0 INTRODUCCION.....	1
1.1 El fenómeno de infección.....	1
1.2 Genes de nodulación.....	1
1.3 Síntesis de los factores Nod (FNs), la molécula señal.....	4
1.4 Transporte de los FNs.....	8
1.5 NodD y la especificidad de huésped.....	10
1.6 Reconocimiento de los FNs.....	11
1.7 Respuesta de la planta a los FNs.....	12
1.8 Pelos radiculares.....	13
1.8.1 Biología de los pelos radiculares.....	13
1.8.2 Distribución de los pelos radiculares.....	14
1.8.3 Estadios de desarrollo de los pelos radiculares.....	15
1.8.4 Flujo citoplasmático.....	17
Capítulo 2:	
2.0 ANTECEDENTES.....	18
Capítulo 3:	
3.0 METODOLOGIA.....	23
3.1 Material biológico.....	23
3.2 Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento.....	23
3.3 Detección de los FNs por cromatografía en capa fina (TLC).....	23
3.4 Purificación de los FNs por cromatografía líquida de alta resolución.....	24
3.5 Análisis de los FNs por espectrometría de masas.....	25
3.6 Actividad biológica.....	25
3.7 Tinción y observación de meristemas.....	26
3.8 Preparación del material biológico para microinyección.....	26
3.9 Medición de la velocidad de flujo citoplasmático y crecimiento.....	27
3.10 Incubación de los pelos radiculares con FNs.....	28
3.11 Microinyección de indicadores fluorescentes.....	28
3.12 Cuantificación de Ca ²⁺ intracelular.....	29
3.13 cuantificación de Ca ²⁺ extracelular.....	30
3.14 Fabricación de electrodos.....	30
3.15 Adquisición y procesamiento de resultados.....	31

3.16 Determinación del tamaño del área de influjo.....	32
3.17 Estimación del flujo iónico.....	33
Capítulo 4:	
4.0 RESULTADOS I	34
4.1 Identificación, sobreproducción y purificación de los FNs.....	34
4.2 Determinación estructural de los FNs.....	35
4.3 Experimentos de nodulación en plantas de <i>Lotus</i>	37
4.4 Actividad biológica: Inducción de primordios.....	38
4.5 Trabajo publicado (Plant Mol. Biol.)	
5.0 RESULTADOS II	40
5.1 Actividad biológica sobre los pelos radiculares.....	40
5.2 Determinación de la velocidad de crecimiento y flujo citoplasmático.....	40
5.3 Citoesqueleto de actina en pelos radiculares de frijol.....	41
5.4 Trabajo publicado (Plant Physiol.)	
6.0 RESULTADOS III	48
6.1 Cuantificación de Ca ²⁺ citosólico en pelos radiculares de <i>Phaseolus vulgaris</i>	48
6.2 Cambios en el Ca ²⁺ citosólico en respuesta a los FNs.....	49
6.3 Cuantificación de Ca ²⁺ extracelular en pelos radiculares de frijol.....	51
6.4 Cuantificación de los influjos de Ca ²⁺ en pelos radiculares que responden a los FNs.....	52
6.6 Trabajo sometido a publicación (The plant Cell)	
Capítulo 5:	
7.0 DISCUSION.....	55
8.0 BIBLIOGRAFIA.....	65
ANEXO 1.....	77
ANEXO 2.....	79

RESUMEN

Las bacterias del género *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* y *Sinorhizobium*, son bacterias del suelo que infectan las plantas leguminosas para establecer una simbiosis en la que se hace posible la fijación biológica del nitrógeno. La planta secreta una serie de compuestos fenólicos que actúan como señales, estas señales inducen la expresión de los genes *nod* presentes en la bacteria. Los productos de los genes *nod* están involucrados en la síntesis y secreción de los factores Nod (FNs) los cuales en la planta, son capaces de inducir la deformación de los pelos radiculares y la división de las células de la corteza de manera similar a los inducidos por la bacteria.

En este trabajo, mediante el uso de activadores transcripcionales constitutivos hemos sobreproducido, aislado y caracterizado los FNs producidos por *R. etli*. Los resultados de espectrometría de masas nos indican que estas moléculas están formadas por pentámeros de *N*-acetil glucosamina con un ácido graso identificado como *cis*-vacénico. En su extremo no reductor, estos FNs se encuentran decorados con un grupo carbamilo y metilo en tanto que en su extremo reductor presenta una acetil fucosa.

La respuesta del citoesqueleto de actina lo hemos abordado microinyectando pelos radiculares vivos con faloidina fluoresceïnada y observando al microscopio confocal. En las células no tratadas o aquellas que se expusieron a los oligómeros de quitina como control negativo se observa el citoesqueleto como cables de actina que recorren lo largo de la célula, además cables más delgados que dan la arquitectura de una red intrincada de filamentos. En respuesta a los FNs, esta organización del citoesqueleto desaparece 5-10 min después de tratarlos. Los cables se rompen y acumulan en la región apical. Interesantemente, la organización se recupera después de 30-60 min, al menos la formación de los filamentos que forman los cables de actina, ya que los extremos apicales continúan con actina fragmentada. En este momento, el núcleo resulta muy interesante por su alta fluorescencia indicando la presencia de actina, tal vez fragmentada ya que no se definen como cables o filamentos.

También hemos determinado la respuesta del Ca^{2+} en presencia y ausencia de los FNs, para esto hemos microinyectado el fura-2 ligado a un dextran de 70 kD que asegura su permanencia en el citoplasma. Los pelos controles muestran un gradiente de Ca^{2+} muy claro y localizado únicamente en la región apical y los valores máximos para este gradiente son de alrededor de 400 nM. En respuesta a los FNs, los valores máximos para este gradiente incrementaron hasta 1,500 nM en la región apical. Es de especial interés que después de 5-10 min las regiones con alta concentración de Ca^{2+} cambian de posición, también se encontraron fluctuaciones de calcio en el área perinuclear lo cual abre la posibilidad de liberación de Ca^{2+} de reservorios internos. El uso de microelectrodos específicos para Ca^{2+} nos permitió determinar los flujos de Ca^{2+} en pelos radiculares no tratados y expuestos a los FNs. Los pelos controles presentan flujos de Ca^{2+} del orden de 13 pmoles/cm²/seg y en respuesta a los FNs estos flujos incrementan a 33 pmoles/cm²/seg en promedio. Los tiempos de respuesta del Ca^{2+} intracelular y los flujos de Ca^{2+} extracelular son muy similares lo que nos hace suponer que estos cambios son los posibles responsables de modular el citoesqueleto de actina así como los procesos de secreción de componentes de pared celular. Todos estos eventos podrían ocurrir como una anticipación de la deformación y enroscamiento de los pelos radiculares.

ABSTRACT

Rhizobium etli induces the formation of root nodules on *Phaseolus vulgaris*. After induction of the bacterial *nod* genes by the plant host, the bacteria produces a family of structurally related lipo-chitoooligosaccharides, the “Nod factors” (NFs). These signal molecules trigger cell division of the cortical cells leading to the formation of a nodule primordium in absence of the bacteria.

In this work, we have overproduced, isolated and characterized the NFs from *R. etli*. Our results indicate that these molecules are pentamers of *N*-acetyl glucosamine carrying a fatty acid, which is *cis*-vacenic. These NFs are decorated with a methyl and carbamyl group on the nonreducing end. On the reducing end, this is decorated with an acetyl fucose. We have analyzed the biological activity of these NFs on beans and found them highly active in inducing root hair deformation and nodule primordia.

The response of the actin cytoskeleton to NFs secreted by *Rhizobium* has been studied in living root hairs of *P. vulgaris*, which have been microinjected with FITC phalloidin and examined by confocal microscopy. In untreated control cells, or those treated with the inactive chitin oligomer, the actin cytoskeleton was organized into long bundles, oriented parallel to the long axis of the root hair and extending into the apical zone. Upon exposure to *R. etli* NFs the filamentous actin became fragmented, as indicated the appearance of prominent masses of diffuse fluorescence in the apical region of the root hair. These changes are rapid, being observed as soon as 5-10 min after Nod factor treatment. Interestingly, the filamentous actin partially recovered in the continued presence of the NFs; by one hour long bundles had reformed. However, these cells contained a significant amount of diffuse fluorescence in the apical zone and in the nuclear area, presumably indicating the presence of short actin filaments.

We have also determined the dynamics of Ca^{2+} ions in root hairs in the presence and absence of NFs by using ratiometric ion imaging. Analysis of *P. vulgaris* root hairs microinjected with dextran conjugated Fura-2 revealed that there is a Ca^{2+} gradient that is restricted to a small area at the extreme apex of the tube dome (highest values for this gradient is around 400 nM). Application of NFs to growing, responsive root hairs of beans induce marked changes in the intracellular cytosolic free Ca^{2+} within 5 min after exposure. It was observed as increases from ~ 400 nM to ~ 1,500 nM at the root hair apex. Of particular note is the observation that some elevated regions of Ca^{2+} appear to shift position during short time intervals. Increases and fluctuations of the intracellular Ca^{2+} are also observed in the perinuclear region after 10-15 min treatment with NFs. The extracellular Ca^{2+} flux detected with the non-invasive ion specific vibrating electrode is inwardly directed and increases quickly in response to NFs from 13 pmoles/cm²/sec to 33 pmoles/cm²/sec. The Chitin oligomers, which are structurally similar but biologically inactive when compared to the active NFs, fail to elicit changes in both intracellular and extracellular Ca^{2+} . The similar timing and location of the intracellular elevations and the increased extracellular influx provide support for the idea that Ca^{2+} participates probably in modulating the actin cytoskeleton as well as secretion and cell wall remodeling, which occur in anticipation of root hair deformation and curling.

1.0 INTRODUCCION

1.1 El fenómeno de infección

Las especies de bacteria del género *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium* y *Sinorhizobium* son bacterias del suelo Gram-negativas que infectan a las plantas leguminosas para establecer una simbiosis en la que se hace posible la fijación biológica de nitrógeno (Brewin, 1991; Hirsch, 1992; Mylona et al., 1995). La interacción entre el *Rhizobium* y la leguminosa se inicia con el reconocimiento de moléculas señales liberadas tanto por la planta como la bacteria (Fisher y Long, 1992). La planta libera compuestos fenólicos, generalmente flavonoides que inducen la expresión de genes presentes en la bacteria y responsables de la nodulación (genes *nod*). La inducción de estos genes en la bacteria da como resultado la síntesis de los metabolitos de nodulación, también denominados factores Nod (FNs). Los FNs son lipo-oligosacáridos que constan de una estructura central formado por oligómeros de *N*-acetil glucosamina, siendo generalmente tetrámeros o pentámeros y que se encuentran decorados con diversos sustituyentes químicos como: sulfato, metilo, acetilo, ácido graso con diversos grados de insaturación o azúcares modificados. Durante el proceso normal de infección y formación del nódulo, la bacteria se une a los pelos radiculares de la planta dando como resultado el enroscamiento y la deformación de éstos. La bacteria penetra los pelos radiculares induciendo la formación de los hilos de infección. Simultáneamente, las células de la corteza se activan mitóticamente dando lugar a la formación del primordium. El hilo de infección crece en dirección al primordium donde las bacterias son exocitadas y a la vez endocitadas por las células huéspedes, finalmente las bacterias se rodean por una membrana de origen vegetal a la cual se le denomina membrana peribacteroidal. El primordium eventualmente se desarrolla hasta constituir un nódulo maduro, mientras que las bacterias se diferencian al estado de bacteroide capaz de fijar el nitrógeno atmosférico, todo este proceso se describe en la Figura 1 (Revisado en Mylona et al., 1995).

1.2 Genes de nodulación

Los genes *nod* son esenciales para la infección, nodulación y especificidad de huésped y su ausencia o mutación en cualquiera de ellos resulta en la incapacidad de infectar sus plantas huéspedes. El producto del gene *nodD* controla la expresión de los genes *nod* presentes en la bacteria. Este se ha caracterizado como el activador transcripcional de los genes *nod* que reconoce a los flavonoides liberados por la

planta (Revisado en Schlaman et al., 1992). El complejo NodD-flavonoide se une a secuencias conservadas dentro de la región promotora de los genes *nod* que se les

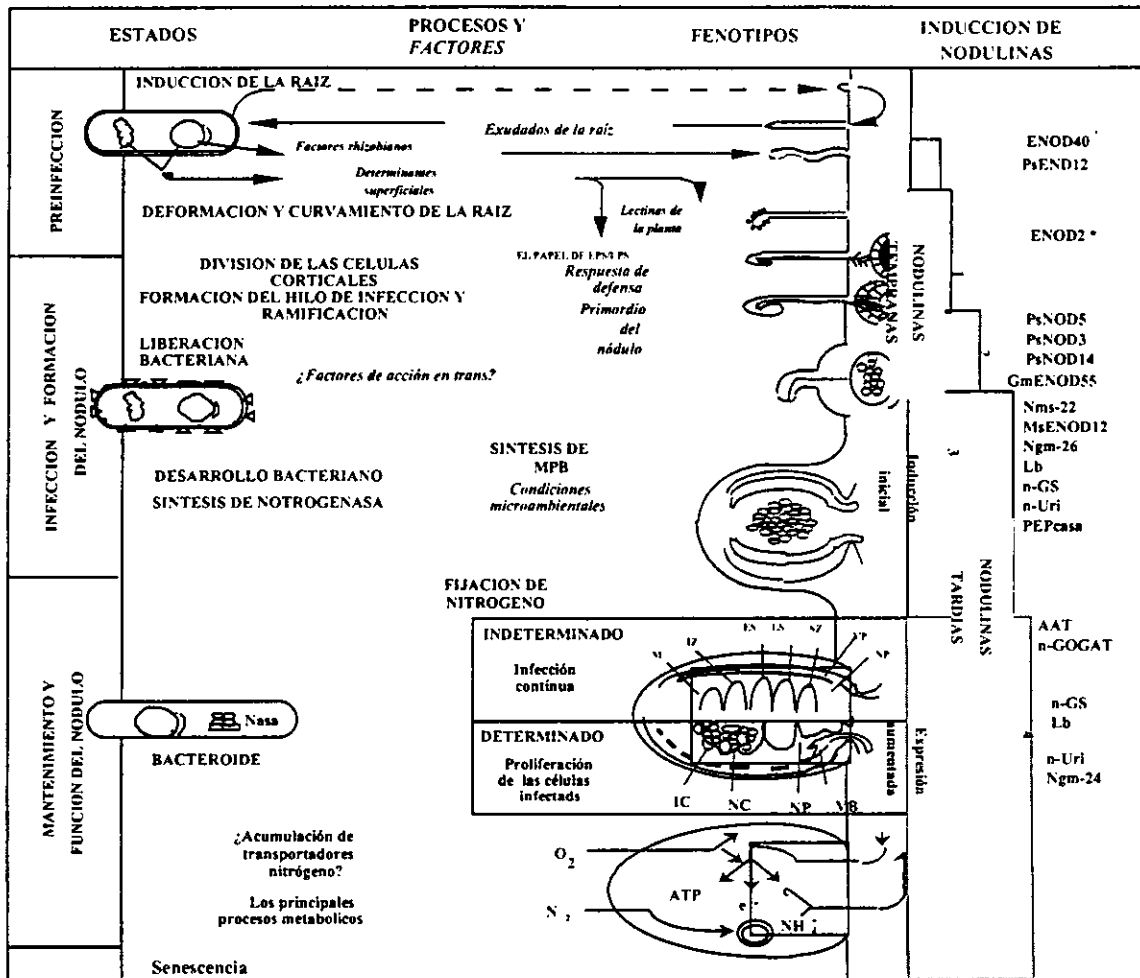


Figura 1. El proceso simbiótico en: Nódulo indeterminado: EPS= exopolisacárido, MPB= membrana peribacteroidal, M= meristemo, ES= primeras células infectadas, LS= células posteriormente infectadas, ZS= zona de senescencia, VP= tejido vascular, NP= parénquima del nódulo. Nódulo determinado: IC= células infectadas, NC= células no infectadas, NP= parénquima del nódulo/cortex interno, VB= tejido vascular (Sánchez et al., 1991).

denominan “cajas *nod*” donde inducen un doblamiento del DNA (Fisher y Long, 1993). Los flavonoides que interactúan con NodD son muy diversos, éstos incluyen luteolina, naringenina y daidzeína. De igual forma se encuentran algunos no flavonoides como chalconas, trigonelina y estaquidrina que son utilizados como inductores por algunos *Rhizobium* (Phillips et al., 1994; Schlaman et al., 1992).

Las diversas respuestas de inducción de los genes *nod* están mediadas en parte por la acción de los miembros específicos de la familia multigénica de *nodD* (Revisado en Schlaman et al., 1992). Todas las especies de *Rhizobium* tienen al menos un gen *nodD*, pero muchas presentan más de uno. Además, los genes *nod* también pueden estar organizados en diferentes regiones formando operones separados y regulados igualmente por NodD como activador transcripcional. La organización de los genes *nod* en varios operones hace que la activación por NodD se haga de manera diferencial ya que su afinidad es diferente dependiendo de la secuencia específica de la caja *nod* (Demont et al., 1994). Recientemente se ha encontrado que en *R. meliloti*, el producto del gen *nolR* constituye un regulador negativo de la expresión de *nodD*, al unirse a las regiones reconocidas por NodD. No todas las especies de *Rhizobium* poseen este represor negativo, por lo que podrían estar presentes mecanismos alternos de regulación negativa. Todo esto sugiere que la síntesis de los FNs y las modificaciones a su estructura pueden estar reguladas diferencialmente (Cren et al., 1995) ya que cuando se analizan los FNs producidos por una especie de *Rhizobium*, éstos constituyen una mezcla que difiere en sus composiciones.

Existen reguladores adicionales que pueden operar por lo menos en *Bradyrhizobium japonicum*. Por ejemplo NodW es un regulador novedoso de la expresión de los genes *nod* que es semejante a los reguladores de respuesta de dos componentes. La expresión de este gen parece que es muy importante para la infección de algunas plantas huéspedes, ya que en su ausencia se ha demostrado que los genes *nod* no se expresan al mismo nivel (Stacey et al., 1994). La presencia de un circuito determinado por NodW, añade una vía adicional al circuito NodD-inductor para el control de la expresión de los genes *nod*. Este gen no se ha encontrado en otros rhizobia, pero nos da una idea de la complejidad de la regulación de los genes *nod* en cada *Rhizobium*.

Inicialmente los genes de nodulación se clasificaron como genes *nod* comunes y de especificidad. Se denominaron comunes a los que se encontraban presentes en todas las especies y los de especificidad, únicamente aquellos presentes en ciertas especies. Actualmente esta afirmación se ha modificado al observarse que genes considerados como *nod* comunes, son en realidad determinantes de especificidad. Tal es el caso de *nodC*, que inicialmente se consideró como un gen *nod* común, sin ningún atributo de especificidad. Sin embargo, actualmente se sabe

que los diferentes *nodC*, aún cuando mantienen la misma función de quitina sintasa, forman oligómeros de quitina que varían en su longitud dependiendo del origen del gen, lo cual puede dar como resultado diferencias en cuanto a eficiencia y capacidad de nodulación de ciertos huéspedes (Kamst et al., 1997). Es así como ha variado mucho el concepto de genes *nod* comunes, ya que dependiendo de la especie de rhizobia presentan ciertas características. Lo cierto es que los genes denominados de especificidad en un principio, sigue siendo una particularidad de cada *Rhizobium*. Estos son generalmente los responsables de modificar químicamente la estructura básica de los oligómeros de *N*-acetil glucosamina adicionando grupos sulfato, metilo, ácido graso y azúcares modificados. La presencia de uno de estos sustituyentes en los FNs producidos, le da al *Rhizobium* la capacidad y la eficiencia de poder infectar grupos determinados de leguminosas y con ello lo que denominamos especificidad de huésped.

1.3 Síntesis de los factores Nod (FNs), la molécula señal

Los FNs se han estudiado con especial interés y esto se debe a que cuando éstos se purifican mantienen las propiedades de provocar muchas de las respuestas inducidas por la bacteria como: cambios en la morfología de los pelos radiculares (Lerouge et al., 1990; Spaink et al., 1991; Price et al., 1992; Sanjuan et al., 1992; Schultze et al., 1992; Mergaert et al., 1993; Heidstra et al., 1994), cambios en la expresión de genes de la planta (Horvath et al., 1993; Journet et al., 1994; Cook et al., 1995), en la mitosis y diferenciación de las células de la corteza (Spaink et al., 1991; Truchet et al., 1991; Relic et al., 1993), depolarización de la membrana de los pelos radiculares (Ehrhardt et al., 1992; Felle et al., 1995; Kurkdjian, 1995) y en algunos casos la formación de estructuras que semejan nódulos (Truchet et al., 1991; Mergaert et al., 1993; Stokkermans y Peters, 1994; Cárdenas et al., 1995).

La caracterización de los genes implicados en la síntesis y secreción de los FNs ha dado como resultado la determinación de la estructura básica central de los FNs. Estas moléculas consisten de un oligómero de quitina que puede ser un tetrámero o pentámero de *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNac), dependiendo de la especie de rhizobia, siendo el gen *nodC* quien determina la longitud.

nodC es un gen que codifica para una quitina sintasa, con gran homología con diversas enzimas descritas como β -glucosil transferasas. NodC se encuentra en la membrana citoplasmática (Barny y Downie, 1993) y en las fracciones membranales de *R. fredii* cuando se crecen en presencia de inductores (flavonoides). Esta quitina

sintasa es capaz de incorporar GlcNac en oligómeros de quitina hasta de cinco unidades y la elongación del oligosacárido se lleva a cabo hacia el extremo no reductor. NodC es el primer ejemplo de una nueva clase de *N*-acetil-D-glucosamina β (1,4) sintasa. A diferencia de otras quitinas sintasas, NodC está implicada en la síntesis de oligómeros, más no de polímeros. La mayoría de los FNs excretados por *R. meliloti* contienen cuatro unidades de glucosamina, mientras que *R. tropici* produce pentámeros. La introducción del *nodC* de *R. tropici* dentro de un fondo de *R. meliloti* con el *nodC* mutado da como resultado la producción de pentámeros. Esto demuestra que NodC está implicado en el control de la longitud del oligosacárido. Además, se ha reportado que el pentámero es menos activo que el tetrámero (Schultze et al., 1992) para inducir las respuestas de deformación de los pelos radiculares y cambios en la expresión de genes en alfalfa por lo que se le ha propuesto como un determinante de especificidad muy importante (Debellé et al., 1995).

El gen *nodM* se ha identificado en *R. meliloti*, *R. l. bv viciae* y *bv. trifolii*, como una glucosamina sintetasa (Baev et al., 1991). Mutaciones en este gen ocasionan retrasos en la nodulación y disminución en la síntesis de FNs. Además, *nodM* es capaz de complementar una mutación de *Escherichia coli* en la glucosamina sintetasa constitutiva, *GlmS*. Esto indica que tanto *nodM* y *glmS* pueden actuar conjuntamente como vías de síntesis de GlcNac, por lo que el NodM del *Rhizobium* podría proveer la cantidad de sustrato necesario para la síntesis de los FNs.

A NodB se le ha descrito como una quitina desacetilasa del extremo no reductor de los FNs que requiere para su actividad un oligómero de al menos cuatro residuos de GlcNac. Esta actividad de desacetilasa se ha demostrado con la proteína NodB purificada de *R. meliloti*. El grupo amino libre que se genera en el extremo no reductor puede entonces acilarse y en algunas especies metilarse (John et al., 1993; Röhrig et al., 1994). Estos resultados nos indican que la desacetilación es un proceso que tiene lugar después de la oligomerización del esqueleto de los FNs.

La presencia de un grupo metilo se ha reportado en la mayoría de los FNs que hasta ahora se han purificado. Actualmente se sabe que *nodS* es responsable de esta metilación, ya que se le ha caracterizado como metil transferasa "in vitro" (Geelen et al., 1995). NodS utiliza como sustratos aquellos quito-oligosacáridos que han sido desacetilados en el extremo no reductor por NodB. La proteína NodS purificada

puede metilar preferentemente quito-oligosacáridos desacetilados, y no los los quito-oligosacáridos acetilados y acilados (Geelen et al., 1995). Esto indica que NodS es una metil transferasa y sugiere que la *N*-metilación precede a la acilación (Mergaert et al., 1995, Geelen et al., 1995). Existen pocos reportes de la función de NodS durante la simbiosis, Waelkens y colaboradores (1995) reportaron que la función de NodS es indispensable en *R. tropici* para nodular frijol. Sin embargo, en nuestro grupo de trabajo mutaciones en *nodS* de *R. tropici* dan como resultado una disminución en el número, tamaño y citología de los nódulos (Villalobos et al., comunicación personal). El *nodS* de *R. etli* se ha aislado y secuenciado (Villalobos et al., 1994), y mutantes en este gen dan como resultado la ausencia de metilación en los FNs con un retraso en la nodulación (Villalobos 1997, comunicación personal).

Todos los FNs se encuentran *N*-acilados en el extremo no reductor pero las *N*-substituciones pueden variar entre las especies, y estar relacionadas con el control de la especificidad de huésped. En la mayoría de las especies esta posición “N” se encuentra acilada con un ácido graso común como el ácido *cis*-vaccénico, palmítico o esteárico, y lleva un grupo metilo como segundo substituyente. En algunas especies de *Rhizobium* los FNs se encuentran *N*-acilados con un ácido graso poliinsaturado, que se sintetizan bajo control de los genes *nodEF*. Los genes *nodFE* se han caracterizado muy bien en *R. l. bv viciae*, *R. l. bv trifolii* y *R. meliloti* (Geiger et al., 1994). NodF es homólogo a una proteína transportadora de acilos y NodE tiene homología con varias β -cetoacil sintasas. Estos genes constituyen uno de los mayores determinantes de especificidad entre *R. l. bv viciae* y *trifolii*. Después de la inducción de los genes *nodFE* en *R. l. bv viciae*, aún en la ausencia de los genes *nodABC*, el ácido graso se sigue sintetizando, indicando que la síntesis de los ácidos grasos poliinsaturados se realiza antes de su unión a los esqueletos de quito-oligosacáridos (Geiger et al., 1994).

NodA utiliza los tetrámeros de GlcN desacetilados en su extremo no reductor como los sustratos ideales para producir los correspondientes oligómeros de quitina acilados, sugiriendo el papel de *N*-acil transferasa para NodA (Röhrig et al., 1994). NodL por otro lado, se ha identificado como una proteína con semejanza a las acetil transferasas de bacterias. Mutaciones en este gen dan como resultado la producción de FNs sin *O*-acilar. La proteína NodL presenta actividad transacetilante *in vitro* usando la acetil-CoA como el donador de acetilos (Bloemberg et al., 1994). Los

quito-oligosacáridos pueden ser *O*-acetilados sin la necesidad de estar acilados demostrando que la presencia de la cadena *N*-acil no es necesaria.

En contraste a la *O*-acetilación, la *O*-carbamilación de los FNs se observa no solamente en el C6 como las *O*-acetilaciones, sino que también en el C4. Interesantemente NodU tiene alta similitud con una proteína de *Nocardia* que está relacionada con la biosíntesis de antibióticos β -lactámicos carbamilados (Jabbouri et al., 1995). La introducción del gene *nodU* en un fondo de *Rhizobium* carente de este gen resulta efectivamente en la producción de FNs 6-*O* carbamilados. Sin embargo, su mutación sólo resulta en una reducción de la carbamilación y no en la ausencia de ésta, lo que parece indicar la presencia de otros genes implicados en esta modificación química (Jabbouri et al., 1995).

Las sustituciones en el extremo reductor se encuentran preferentemente sobre el C6, éstas son variadas y extremadamente importantes para la especificidad de huésped. La sulfatación es una de ellas y constituye una de las modificaciones más importantes de los FNs producidos por especies como *R. tropici*, *R. meliloti*, *R. sp. GRH2* y *S. teranga*. Los genes responsables se han identificado como *nodPQH* y mutaciones en *nodH* por ejemplo, dan como resultado FNs no sulfatados con cambios en su espectro de hospedero. En *R. meliloti* mutaciones de *nodPQ* producen una mezcla de factores sulfatados y no sulfatados debido a una copia adicional en el genoma. Sin embargo, dobles mutantes en *nodPQ* resultan incapaces de producir los FNs sulfatados. La sulfatación requiere de la síntesis de una forma activada del sulfato y parece ser que NodP y NodQ forman el complejo proteico multifuncional con actividad de ATP sulfurilasas y cinasas, que producen los correspondientes APS (adenosina 5'-fosfosulfato) y PAPS (3'-fosfoadenosina 5' fosfosulfato) (Schwedock y Long, 1990; Schwedock et al., 1994). NodH tiene homología con sulfotransferasas animales, y en su forma pura es capaz de utilizar PAPS para transferir el grupo sulfato a los FNs no sulfatados o usar quitotetraosa como sustrato. Normalmente se utilizan los tetrámeros con mucho mayor afinidad que los trimeros o pentámeros de quitina. Esto indica que el esqueleto de los FNs debe sintetizarse antes de la decoración con el grupo sulfato, ya que se requiere preferencialmente del esqueleto de un tetrámero para la sulfatación (Schultze et al., 1995; Ehrhardt et al., 1995).

NodX tiene la función de *O*-acetilar los FNs en el C6 del extremo reductor. Esta rara modificación se ha observado solamente en *R. l. bv. viciae* y pareciera que NodX tiene mucho mayor afinidad por los pentámeros que los tetrámeros (Firmin et

al., 1993). Es interesante mencionar que las cepas TOM poseen dos *O*-acetiltransferasas, NodL y NodX. Aunque ambas *O*-acetilan en la misma posición C6, mantienen poca homología entre ellas por lo que probablemente pertenecen a diferentes familias de acetil transferasas (Downie, 1989; Clark et al., 1991).

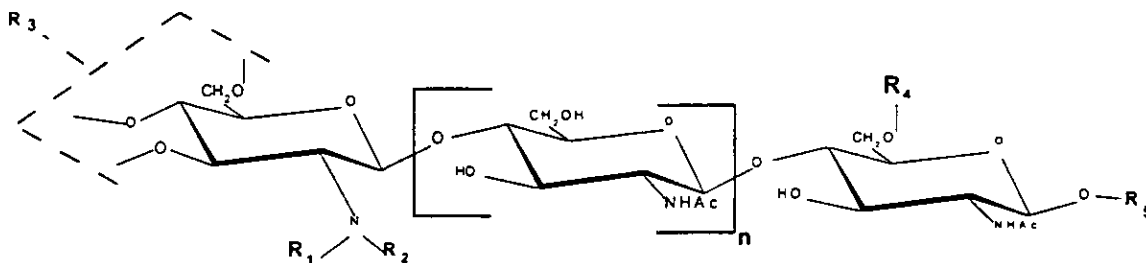
La fucosilación y arabinosilación constituyen otras de las modificaciones en los FNs de diferentes *Rhizobium*. Se sabe que mutaciones en *nodZ* de *Bradyrhizobium japonicum* dan como resultado FNs no fucosilados con una nodulación defectuosa sobre su huésped habitual (Stacey et al., 1994). Recientemente la función enzimática de NodZ se ha demostrado *in vitro*, encontrándose que la actividad de fucosil transferasa no solamente se encuentra limitada a los oligosacáridos de quitina, los actuales precursores de los FNs, sino que también de sustratos de origen animal como glicoproteínas (Quinto et al., 1997). En *Azorhizobium caulinodans* se ha encontrado una proteína homóloga a la proteína NodZ de *B. japonicum* la cual está implicada en la arabinosilación. La *O*-arabinosilación se ha observado únicamente en rhizobios que nodulan tallos y raíces como *Sesbania rostrata*. Esto sugiere que proteínas de la misma familia podrían estar relacionadas en la *O*-glucosilación del extremo reductor pero con dos residuos glucosídicos diferentes. Las características principales de los diferentes factores Nod de diferentes especies de *Rhizobium* se resumen en la figura 2. En esta figura se excluye la estructura para los FNs de *Rhizobium etli* ya que estos serán descritos en detalle en la sección de resultados, al igual que sus actividades biológicas.

1.4 Transporte de los FNs

En la mayoría de los estudios, los FNs se han aislado de los medios de cultivo en que se encuentra creciendo la bacteria. Esto indicó la presencia de algún proceso de secreción (Spaink et al., 1995, Cárdenas et al., 1996; Fernández-López et al., 1996). Debido a que los FNs son moléculas anfipáticas hidrofóbicas, se puede especular que se encuentran en el medio como formas multiméricas o unidas a transportadores (McKay y Djordjevic, 1993).

Las proteínas NodI y NodJ encontradas en *Rhizobium* son proteínas similares a las subunidades de complejos de secreción dependientes de ATP (Downie, 1991; Vázquez et al., 1993). Interesantemente se ha encontrado que *nodI* y *nodJ* son genes que juegan un papel muy importante en la secreción de los FNs (Spaink et al., 1995, Cárdenas et al., 1996; Fernández-López et al., 1996). Vázquez y colaboradores (1993) encontraron por análisis detallado de comparación de estas proteínas, que

NodI y NodJ se parecen a proteínas que secretan polisacáridos en bacterias Gram-negativas. NodI mantiene una alta similitud con las proteínas de unión a ATP de los sistemas de transporte denominados ABC (ATP binding cassette) y especialmente aquellos que secretan polisacáridos capsulares. NodJ por otro lado presenta un perfil hidropático similar a los perfiles de proteínas integrales de membrana también relacionadas con el transporte de polisacáridos (Vázquez et al., 1993). Mutaciones



Especies	R1	R2	R3	R4	R5	n	Ref
<i>R. meliloti</i>	H	C16:2	Ac(O-6) H	Sulfato	H	1,2,3	Lerouge et al. 1990 Roche et al. 1991 Schultze et al. 1992
<i>R. leg. bv. viciae</i>	H	C16:3 C18:4 C18:1	Ac(O-6)	H Ac(O-6)	H	2,3	Spaink et al. 1991
<i>B. japonicum</i>	H	C18:1 C16:0 C16:1	Ac(O-6) H	MeFuc	H	3	Carlson et al. 1993 Sanjuan et al. 1992
<i>B. elkanii</i>	H Me	C18:1	Ac(O-6) H Cb	MeFuc Fuc	H Gro	2,3	Carlson et al. 1993
NGR 234	Me	C18:1 C16:0	Ac(O-6) H Cb (1,2)	MeFuc AcMeFuc MeFucS	H	3	Price et al. 1992
<i>A. caulinodans</i>	Me	C18:1 C18:0	Ac(O-6) Cb	D-Ara H	H	2,3	Mergaert et al. 1993
<i>R. tropici</i>	Me	C18:1	H	Sulfato	H	3	Poupot et al. 1993 Folch et al. 1994
<i>R. fredii</i>	H	C18:1	H	MeFuc Fuc	H	1,2,3	Bec-Ferte et al. 1993

*La estructura para *Rhizobium etli* se describirá en la sección de resultados de este trabajo.

Figura 2. Características principales de los factores Nod de diferentes especies. Los diversos grupos de sustituyentes químicos que se describen, se han determinado en varios FNs. Me= metil, C16:0= ácido palmítico, C18:1= ácido vaccénico, etc.; Ac= acetil; Fuc= fucosa; MeFuc= 2-O-metilfucosa; Ara= arabinosa; Gro= glicerol; Cb= carbamilo; S= sulfato.

en *nodI* y *nodJ* tienen un efecto sobre la secreción de los FNs, el cual se observa como un retraso en la secreción. Este efecto es más drástico en las primeras horas después de inducir los genes *nod* y evaluar la secreción. Sin embargo, la secreción de los FNs no se afecta totalmente lo cual sugiere la existencia de un sistema de

transporte alterno (Spaink et al., 1995; Cárdenas et al., 1996). En *R. etli* la función de *nodIJ* es muy evidente a tiempos de 1 y 3 hrs. La actividad de NodI y NodJ a estos tiempos es muy elevada, a juzgar por la cantidad de FNs secretados en la cepa silvestre y comparada con las mutantes en *nodIJ*, estas últimas presentan una secreción muy reducida, además de un fenotipo con retraso en la nodulación (Cárdenas et al., 1996). NodT es una proteína descrita en *R.l. bv viciae* similar a proteínas de membrana externa que forman parte de sistemas de secreción y que se ha sugerido que pudiera tener un papel en la secreción de los FNs en conjunto con NodI y NodJ (Downie, 1994; Rivilla et al., 1995). Sin embargo, mutaciones en este gen no parecen afectar la secreción de los FNs (Spaink et al., 1995).

Es interesante que en *R. etli* se ha localizado una copia del *nodT* en el plásmido “C” y otro en cromosoma. En una cepa curada del plásmido “C” se observa una disminución en la secreción de los FNs. Sin embargo, la presencia de una copia adicional en el cromosoma podría justificar porque aún no tenemos un efecto notable en la secreción de los FNs (Hernández et al., 1997, comunicación personal). Actualmente se está haciendo la mutación en ambas copias y los resultados que estos proporcionen será de gran interés para entender el papel de estos genes en la secreción de los FNs (Hernández et al., 1997, tesis de grado).

En *R. meliloti* se han identificado otros genes denominados *nodFGHI* que teóricamente podrían estar relacionados con la secreción de los FNs, ya que estos genes codifican para proteínas que muestran similitud con familias de proteínas integrales de membrana que pueden funcionar conjuntamente en transporte (Baev et al., 1991; Saier et al., 1994). Estas proteínas podrían funcionar junto con NofF, una proteína cuya función es fusionar las membranas y que podría permitir el transporte de los FNs a través de la membrana interna y externa en un sólo paso (Saier et al., 1994). Sin embargo, no hay reportes experimentales a la fecha que apoyen esta hipótesis.

1.5 NodD y la especificidad de huésped

Después de que los FNs se han transportado al espacio extracelular, éstos tienen que entrar en contacto con la planta y ser reconocidos de manera específica como los activadores de toda una serie de respuestas reguladas por la planta. Las evidencias sugieren que la especificidad estriba en la estructura de los FNs, especialmente en el tipo de decoraciones. Esto se ha estudiado por enfoques de pérdida y ganancia de

función al mutar e introducir genes *nod* para analizar su efecto sobre los espectros de hospederos.

Los *Rhizobium* de la misma especie mantienen normalmente los mismos tipos de sustituciones en sus FNs sin importar su localización geográfica siendo así, capaces de nodular el mismo huésped (Demont et al., 1994). La segunda barrera de especificidad está determinada por *nodD*. Las especies diferentes de *Rhizobium* capaces de producir FNs con el mismo tipo de decoración, pueden ser ineficientes en mantener una nodulación cruzada debido a la incapacidad de sus NodD's de reconocer los flavonoides secretados por la planta. Esto lo hemos demostrado durante el desarrollo de este trabajo y se describirá más detalladamente en la sección de resultados. *R. loti*, un *Rhizobium* capaz de producir FNs idénticos a los de *R. etli* es incapaz de nodular frijol. *R. etli* por otro lado es incapaz de nodular *lotus*, el huésped habitual de *R. loti*. Cuando se introduce el *nodD* FITA (flavonoid independent transcription activation) que induce constitutivamente la expresión de los genes *nod* en *R. loti*, esta bacteria adquiere la capacidad de poder nodular frijol. Esto demuestra que lo que impide infectar este huésped es su incapacidad de reconocer los flavonoides secretados por frijol (Cárdenas et al., 1995). De esta forma apoyamos la hipótesis de NodD como un determinante de especificidad muy importante en los primeros momentos de la interacción, cuando la bacteria tiene que reconocer inicialmente las moléculas señales liberadas por la planta.

1.6 Reconocimiento de los FNs

Se ha tratado de entender los mecanismos mediante los cuales la planta es capaz de reconocer los FNs. Se propone la existencia de un receptor, sin embargo, aún no se sabe la naturaleza de éste pero se ha especulado su presencia. Las proteínas que se han descrito, y que tienen afinidad de unión a los FNs (Bono et al., 1995), podrían estar implicadas en su reconocimiento, procesamiento o ruptura (Staelin et al., 1995) para facilitar el acceso a la membrana de la planta. Las lectinas clásicas de semillas de leguminosas se han estudiado con gran interés, aunque es poco probable que la simple unión al azúcar pueda proporcionar la especificidad. Se han identificado otras lectinas que cuando se expresan en sistemas heterólogos confieren nuevas propiedades de nodulación (Eijsden et al., 1995) por lo que su participación en la nodulación no está totalmente descartada. Otras lectinas novedosas como las de soya y *Dolichos* también resultan interesantes para su estudio por su propiedad de unir FNs (Etzler et al., 1996).

1.7 Respuesta de la planta a los FNs.

La mayoría de leguminosas se infectan vía raíz; el primer contacto entre la bacteria y la planta se lleva a cabo en las células de la epidermis de la superficie de la raíz. Uno de los signos evidentes de la infección es la deformación de los pelos radiculares y su encurvamiento en la región apical, el cual se convierte en el foco de infección y donde tiene lugar la formación del llamado hilo de infección, que crece a lo largo del pelo y a través de las células de la corteza, donde se ramifica. Una de las propiedades más importantes de los FNs es que son capaces de mimetizar muchas de estas respuestas en ausencia de la bacteria. Cuando los FNs se purifican, mantienen esta actividad a concentraciones nanomolares, induciendo en pocos minutos un hinchamiento de los ápices de los pelos radiculares (Heidstra et al., 1994) probablemente como resultado de la reorganización del citoesqueleto y cambios de calcio intracelular (Allen et al., 1994; Cárdenas et al., este trabajo).

Los genes de la planta que se expresan de manera específica durante los primeros eventos de la simbiosis, infección y formación del nódulo se han denominado nodulinas tempranas (*ENOD*). *ENOD5* y *ENOD12* codifican para proteínas ricas en prolinas, las cuales se les han propuesto como proteínas de pared celular que pudieran estar implicadas en el proceso de infección en las primeras etapas de respuestas de la planta, ya que responden rápidamente a la aplicación de los FNs, especialmente en todas las células epidérmicas (Scheres et al., 1990; Horvath et al., 1993; Bauer et al., 1994; Journet et al., 1994). Además, el hecho de que estos genes se expresen en células que contienen hilo de infección, los convierte en probables candidatos como componentes de la pared de estas estructuras (Scheres et al., 1990).

Otro gen interesante que se expresa en respuesta a los FNs es *ENOD40*, que se encuentra ampliamente conservado en las leguminosas pero no presenta un marco de lectura abierta lo suficientemente grande, por lo que inicialmente se le relacionó con funciones regulatorias (Asad et al., 1994; Crespi et al., 1994). Actualmente se sabe que *ENOD40* codifica para un polipéptido pequeño que expresado de manera transitoria o estable en raíces de *Medicago* induce la diferenciación y división de las células de la corteza. van de Sande y colaboradores (1996), demostraron que la región codificante de este polipéptido contiene en su extremo 3' una región regulatoria que al igual que la codificante es capaz de inducir la división de protoplastos de tabaco en altas concentraciones de auxina.

Las hibridaciones *in vitro* demuestran la expresión de ENOD40 en el periciclo y se propone que este polipéptido podría cambiar los niveles de concentración de citocinina/auxina, permitiendo que las células de la corteza puedan entrar en división mitótica. Interesantemente, al etileno se le ha reportado como un inhibidor de la división de las células de la corteza y los primordios generalmente se posicionan en la región próxima al protoxilema, la región más baja en etileno (Fig. 3A, B). Es interesante que en presencia de inhibidores de la síntesis o percepción del etileno como Ag⁺ se ocasionan que los primordios cambien su posición habitual (Heidstra et al., 1997). A la uridina se le ha propuesto como regulador positivo, ya que cuando se le adiciona a explantes de corteza en presencia de auxina y citocinina se induce la división celular (Libenga et al., 1973; Smit et al., 1995).

El modelo resultante se puede interpretar como que el regulador positivo uridina, liberado del protoxilema, induciría la división celular de manera local, mientras que el etileno constituiría el regulador negativo, éste se produce en posición opuesta al floema e inhibiría localmente la división. Ambos factores podrían propiciar un gradiente que determine en cierto momento el lugar donde se originará la división celular (Heidstra et al., 1997). Estos resultados nos podrían sugerir la siguiente pregunta ¿son todas las células de la corteza susceptibles de experimentar división celular en presencia de la señal adecuada?

1.8 PELOS RADICULARES:

1.8.1 Biología de los pelos radiculares

El crecimiento polarizado de pelos foliares, radiculares, tubos polínicos, hifas, y musgos, inducen la formación de células alargadas de forma cilíndrica. Típicamente el crecimiento es rápido con un alto grado de actividad celular en la región apical. Análisis fisiológicos de los mecanismos que mantienen los ápices en crecimiento han recibido gran atención especialmente en el papel de los campos eléctricos, citoesqueleto, influjos de calcio y gradientes de iones, que al parecer controlan el crecimiento polarizado.

Los pelos radiculares son células con ápices en crecimiento de forma tubular que surgen de las raíces epidérmicas conocidas como tricoblastos (Fig. 3A, C). Como todas las células con ápices en crecimiento, los pelos radiculares crecen por la adición de precursores de pared celular en la región apical y estos precursores normalmente son transportados por vesículas del sistema de endomembranas. Otros

ejemplos de ápices en crecimiento son los tubos polínicos, micelios de hongos y protonemas de musgos. Se sabe que los pelos radiculares están implicados en aumentar la superficie y por lo tanto la capacidad de absorción (Clarkson et al., 1988, Kochian et al., 1995).

Debido a que las células que dan origen a los pelos radiculares no se están dividiendo pero se elongan hacia el exterior en forma polarizada, su contenido interno se puede observar fácilmente y manipular experimentalmente. Esto ha hecho que recientemente se les utilice como un modelo adecuado para el estudio de procesos biológicos. Su crecimiento en posición alejada de la base de la raíz hace posible que los pelos radiculares sean adecuados para su estudio por técnicas de fijación en congelamiento rápido (rapid-freeze) y sustitución en frío (freeze-substitution) para análisis de estructura celular en microscopía electrónica (Ridge, 1988).

1.8.2 Distribución de los pelos radiculares

Los pelos radiculares se distribuyen en diferentes regiones según su estado de desarrollo (Bhuvanewari et al., 1981). El meristemo en crecimiento de la raíz contiene lo que se conoce como cofia. La cofia está desprovista de pelos radiculares y los pelos radiculares empiezan a emerger normalmente en una zona definida por Bhuvanewari y Solheim (1985), como la zona de emergencia de los pelos radiculares (SERH), los cuales obviamente son los más pequeños y son los más próximos a la región de elongación. La zona SERH precede a la zona de los pelos radiculares en crecimiento (GRH) donde los pelos están creciendo activamente. Los hallazgos más recientes muestran que la iniciación de los pelos radiculares en *Arabidopsis* está determinada por las células de la corteza en la base, las cuales son ocho en *Arabidopsis*. Dolan y colaboradores (1994) encontraron que los pelos radiculares se encuentran localizados sobre la pared anticlinal de dos células de la corteza (Fig. 3A, C, Fig. 4). Además, se ha encontrado que las células formadoras de pelos radiculares son en un principio, células del tricoma con un citoplasma mucho más denso que las células vecinas. Es así como Dolan es capaz de distinguir los dos tipos celulares de la epidermis, las células formadoras de pelos radiculares y las que carecen de esta propiedad. Estas células se pueden diferenciar por dos características celulares; las células formadoras de pelos son las que presentan por lo general un tamaño más corto que las no formadoras, las cuales presentan depósitos en la superficie celular.

1.8.3 Estadios de desarrollo en pelos radiculares

Los estados de desarrollo de los pelos radiculares se estudiaron por primera vez por Wood y Newcomb (1989) en alfalfa y posteriormente por Dolan y colaboradores (1994). Ambos reconocieron que los pelos radiculares emergen de las células de la corteza que inicialmente aparecen como brotes de forma cónica en la superficie de los tricoblastos. Después de cuatro hrs el flujo citoplasmático se hace rápido y el núcleo migra hacia la base del tubo en crecimiento. Seis horas después, el pelo es lo suficientemente grande como para que el núcleo emigre hacia el tubo en crecimiento. En este momento se presenta una disminución de la velocidad del flujo citoplasmático, acompañado de una disminución de la velocidad de crecimiento. Este flujo citoplasmático puede recuperarse pero al alcanzar la madurez, los flujos citoplasmáticos disminuyen nuevamente hasta detenerse por completo.

Las fitohormonas pueden actuar como reguladores del crecimiento de los pelos radiculares. En trébol, Izumo y colaboradores (1994) mostraron que las cinetinas y el ácido abscísico estimulan la elongación, en tanto que el ácido giberélico no. Inicialmente se sugirió al etileno como un elemento importante en la regulación de la diferenciación de los tricoblastos en la epidermis (Dolan et al., 1994). Por otro lado Kieber y colaboradores (1993) aislaron una mutante en *Arabidopsis* denominada *ctr1*, la cual crece como si estuviera en presencia del etileno y desarrolla pelos radiculares en posiciones erróneas (Fig. 4A, B).

Recientemente, se han mostrado evidencias más contundentes sobre el etileno como un regulador positivo del desarrollo de los pelos radiculares en *Arabidopsis thaliana* (Dolan et al., 1995). En éste trabajo se demuestra que al agregar de manera exógena precursores de la síntesis de etileno, hay un aumento en la diferenciación de pelos radiculares en posiciones normalmente ocupadas por las células no formadoras de estos tipos celulares, ya descritas anteriormente (Fig. 4B). Por otro lado, bloqueadores de la síntesis de etileno o Ag^+ resultan en la disminución de pelos radiculares (Fig. 4C). Esto nos da una idea de la importancia y el papel del etileno en la diferenciación de los pelos radiculares. Heidstra y colaboradores (1997), han mostrado que el etileno es un potente inhibidor de la división de las células de la corteza, sin embargo, es un promotor de la formación de los pelos radiculares que implican crecimiento apical. Es interesante que aún cuando el efecto de los FNs trae consigo una reiniciación del crecimiento apical para dar lugar a la deformación y enroscamiento, el etileno parece no tener ningún efecto al menos en esta etapa como

lo demuestran los resultados reportados usando inhibidores del etileno (Heidstra et al., 1997).

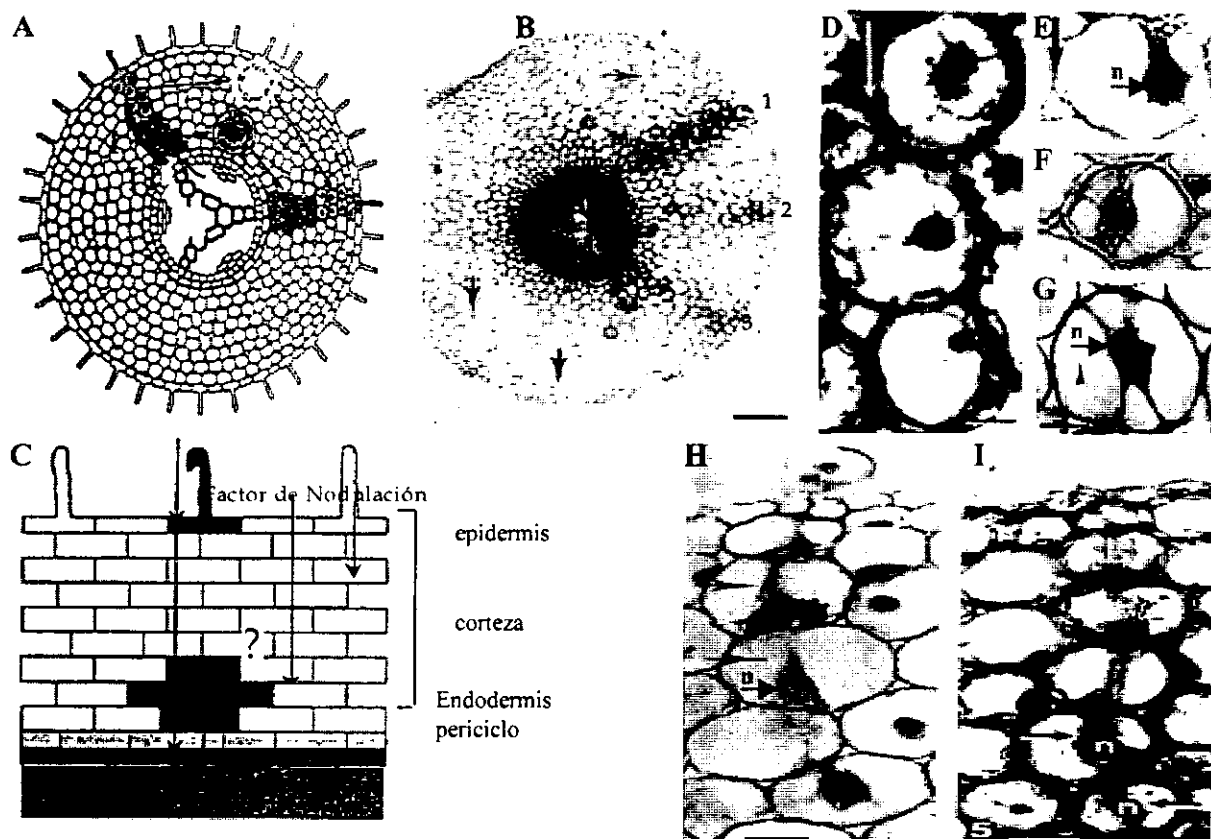


Figura 3. (A), Esquema que muestra la reactivación de las células corticales de chicharo inoculadas con *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* o con la aplicación de los FNs. Las células de la corteza externa pasan de G0 /G1 a la fase S del ciclo celular (I) y finalmente se separan en la fase G2 del ciclo. Las células activadas se encuentran en los polos opuestos del protoxilema de la raíz (II). En (B), las áreas de infección se indican con 1, 2, y 3 respectivamente y se caracterizan por la presencia de abundante citoplasma que se tiñen fuertemente con azul de metileno. Estas células tienen la particularidad de tener el núcleo localizado en la posición central (ver D-I, marcados con la letra "n"). M, meristemo del nódulo, su inicio tiene lugar en los polos opuestos del xilema (X). En (C), se representa de manera específica el modo de acción de los FNs; se ha sugerido que los FNs son reconocidos por un receptor presente en la planta huésped. Sin embargo, no está claro si los FNs interactúan directa o indirectamente con los tres tejidos o si sólo se da con la epidermis. El reconocimiento de los FNs por la planta da como resultado la generación de segundos mensajeros que después de su difusión o transporte podrían disparar la respuesta de diferenciación de la corteza interna. En (E-I), se muestra una serie de ampliaciones del área de infección que muestra los estados sucesivos de la migración del núcleo en células vacuoladas que permiten el paso del hilo de infección. La formación del puente citoplasmático se acompaña de la migración del núcleo hacia el centro de la célula (E-I, ver la zona oscura localizada en posición central). (E, F y G), muestran el rearrreglo espacial de las tiras citoplasmáticas que radian al núcleo justo antes de la infección. En (G) se muestra el puente citoplasmático resultante que se visualiza como las tiras oscuras que se extienden desde el núcleo a la membrana plasmática. (H-I) muestra en una sección transversal de un hilo de infección y un puente intracitoplasmático (flechas) (Mylona et al., 1995).

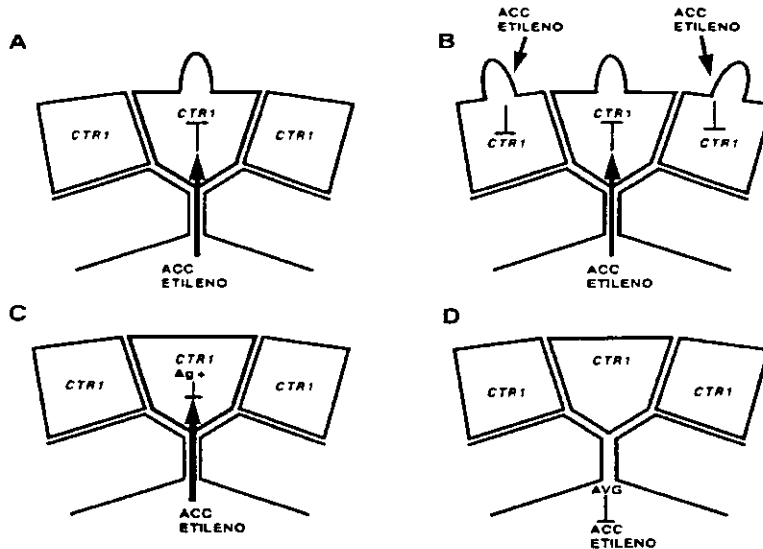


Figura 4. Modelo de desarrollo de los pelos radiculares. El etileno como un regulador muy importante de la diferenciación de los pelos radiculares. A, muestra la forma normal en que los pelos radiculares se diferencian. B, muestra el efecto de agregar precursores del etileno (ACC=1-aminociclopropano-1-carboxilato) de manera exógena. C y D, muestran el resultado de agregar bloqueadores de la síntesis del etileno (AVG= aminoethoxy-vinylglycine).

1.8.4 Flujo citoplasmático

En los pelos radiculares, la mayoría del citoplasma se encuentra entre el núcleo y el ápice. Normalmente la vacuola ocupa la mayor parte del volumen celular y la formación de hebras transvacuolares está dada por corrientes de citoplasma que atraviesan las vacuolas en dirección longitudinal. Estas se forman con mayor frecuencia alrededor de las vacuolas más pequeñas y se observan como corrientes en las cuales las vesículas y organelos van inmersos (Shimmen et al., 1995).

El flujo citoplasmático generalmente se observa como el movimiento de las partículas en el citoplasma y se supone que está mediado en un sistema motor similar al de actina-miosina (Kuroda, 1990). Es importante señalar que esta última suposición está apoyada fuertemente en estudios realizados con compuestos que dañan la organización del citoesqueleto de actina y que resultan en la incapacidad de mantener el flujo citoplasmático. El flujo citoplasmático no se observa muy fácilmente en el ápice de la célula y muy probablemente se debe a la alta acumulación de vesículas cargadas con precursores de pared celular en esta región que posteriormente serán fusionadas al ápice en crecimiento.

2.0 ANTECEDENTES

Fue en 1887 que Haberlandt observó por primera vez que el núcleo de los pelos radiculares en crecimiento mantenía una proximidad al ápice en crecimiento. Desde entonces esto constituye un fenómeno comúnmente observable. La infección de las leguminosas por el *Rhizobium* se sabe que induce una respuesta de migración del núcleo hacia la base del pelo radicular, mientras que el hilo de infección lo sigue, de aquí la suposición de que el núcleo pudiera determinar el curso del hilo de infección (Fahraeus, 1957; Nutman, 1959). Sin embargo, no hubo ninguna explicación aceptada para este fenómeno hasta 1987 en que Lloyd y colaboradores usando un herbicida que rompe los microtúbulos de los pelos radiculares, lograron la migración del núcleo a la base del pelo radicular de una leguminosa. Esta migración se puede inhibir por la adición de citocalasina D, la cual fragmenta los filamentos de actina (Lloyd et al., 1987). Estos resultados demostraron que el citoesqueleto de actina participa en la migración del núcleo y que los microtúbulos mantienen la posición del núcleo con respecto al ápice en crecimiento. Un fenómeno similar de migración nuclear se ha caracterizado en la simbiosis durante el avance del hilo de infección (Fahraeus, 1957; Nutman, 1959). Estos hechos hacen pensar que los resultados de Lloyd y colaboradores (1987) sugieran la probable participación del citoesqueleto en la simbiosis.

Se ha propuesto que el citoesqueleto constituye un elemento importante en la iniciación, desarrollo y mantenimiento del nódulo, así como durante el crecimiento de los pelos radiculares y establecimiento de polaridad (Brewin, 1991; Pérez et al., 1994). Durante los primeros estados de la morfogénesis del nódulo, hay evidencias de que el citoesqueleto participa en la formación del hilo de preinfección y la inducción de mitosis en células de la corteza (Fig. 3H, I; Fig. 5) (Bakhuizen, 1988). Además de la migración nuclear existe la formación de puentes citoplasmáticos entre las células de la corteza. Se ha propuesto que estos arreglos citoplasmáticos son precursores del camino que sigue el crecimiento del hilo de infección (van Brussel et al., 1992).

Los pelos radiculares que están creciendo rápidamente son más susceptibles a la deformación y al desarrollo de hilos de infección inducida por *Rhizobium* (Bhuvaneshwari y Solheim, 1985). Esta afirmación está en contraposición con lo reportado por Heidstra y colaboradores (1994), quienes afirman que son los pelos radiculares terminando el crecimiento los más susceptibles a la deformación. La

contraposición de estas afirmaciones puede residir en los modelos usados, además se debe considerar que las plantas formadoras de nódulos determinados e indeterminados podrían introducir variables diferentes para su infección que implican citología del meristemo y nódulo muy diferentes. Se cree que la bacteria unida a los pelos radiculares induce una estimulación local en las velocidades de expansión de la pared celular (van Batenburg et al., 1986). La iniciación del hilo de infección asemeja a un túnel, que probablemente implica la reestructuración del citoesqueleto. Esto podría dirigir la fusión de las vesículas citoplasmáticas que contienen los componentes de pared celular a los puntos de crecimiento del hilo de infección que se encuentra a lo largo de las células de la corteza como se muestra en la figura 5 (Brewin, 1991).

Ridge (1992) mostró que los filamentos de actina llegan a fragmentarse en pelos enroscados de *Vicia hirsuta* cuando se les infecta con la bacteria *Rhizobium*. Allen y colaboradores (1994), encontraron focos de actina en la proximidad del ápice por efecto de los FNs trabajando con pelos radiculares de alfalfa. Ambos estudios utilizan pelos radiculares enroscados, lo que implica que por lo menos han pasado 4 horas después de la adición de la bacteria o de los FNs, por lo que la pregunta del papel del citoesqueleto durante los primeros minutos de la interacción simbiótica queda abierta.

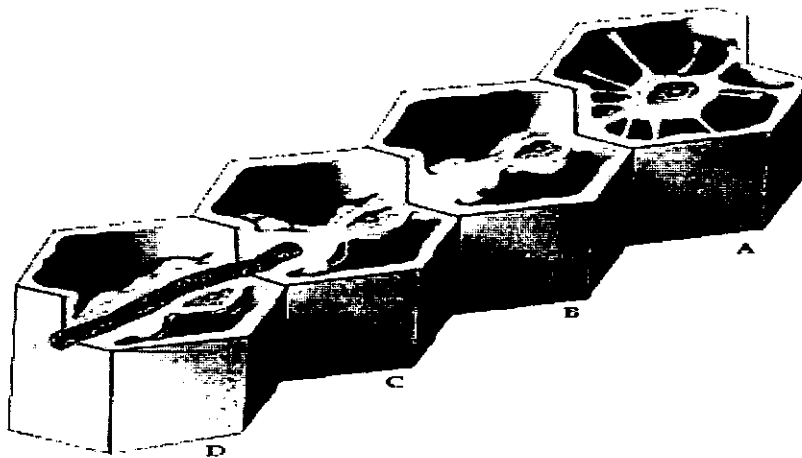


Figura 5. Representación tridimensional de los arreglos de los microtúbulos y del citoplasma antes, durante y después de la infección de las células corticales por *Rhizobium*. En la célula A, varias tiras citoplasmáticas radian del citoplasma perinuclear al citoplasma periférico. En la célula B, la orientación del citoplasma radial se fusiona con el puente citoplasmático, mientras que las tiras radiales tienden a desaparecer. En la célula C, se presenta el estado de infección. En la célula D, se ilustra un hilo de infección después de su paso por las células corticales (Bakuizen et al., 1998).

Es de especial interés saber ¿qué pasa con el citoesqueleto en los pelos radiculares? y ¿qué papel juega éste en las regiones apicales? ya que es aquí donde se ha propuesto que se origina el hilo de infección. Es bien sabido que los pelos radiculares responden a los FNs con una depolarización de la membrana, la movilización de iones, y la alcalinización del citoplasma (Ehrhardt et al., 1992; Felle et al., 1995). Es por ello que también es necesario determinar ¿qué sucede con los iones intracelulares como Ca^{2+} durante los primeros eventos de respuesta de la interacción?. En los primeros momentos los FNs secretados por el *Rhizobium* deben establecer los mecanismos que le permitan modular del proceso de infección, esto es, los pasos iniciales que preceden a la formación del hilo de infección y que permitan la entrada de la bacteria.

Existen evidencias importantes que apoyan el papel del calcio en la transducción de señales en respuesta a ciertos estímulos (Hepler et al., 1985; Bush, 1993; Gilroy et al., 1990 y 1993; Poovaiah y Reddy, 1993; Webb et al., 1995). Se han observado incrementos en el calcio citosólico en varios tipos celulares en respuesta a estímulos como: fitohormonas, estímulos mecánicos, altas y bajas temperaturas, estrés salino, exposición a agentes oxidativos, luz roja, elicitores de hongos, factores de autocompatibilidad, y campos eléctricos (Bush, 1993; Gilroy et al., 1993; Webb et al., 1995). Muchos de los componentes de los sistemas de segundos mensajeros basados en calcio que se han encontrado en animales, también se han identificado en células vegetales. Esto incluye efectores primarios, tales como proteínas cinasas dependientes de calcio y fosfatasa (Bush 1993; Gilroy et al., 1993; Poovaiah y Reddy, 1993; Webb et al., 1995).

Allen y colaboradores (1995) han sugerido la presencia de influjos de Ca^{2+} y H^+ en los ápices de pelos radiculares de alfalfa (leguminosa que forma nódulos indeterminados), minutos después de exponerlos a los FNs de *R. meliloti*. Aún cuando los autores proponen un influjo de calcio, las gráficas muestran eflujos más que influjos, y con valores poco consistentes. En otro trabajo reciente se ha mostrado que en pelos radiculares de alfalfa, después de exponerlos a los FNs de *R. meliloti*, no existe un aumento de Ca^{2+} intracelular en la región apical y sólo ocurren oscilaciones de éste alrededor del núcleo (Ehrhardt et al., 1996). Interesantemente en este trabajo los pelos radiculares de alfalfa no presentan un gradiente de calcio apical como podría haberse predicho de los resultados de Allen. Esto es incongruente, si consideramos que existe un gran número de reportes con evidencias cada vez

mayores de que los gradientes de Ca^{2+} en otros ápices radiculares es una característica muy consistente de la viabilidad de los pelos radiculares (Clarkson et al., 1988; Schiefelbein et al., 1992; Battey y Blackbourn, 1993; Jones et al., 1995; Pierson et al., 1996, Felle y Hepler, 1997).

Dado que no existen reportes concluyentes sobre el papel del citoesqueleto y iones como el calcio durante los primeros estados de la interacción simbiótica que nos permitan entender su participación, o contribución al fenómeno de infección, es de nuestro interés estudiar estos puntos en la interacción *Rhizobium etli-Phaseolus vulgaris*. Para ésto, decidimos abordar la pregunta original ¿qué pasa o cómo responde el citoesqueleto de la célula vegetal en presencia de los factores Nod?. Para poder contestar esta pregunta, hemos usado un enfoque novedoso: esto es, microinyectando compuestos fluorescentes dentro de los pelos radiculares vivos, con la ventaja de que esto no implica ningún procedimiento de fijación química, que altere la célula. Hemos microinyectado faloidina fluoresceinada, la cual es una toxina obtenida de hongos capaz de unirse con gran especificidad a los filamentos de actina y que se puede visualizar por microscopía confocal (Miller et al., 1992; Zhang et al., 1993). De esta forma hemos estudiado el citoesqueleto de actina en los pelos radiculares *in vivo* de *Phaseolus vulgaris* en presencia y en ausencia de los FNs. Los resultados obtenidos indican que existen rearrreglos de los microfilamentos de actina en respuesta a los FNs de *R. etli* que se sobreprodujeron y purificaron por HPLC (high performance liquid chromatography) para este propósito. Nuestros resultados muestran que los FNs inducen procesos que dramáticamente modifican los microfilamentos de actina en pelos radiculares de *P. vulgaris*, 5 min después de exponerlos. Estos cambios se caracterizan por una rápida fragmentación de los cables de actina durante los primeros minutos y una fase gradual de recuperación después de 30 min. Con estos resultados concluimos que los FNs inducen una rápida modulación del citoesqueleto de actina y sugerimos que estos cambios podrían estar relacionados con la formación del hilo de infección. Estos datos se presentan y discuten con todo detalle en la sección de resultados y discusión de esta tesis.

Igualmente abordamos la pregunta ¿cuál es la respuesta del calcio intracelular a los FNs de *R. etli*? Para esto, determinamos la respuesta de calcio intracelular y extracelular en *P. vulgaris*, una leguminosa que forma nódulos determinados, en presencia y en ausencia de los FNs de *R. etli* a tiempos cortos. Utilizamos colorantes sensibles a calcio como fura-2 (dextranizado con un peso de 70 kD). Este fluoróforo

microinyectado en pelos radiculares vivos de frijol nos permitió realizar el estudio de calcio intracelular y mediante el uso de microelectrodos específico para el Ca^{2+} extracelular. En este trabajo, muestro los resultados que describen un incremento del Ca^{2+} citosólico en el ápice del pelo radicular 5 minutos después de exponerlos a los FNs al igual que cambios en los influjos de calcio extracelular. Tanto los datos obtenidos de calcio intracelular como los extracelulares son complementarios y nos permiten considerar al Ca^{2+} como un elemento clave en los primeros eventos de la interacción simbiótica, pudiendo además jugar un papel muy importante en la modulación del citoesqueleto.

3.0 METODOLOGIA

3.1 Material biológico

Las semillas de *Phaseolus vulgaris* cv Negro Jamapa se esterilizaron externamente con hipoclorito de sodio al-20% (v:v) durante 5 min y posteriormente se embebieron en etanol absoluto por 1 min, seguido de 5 lavados para remover los residuos de hipoclorito y etanol. Las semillas esterilizadas se germinaron asépticamente en cajas petri conteniendo papel filtro humedecido con 2.5 mM de CaCl₂ y buffer MES 2.5 mM para asegurar la germinación. Para la obtención de pelos radiculares para microinyección, las semillas esterilizadas se germinaron en agar-agua al 0.8 % para la obtención de plántulas que sirvieron además para evaluar la actividad biológica de los FNs.

3.2 Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento

Rhizobium etli, cepa CE3 (Vázquez et al., 1991) y *Rhizobium loti*, cepa E1R se crecieron en medio TY (que contiene 16 g de bacto-triptona, 10g de bacto-extracto de levadura, y 5 g de NaCl por litro). Las cepas sobreproductoras de FNs se construyeron al introducir genes *nodD*'s de diferentes especies rhizobianas por cruza triparentales y usando el pRK2013 como plásmido ayudador (Ditta et al., 1980). El plásmido pMP280 (*nodD* de *R. l. bv. viciae*) y pMP604 (que contiene un *nodD* híbrido que confiere la capacidad de inducir la transcripción en ausencia de flavonoide) están descritos en la literatura (López-Lara et al., 1995). Las células que se usaron para la identificación y purificación de los FNs se crecieron a 30 °C, a una densidad OD_{600 nm} de 0.5-0.6 en medio líquido B⁻ (Spaink et al., 1987). Usamos la naringenina en el medio de cultivo como inductor de la activación de los genes *nod* a una concentración final de 1.5 μM. Las cepas que contienen el plásmido se crecieron en 10 μg/ml de tetraciclina.

3.3 Detección de los FNs por cromatografía en capa fina

Las bacterias se crecieron en medio B⁻ durante 24 h y se diluyeron a un valor de 0.1 de D. O. a 600 nm, inoculándolas en 1 ml de medio B⁻. Para inducir la síntesis de los factores de nodulación, se adicionó 1.5 μM de naringenina, añadiendo además 0.5 μCi de *D*-[1-¹⁴C]-glucosamina hidrocloreada (50 μCi/mmol, Amersham) o 0.1 μCi de *L*-[metil-¹⁴C]-metionina (55 μCi/mmol, Amersham). Los cultivos se incubaron a 30°C durante toda la noche. La extracción de los metabolitos Nod se realizó con *n*-butanol saturado con agua, como lo describe Spaink *et al.* (1992). Esto consiste en centrifugar el medio de cultivo y el sobrenadante que resulta se separa de la pastilla

celular. El sobrenadante ahora se le adiciona medio volumen de *n*-butanol saturado con agua para extraer los FNs secretados al medio. Esto se mezcló y se dejó reposar para separar la fase butanólica que contiene los FNs de la fase acuosa. El butanol se concentró a sequedad por evaporación y las muestras secas se resuspendieron en 20 μ l de *n*-butanol. Las muestras se almacenaron a 4°C y se separaron mediante cromatografía en capa fina (TLC) como describe Spaink *et al.* (1992) aplicando 3 μ l de cada muestra. Se utilizaron placas de sílica C18 de fase reversa (ODS: 100% octadecyl silanization) (Sigma). Las placas se corrieron usando una cámara saturada con acetonitrilo/agua (1:1, v/v).

La identificación de los FNs marcados radioactivamente, se realizó exponiendo las placas de 24-72 h con pantallas hipersensibles para equipo de *Molecular Dynamics PhosphorImager* y se analizaron en computadora con *software Image Quant*. Las imágenes fueron procesadas con el *software image 1* para su edición.

3.4 Purificación de los FNs mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Para la purificación de los FNs, se crecieron cultivos en medio B⁻ con agitación a 28°C hasta una absorbancia de 0.5-0.6 a 600 nm. Esto se observa muy claramente por el color nacarado del medio de cultivo. Posteriormente, los cultivos se agitaron durante 12 h junto con 400 ml de *n*-butanol por cada litro de cultivo. La fase butanólica se colectó y se secó en un rotavapor haciendo vacío y manteniendo la muestra a 58 °C. Los FNs se resuspendieron en una solución de acetonitrilo al 60% toda la noche y posteriormente se diluyó hasta quedar al 45 %. Esta mezcla se prepurificó haciéndola pasar por una columna de octadecil (J. T. Baker) y se eluyó con 1 ml de acetonitrilo al 45% para lavar el material no adherido a la columna. Posteriormente se eluyó con concentraciones crecientes de acetonitrilo al 50, 60 y 80 %. Estas muestras prepurificadas se pasaron por HPLC usando una columna Pharmacia Super Pac Pep-S (5 mm, 4 mm x 250 mm) con el siguiente protocolo: (1) 5 min de elución isocrática con acetonitrilo al 20%, (2) 30 min de elución isocrática con acetonitrilo al 30%, (3) 30 min de elución isocrática con acetonitrilo al 40%, (4) 15 min de elución isocrática con acetonitrilo al 60%, y (5) un gradiente lineal durante 10 min de acetonitrilo 60-100%. La elución por HPLC se realizó con un flujo de 0.7 ml/min y se detectó a 206 nm haciendo un barrido de longitudes de onda con un detector de arreglo de diodos. Los FNs eluyeron en su mayoría al 60%, por lo

que posteriormente se utilizaron estas eluciones para la purificación de estos metabolitos.

La purificación a gran escala se realizó después de tener estandarizados los tiempos de retención. Para esto sólo bastó leer a 206 nm y considerar el tiempo al cual deban eluir sin ningún problema de variación. Los diferentes picos purificados correspondientes a los FNs se colectaron y el solvente se evaporó en su totalidad. El material resultante se resuspendió en acetonitrilo/agua a la misma concentración que eluyeron y en un volumen que asegurará que su concentración es apreciable. Estas muestras se analizaron por espectrometría de masas en la Universidad de Utrech, Holanda, en colaboración con la Dra. J. E. Thomas-Oates.

La obtención de extractos butanólicos crudos se realizó extrayendo con butanol el medio de cultivo. Este proceso no considera la fase de prepurificación con columna J.T. Baker ni purificación por HPLC. Los extractos butanólicos se concentraron a sequedad en un rotavapor, se resuspendieron en dimetilsulfóxido (DMSO) o [(3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane-sulfonate)] (CHAPS) y se usaron para determinar su actividad biológica en la planta.

3.5 Análisis de los FNs por espectrometría de masas

Los FNs purificados fueron analizados en colaboración con Jane Thomas Oates de la Universidad de Utrech, Holanda. El método utilizado es el mismo publicado por Spaink et al. (1991).

Los espectros de masas FAM (Fast Atom Bombardment) se obtuvieron en el modo de iones positivos en un espectrómetro de masas en tandem JEOL JMS-SX/SX102A usando un voltaje de aceleración de 10 Kv. El disparador FAB se operó a 6 kV con una corriente de emisión de 19 mA 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 microlitros de nuestra muestra se cargaron en solución de tioglicerol.

3.6 Actividad biológica

Las semillas esterilizadas se germinaron asépticamente en placas de agar (0.8%) a 28°C hasta obtener raíces de 1.5-2.5 cm de longitud, las cuales se colocaron en un alambre enroscado en un tubo de cultivo de 20 cm x 2.5 cm con 25 ml de medio

Fåhraeus. Las raíces se protegieron de la luz cubriendo las bases de los tubos con papel aluminio, evitando así la entrada de luz. Posteriormente las plantas se crecieron a 28°C en cámaras de crecimiento bajo condiciones controladas de temperatura, fotoperíodo y humedad.

Con la finalidad de estandarizar la técnica de los bioensayos se utilizaron extractos butanólicos crudos de las cepas CE3, CE3280 (*nodD* de *R. l. bv. viciae*) y CIAT899, los cuales se obtuvieron induciendo a las cepas con naringenina. Los extractos se concentraron a sequedad y se resuspendieron en CHAPS, DMSO y metanol. Las plántulas de *P. vulgaris* se inocularon haciendo diluciones en serie de 1, 2, 3, 4 y 5 l de extractos (el equivalente de 1 ml de cultivo en 25 ml de medio Fåhraeus se considera como una concentración 10⁻⁶), así como 10, 20, 30, 40 y 50 l de cultivos bacterianos de CE3 y CIAT899 como controles. Los FNs obtenidos después de la purificación por HPLC también se ensayaron y específicamente se usaron las fracciones 38-46 (pico a, Fig. 7). Nuevamente el equivalente a 1 ml de cultivo se usó para inocular cada planta. Los FNs se aplicaron 1 cm por arriba de la zona de emergencia de los pelos radiculares y aunque se aplican *in situ*, este método no evita la difusión hacia otros lugares del sistema radicular. Para cada ensayo se usaron lotes de 9 plantas por tratamiento; de los cuales se sacaron 3 plantas a 5, 10 y 21 días, respectivamente.

3.7 Tinción y observación de meristemas

Las raíces se clarificaron de acuerdo al método descrito por Truchet *et al.* (1989); este “método de clarificación” tiene la ventaja de ser rápido y no tóxico, y permite observar el material sin disectarlo. Durante 20 min, los sistemas radiculares enteros, incluyendo los sitios de inoculación, se blanquearon en una solución de hipoclorito de sodio al 25% (v:v), y después se tiñeron por 5 min con una solución de azul de metileno al 0.01%. Cuando fue necesario, las raíces se destiñeron en una solución de etanol al 20% por 1 h. La frecuencia de primordios se monitoreó bajo un microscopio usando objetivos de 30x y 40x.

3.8 Preparación del material biológico para microinyección

Las plántulas de dos días de germinación se adaptaron durante 8 h en medio líquido conteniendo 0.05 mM CaCl₂, 2.5 mM MES (pH 6.2); después de este tiempo las raíces se adaptaron perfectamente y los pelos radiculares crecieron rápidamente (0.2 µm por minuto). Las plántulas con pelos radiculares en crecimiento se montaron en

una cámara construida con dos portaobjetos y unidos por un cubreobjetos. Después de colocar la plántula en esta cámara y llenada con medio líquido, se observaron bajo el microscopio (Diaphot 300, Nikon) con un lente de inmersión en agua 40X, N.A 0.75 (Zeiss, Germany). Ningún pegamento o grasa se usó para sujetar las raíces, y el medio líquido de la cámara se reemplazó cada 15 min para mantener las mismas condiciones.

3.9 Medición de la velocidad de flujo citoplasmático y crecimiento

Las células se observaron al microscopio usando un objetivo 40X de inmersión en agua y por microscopía de contraste diferencial de fases (DIC). Para cada punto, se tomaron 50 imágenes cada segundo a intervalos de 1 seg. Las imágenes se adquirieron con una cámara de CCD enfriada (Photometrics) de 12 bit y controlada por un *software PMIS*. Para este experimento se tomaron secuencias de imágenes antes de la aplicación de los FNs y se consideraron como controles. Posteriormente se adicionaron los FNs y nuevamente se tomaron secuencias de imágenes inmediatamente. Las secuencias se adquirieron cada 2 min y se almacenaron en un formato TIFF de 8 bit. Los primeros 4 segundos de cada secuencia se utilizaron para el procesamiento. Se seleccionaron tres imágenes separadas por 2 segundos en el tiempo de adquisición y se procesaron usando un procesador de imágenes *NIH image*. Las imágenes se sobrepusieron y las partículas en movimiento dentro del citoplasma se analizaron en las tres imágenes. Usando el cursor de la computadora, las partículas se marcaron con un punto negro en las tres imágenes sobrepuestas. Las imágenes se filtraron al punto que únicamente quedaron los puntos negros sobre un fondo blanco. La segunda imagen en secuencia se eliminó y únicamente nos quedamos con la inicial y la final por lo que de esta forma grabamos la posición del punto usando una función de movimiento de partícula. La posición de las coordenadas se exportaron como datos no procesados al programa *excel (microsoft)* donde las distancias entre la posición de un mismo punto se determinó por la fórmula: $\text{distancia} = \sqrt{(X_1 - X_2)^2 + (Y_1 - Y_2)^2}$. La velocidad del flujo citoplasmático se calculó dividiendo la distancia entre 4 seg, que corresponde al tiempo transcurrido entre las dos imágenes utilizadas finalmente. Las mediciones se hicieron dos veces en la misma célula, por dos personas diferentes y sin ningún conocimiento del tiempo entre las imágenes que se estaban procesando.

La medición de la velocidad de crecimiento del pelo radicular fue más sencilla. Se tomaron imágenes cada minuto durante una hora y las imágenes

adquiridas se procesaron utilizando un software *Image-1* que nos permitió seguir cada pixel de diferencia entre una imagen y otra. Se calibraron los pixeles por lo que sabiendo la correspondencia de cada pixel en micrómetros la determinación de la longitud crecida por unidad de tiempo se resolvió sin ningún problema.

3.10 Incubación de pelos radiculares con FNs

Los FNs de *R. etli* se purificaron por HPLC como se describió anteriormente (Cárdenas et al., 1995), y se resuspendieron en 1% (w/v) de un detergente zwiteriónico no desnaturalizante CHAPS [(3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane-sulfonate)]. Se diluyeron a una concentración final de 0.01% conteniendo los FNs a una concentración de 10^{-8} M. Contrario a lo que se ha reportado en alfalfa, en donde los FNs se han usado a una concentración de 10^{-10} M (Ehrhardt et al., 1996), los frijoles requieren concentraciones de FNs más altas, del orden de 10^{-5} , 10^{-6} , y 10^{-7} M para inducir estructura tipo nódulos (Cárdenas et al., 1995; Martínez et al., 1993, 1995). Antes de su aplicación, los FNs se mezclaron cuidadosamente con 0.5 ml de 2 mM CaCl_2 , 2.5 mM MES (pH 6.2) y posteriormente se adicionaron lentamente a los pelos radiculares vivos para reemplazar al medio sin FNs. Como control, se usaron oligómeros de quitina: penta-*N*-acetilquitopentaosa (Seikagaku America, Inc. Japan) a una concentración final de 10^{-7} M, disuelta en CHAPS, bajo las mismas condiciones que los FNs.

3.11 Microinyección de indicadores fluorescentes

Las microagujas se prepararon en un jalador de capilares filamentosos (Kopf model 700D, David Kopf Instruments, CA). La faloidina fluoresceinada (Molecular Probes, Eugene, OR), se preparó como un solución concentrada a 20 μM en metanol y el fura-2 a 5 μM en agua. Antes de su uso, se sonicaron y centrifugaron a 5,000X g para eliminar cualquier agregado formado. Las microagujas se llenaron por su parte posterior con 1 μl de faloidina fluoresceinada, que es el colorante indicador de microfilamentos el cual se microinyectó por presión a los pelos radiculares. Las células microinyectadas se observaron por microscopía confocal. El fura-2 se microinyectó bajo las mismas condiciones para cuantificar el calcio intracelular. Los pelos radiculares vivos y saludables se seleccionaron por su fuerte flujo citoplasmático y crecimiento apical antes de ser microinyectados con faloidina o fura-2. Las microinyecciones se llevaron a cabo en las partes laterales del pelo radicular pero nunca en el ápice (la parte más sensible del pelo radicular). Para hacer posible las microinyecciones, se usó el sistema de dos agujas, perfeccionado durante

el desarrollo de este trabajo. Los pelos se exponen a los FNs, antes de ser microinyectados, lo cual nos asegura el tomar tiempos predeterminados a los que queremos analizar la organización del citoesqueleto.

El sistema de dos agujas consiste en el uso de una aguja roma adicional la cual se coloca en dirección opuesta al sentido de la microinyección, y que sirve para sostener el pelo radicular mientras se microinyecta. Dado que la vacuola ocupa un 90 % del volumen celular y para evitar microinyectar en este organelo, las microagujas se introdujeron lentamente en las regiones con más citoplasma entre la membrana celular y la vacuola.

3.12 Cuantificación de Ca^{2+} intracelular

El fura-2 (70 kD, Molecular Probes, Eugene, OR) se depositó dentro del citosol en la misma forma que la faloidina. En tubos polínicos se sabe que la microinyección por presión introduce alrededor del 1% del volumen celular (Holdaway-Clarke et al., 1997). Esto nos permite calcular una concentración de fura-2 en el citosol de alrededor de 2.5 a 5 μM . Las imágenes se obtuvieron con una cámara de CCD (chip cooled devise, Photometrics, Tucson, AZ), como detector fluorescente y enfriada termoeléctricamente (ver Pierson et al., 1994, 1996). La cámara se encuentra acoplada a un microscopio de fluorescencia invertido (Nikon Diaphot 300) con una lámpara de vapor de Hg como fuente de luz. Las longitudes de onda utilizadas para la excitación son de 340 nm (dependiente de calcio) y 360 nm (independiente de calcio). La razón de las imágenes se calcularon a partir de la substracción del fondo (imagen tomada 340:360 nm, a 60 μm alejado de la célula microinyectada) a la imagen obtenida de la célula microinyectada también excitada a 340:360 nm (ver figura M01), y posteriormente aplicando la formula:

$$\text{Imagen R} = \text{Imagen B} \times 100 / \text{Imagen A.}$$

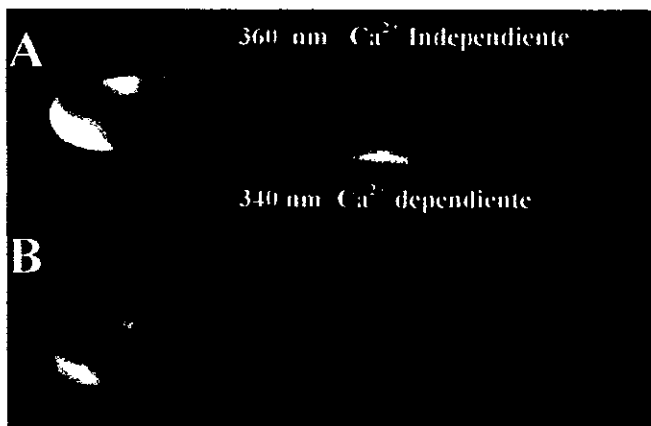


Figura M01. Pelo radicular con el colorante microinyectado en el citoplasma y fotografiados con la cámara de CCD. La imagen A fue tomada excitando el colorante a 360 nm (calcio independiente) y la imagen B a 340 nm (calcio dependiente).

Posteriormente se aplicó un número umbral de tal forma que las áreas que contenían poco colorante (determinado por la baja intensidad de píxeles a 360 nm) pudiéramos llevarlas al negro en la imagen final que se ha procesado. Esto se hace creando una imagen binaria (Imagen T) en la que los píxeles menores que el número umbral toman el valor de “0” y los que son mayores toman un valor de 1 y posteriormente se aplica la fórmula:

$$\text{Imagen T} \times \text{Imagen R} = \text{Imagen F}$$

Esto nos permite generar una imagen más limpia y clara. El programa PMIS nos permite adquirir el par de imagen a 340:360 con la cámara de CCD cada 3 a 5 segundos y grabar el tiempo exacto al cual cada par se tomó.

3.13 Cuantificación de Ca^{2+} extracelular

Los flujos de Ca^{2+} extracelular en pelos radiculares de frijol se midieron en pelos creciendo y pelos que ya no presentaban crecimiento con un sistema no invasivo. Este sistema consiste de microelectrodos ion específico que vibran en dos direcciones, en la proximidad del ápice externo y 40 micrómetros aparte. Para esto, los pelos radiculares se mantienen en medio líquido y fijos a una caja Petri. La caja Petri en su región inferior se perfora y se le pega un cubreobjetos lo cual facilita su observación al microscopio, ya que en las raíces con los pelos se colocan exactamente sobre esta región. Los pelos radiculares se crecieron en presencia de los oligómeros de quitina como control (estos oligómeros constituyen una presentación de los factores pero inactivos) y en presencia de los FNs. Los pelos radiculares se mapearon a todo lo largo del pelo, desde el ápice hasta la base para monitorear todas las regiones posibles de flujos de Ca^{2+} . El electrodo se sitúa aproximadamente a 1-2 μM de la región apical y se posiciona nuevamente cada vez que el pelo cambie su posición, como resultado del crecimiento o cuando se adicionan los FNs.

3.14 Fabricación de electrodos

Se sabe que la limpieza en la fabricación y manejo de los electrodos es crucial para su buen funcionamiento y larga duración. Las manos se deben lavar cuidadosamente antes de tocar los capilares con los cuales se fabricaran los electrodos. Para manejar los electrodos siempre se recurrió a la ayuda de unas pinzas adecuadas. Los electrodos tipo *Bee stinger* (Smith et al., 1994) se jalaban en dos pasos hasta dejar un diámetro apical de 2 μm . Después de haber sido jalados, los electrodos se hornearon por una hora a 250 °C y después se silanizaron en vapores de 50 μl de N,N-Dimethylsilane bajo una campana, también a 250 °C por 10 min y posteriormente

horneados en el mismo lugar por muchas horas pero ahora en ausencia de los vapores silanizadores. Los electrodos resultantes, se almacenaron hasta antes de su uso en un recipiente bajo desecación.

Los electrodos en el momento de su uso se llenaron por su parte trasera con el electrolito apropiado, generalmente con 100 mM del ion que se desea medir y en su parte frontal, se lleno por capilaridad con el LIX (por sus siglas en ingles, Liquid Ion Exchange) obtenida de Fluka y WPI.

3.15 Adquisición y procesamiento de resultados

El programa utilizado por el sistema de computo se llama 3DVIS y es una modificación del software original para coleccionar los datos y controlar el movimiento de el electrodo, *DVIS* version 1 and 2, fue diseñado por Wiel Kühtreiber en Microsoft *QuickBasic*. *DVIS* version 1-6, diseñado por Richard, H. Sanger haciendo modificaciones al original. En este trabajo hemos utilizado una versión modificada de la version 6 de acuerdo a las necesidades del trabajo y lo denominamos *3DVIS*. Esta nueva modificación hace el programa más fácil de usar, además de que ciertas aplicaciones las hace automáticamente haciendo la adquisición y procesamiento de la información más fácil para el usuario.

La primera aplicación automática consiste en que el programa considera un tamaño de muestra a promediar definida. En las primeras versiones estos parámetros eran seleccionados por el usuario y se mostraban en la misma forma en que se coleccionaban. Actualmente, se denominan promedios de corridas (running averages) al promedio de los componentes o datos adquiridos por el electrodo a cada lado de un ciclo de oscilación. Generalmente se descartan tres valores a cada extremo de la oscilación (Blanking numbers), estos números son promedios discretos que se ignoran en tanto que el electrodo se mueve al extremo opuesto y se posiciona en su extremo correcto con un voltaje estable. El número mínimo promedio durante la corrida en este caso es, entonces $2(10-bn)=14$. De este modo el siguiente número promedio útil es 28 y así sucesivamente. Si se usa cualquier otro número para la progresión de los tamaños de la muestra, los resultados incrementan el ruido o error.

	←	un ciclo	⇒		
<	+	> <	-	>	
0001111111		0001111111			0=Número ignorado 1=valor considerado.

La segunda aplicación modificada y que hace las cosas automáticamente, consiste en el momento de adquirir y grabar los datos en un archivo. Los únicos datos importantes lo constituyen los promedios de corridas. Sin embargo la velocidad de obtención de los datos puede instalarse independientemente del tamaño de la muestra a promediar. Esto permite al usuario adquirir los datos más rápidos de un ciclo promedio de corrida, creando resultados adicionales que se pueden relacionar estadísticamente puesto que contienen los mismos valores no procesados. En el nuevo *software* para asegurar que los datos adquiridos son estadísticamente independientes, la velocidad de adquisición se ha colocado a un promedio por ciclo de corrida.

3.16 Determinación del tamaño del área de influjo

El método para determinar el área de una fuente de corriente se hizo como se describe en Kunkel and Bowdan, 1989. En general, la corriente a una distancia k de un disco que constituye la fuente uniforme con un radio “ a ” está dada por la ecuación:

$$I_k = 2 \pi I r (1 - [k/\sqrt{k^2+a^2}])$$

donde I_k = es la corriente a una distancia k perpendicular al centro del disco.

$$\pi = 3.1427$$

k = la distancia del disco

a = El radio del disco

$I r$ = la densidad de corriente de el disco de un radio r .

La corriente I_k se observa experimentalmente a varios valores de k . Lo que se hace es fijar la ecuación a los datos variando los dos parámetros $I r$ y a , para estimar la densidad de la corriente al radio de la fuente.

Las curvas estándares se han descrito previamente (Smith et al., 1994) y están basadas en datos tomados a intervalos espaciados del origen de la fuente. Esto pone mucho más peso en las mediciones a distancia que contienen un mínimo de información. El nuevo enfoque usa pequeños intervalos de $2 \mu\text{m}$, lo suficientemente cerca de la fuente, y duplica los espacios después de cada paso de alejamiento.

Además de todos los cambios en las estrategias descritas anteriormente en la colección de datos, el control del movimiento del electrodo y la colección de datos se revisaron para permitir el arreglo y adquisición de datos tridimensionales de manera automática.

3.17 Estimación del flujo iónico

El objetivo de la calibración de los electrodos ion específico es poder medir cuidadosamente los flujos locales de iones alrededor de una fuente del ion o influjos sobre la superficie de una célula o tejido. Esto se hace tomando la diferencia de μV medido con un electrodo calibrado en dos posiciones. Esto se obtiene al determinar la diferencia de concentración medida sobre la distancia de excursión. Entonces se aplica el log de la concentración contra la ecuación de calibración SmV para calcular la concentración del ion en los dos extremos de la oscilación.

$$C_b = C(\text{SmV}_b) = 10^{(a+S \cdot \text{SmV}_b)}$$

De este modo la diferencia de la concentración, DC/Dr se obtiene al usar la diferencia entre dos aplicaciones de la ecuación anterior en la siguiente

$$DC/Dr = (C(\text{mV} + \mu\text{V}^*) - C(\text{mV}))/Dr$$

donde los μV son los valores corregidos que se obtienen al dividir la diferencia de éstos por la eficiencia estimada del electrodo (nosotros estamos considerando una eficiencia media de alrededor de 50%). De esta forma para la combinación del coeficiente de difusión, D , por el ion de interés (Hille, 1984), se aplica a la siguiente ecuación para el flujo observado, J_o .

$$J_o = -D \cdot DC/Dr$$

el flujo esperado, J_e , se obtiene al derivar la concentración empírica de la curva

$$C_{xyz} = C_b + K/(r_{xyz} + r_o)$$

con respecto al radio, r

$$J_e = -D K/r^2$$

4.0 RESULTADOS I

Purificación de los factores Nod

4.0 RESULTADOS I

4.1 Identificación, sobreproducción y purificación de los FNs

La identificación de los FNs se llevó a cabo incorporando glucosamina o metionina como precursores radioactivos y posteriormente fueron analizados por cromatografía en capa fina (TLC), de acuerdo a como se describe en métodos. En presencia de naringenina, las cepas de *R. etli* producen los respectivos metabolitos marcados que pueden ser fácilmente extraídos con butanol y analizados por TLC (Figura 6). Cuando se marca con glucosamina como precursor radioactivo, los FNs producidos también se inducen aun en ausencia de naringenina aunque la producción de éstos es mínima (Figura 6 carriles “-”).

Con la finalidad de purificar suficientes FNs, construimos una serie de cepas sobreproductoras de dichos metabolitos para lo cual introdujimos copias adicionales de *nodD* (los activadores transcripcionales de los genes *nod*). La cepa que más FNs produjo fue la que se obtuvo cuando introdujimos el *nodD* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Figura 6 A “283”; B “280”), por lo cual, ésta cepa fue seleccionada para la purificación a gran escala. Para extraer los metabolitos Nod del medio de cultivo, se hizo una extracción con butanol (extractos crudos) el cual se prepurificó a través de una columna Baker (con una cola de 18 carbonos) antes de purificarse por HPLC. Esta prepurificación nos permitió tener muestras más limpias y separaciones más definidas en el HPLC. En los cromatogramas de HPLC, se puede observar un pico de elución a los 15 min que corresponde a la naringenina. Los FNs eluyen en dos picos, el pico I que corresponde a la fracción 38-45 que se observa muy claramente en la figura 7 A y B con la letra “a” y el pico II, que corresponde a la fracción menor 48-49 se muestran también en la figura 7 A y B con la letra “b”. Estos picos de elución se detectan a los 40 y 45 min, respectivamente. Las fracciones colectadas de los picos a y b se secaron y resuspendieron en 1 ml de acetonitrilo al 25 %, este material se utilizó para los estudios posteriores. Es interesante mencionar que en los extractos obtenidos en ausencia de inductor, se detectaron picos que absorben a la misma longitud de onda que los FNs. Por espectrometría de masas sabemos que éstos corresponden a la fracción “a” de los extractos inducidos con naringenina (ver apéndice, artículo correspondiente, Figura 3). Estos resultados corroboran lo encontrado en los ensayos de marcaje con glucosamina radioactiva. En estos experimentos encontramos que *R. etli* es capaz de producir los FNs en ausencia de

inductor, aunque ciertamente en cantidades muy pequeñas (Figura 6, panel A, carriles "-"), la figura C, D y E se discutirá en anexo I.

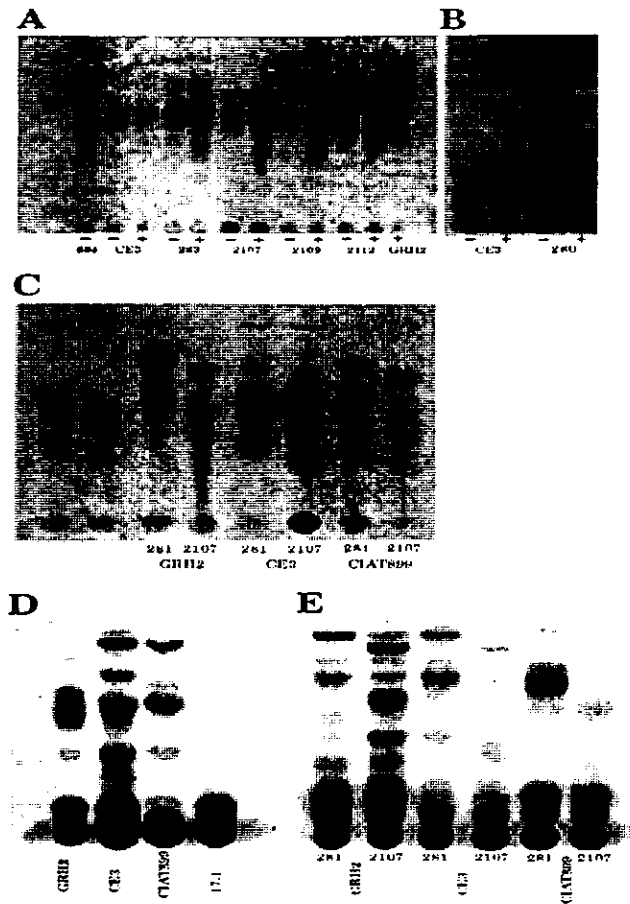


Figura 6. Cromatografías en capa fina de los metabolitos Nod producidos por *R. etli*. A y C, marcados con *N*-acetil glucosamina. Los paneles B, D y E, marcados con metil metionina. 604, *nodD* FITA; CE3, es una cepa de *Rhizobium etli*; 283, es un *nodD* de *R. leg. bv. trifolii* en un plásmido de incompatibilidad P; 2107, es el *nodD* y *L* de *R. leguminosarum* *bv. viciae* en un plásmido de incompatibilidad P; 2109, es el *nodD* y *L* de *R. leg. bv. viciae* en un plásmido de incompatibilidad W; 2112, es el *nodD* de *R. leg. bv. trifolii* en un plásmido de incompatibilidad W; GRH2, es una cepa de referencia; CIAT899, es una cepa de *R. tropici*; 17.1 es una mutación en *nodS* dentro de un cósmido que lleva los genes de nodulación. En A y B cada uno de los plásmidos descritos se encuentran en el fondo de la CE3. En C, D y E se indica en la parte inferior la cepa receptora de los plásmidos.

4.2 Determinación estructural de los FNs

Los resultados obtenidos en los espectros de masas en los que la disociación es inducida por colisión, en este caso por nitrógeno, se resumen en la figura 8. Estos FNs de *R. etli* son pentasacáridos que consisten de una *N*-acil-*D*-glucosamina y cuatro unidades de *N*-acetil-*D*-glucosamina. Los componentes mayoritarios están

sustituidos con un grupo carbamilo en la posición C4 y un grupo metilo en el grupo amino, todo esto en el extremo no reductor, y una acetil fucosa en la posición C6 del extremo reductor. La posición del grupo acetilo en la fucosa no se pudo determinar por espectrometría de masas debido a que las cantidades analizadas no fueron suficientes. El ácido graso presente en el extremo no reductor es vaccénico (C18:1) o ácido esteárico (C18:0).

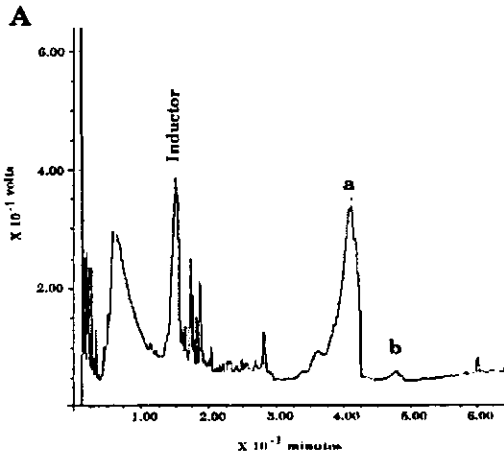
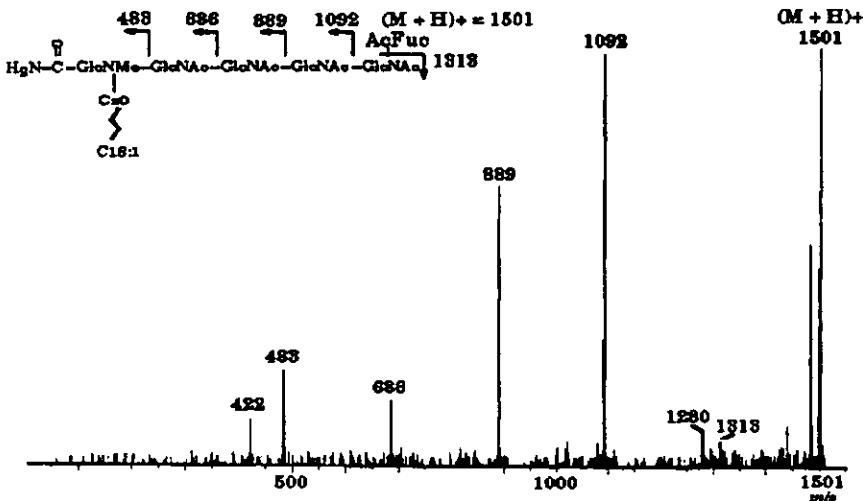


Figura 7. Cromatograma de HPLC de los factores Nod de *R. etli* inducidos y la correspondiente cromatografía en capa fina. A, muestra los dos picos de elución de HPLC producidos por *R. etli* (a y b) y que corresponden a los factores Nod. B, muestra los picos correspondientes vistos en cromatografía en capa fina. La letra "a" indica los componentes mayoritarios y "b" los minoritarios. La zona de elución del inductor se indica en A.



Figura 8. Espectro de masas del factor de nodulación de *R. etli*. En la parte superior se muestra la ubicación molecular para cada uno de los componentes.



Los resultados de espectrometría de masas nos muestra que el pico “a” es una mezcla de compuestos. Esto deriva de las observaciones de la banda “a” en TLC y el correspondiente pico “a” en HPLC, los cuales son lo suficientemente grande como para ser un solo componente (Figura 7 A y B, ver “a”).

4.3 Experimentos de nodulación en plantas de *Lotus*

Debido a la aparente identidad estructural de los FNs descritos en este trabajo con los identificados en *R. loti* (López-Lara et al., 1995), hemos aprovechado el sistema para analizar si *R. etli* es capaz de nodular las plantas de *Lotus*. Los resultados se muestran en la tabla 1. Estos datos indican que *R. etli*, no es capaz de inducir nódulos o estructura tipo nódulos en plantas de *Lotus corniculatus*, y *L. caucasicus*. Sin embargo, como se observa en la figura 9, una cepa derivada de *R. Etli* que contiene el plásmido pMP604 es capaz de inducir nódulos en estas especies de *Lotus*. El plásmido pMP604 lleva un gen *nodD* cuya particularidad es la de conferir la capacidad de inducir la transcripción de los genes *nod* en ausencia de inductor (fenotipo FITA). Esto parece indicar que existe una barrera de especificidad para *R. etli* que le impide en condiciones naturales reconocer los flavonoides secretados por estas especies de *Lotus*. *R. loti* por otro lado con el pMP604 puede nodular frijol tan eficientemente como *R. etli*.

Cepa bacteriana	Especie de planta			
	<i>L. corniculatus</i>	<i>L. presli</i>	<i>L. caucasicus</i>	<i>P. vulgaris</i>
<i>R. etli</i> CE3	0	100	0	100
<i>R. etli</i> pMp604	10	100	20	100
<i>R. loti</i> E1R	100	100	90	0
<i>R. loti</i> E1RpMP604	nt	nt	nt	100

Figura 9. Frecuencia de nodulación de *Lotus* y *Phaseolus* por *R. etli*. El porcentaje de las plantas noduladas se contaron 19 días después de la inoculación. Para las especies de *Lotus*, se usaron 10 plantas para cada experimento. Para *P. vulgaris*, se usaron 4 plantas para cada uno de los experimentos.

Los resultados antes descritos nos permiten proponer que la incapacidad de reconocer los inductores, constituye la barrera principal para que las especies de *R. loti* puedan nodular frijol y las de *R. etli* puedan nodular especies de *Lotus*. Este fenómeno se describe esquemáticamente en la figura 10.

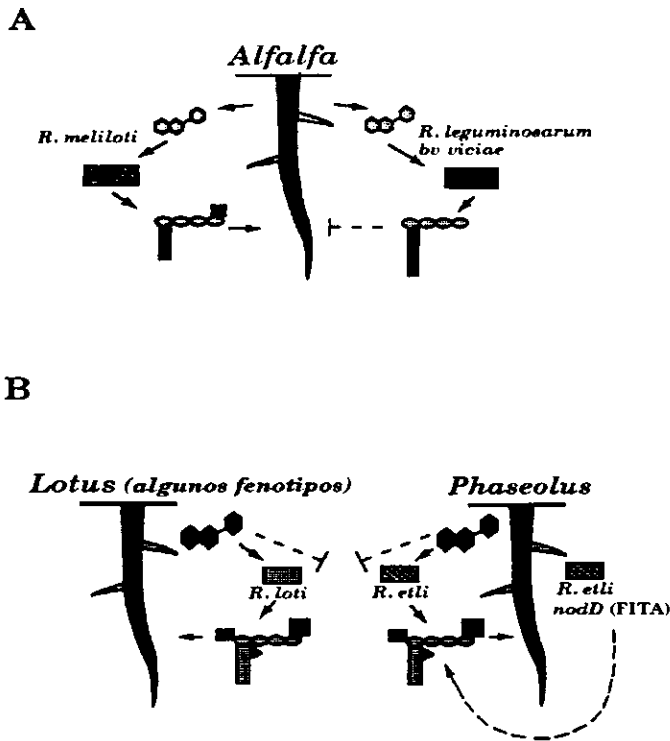


Figura 10. Modelo de intercambio de señales. En A, se observa el modelo general por el cual se da la interacción exitosa entre *R. meliloti* con su huésped y como *R. leg. bv. viciae* es incapaz de interaccionar con este huésped. En B, se describe la incapacidad de una inoculación cruzada entre *R. etli* y *R. loti* con sus correspondientes huéspedes. Sin embargo, al introducir un *nodD* FITA en *R. etli*, se adquiere la capacidad de infectar *Lotus* al igual que *R. loti* con el *nodD* FITA puede ser capaz de infectar frijol.

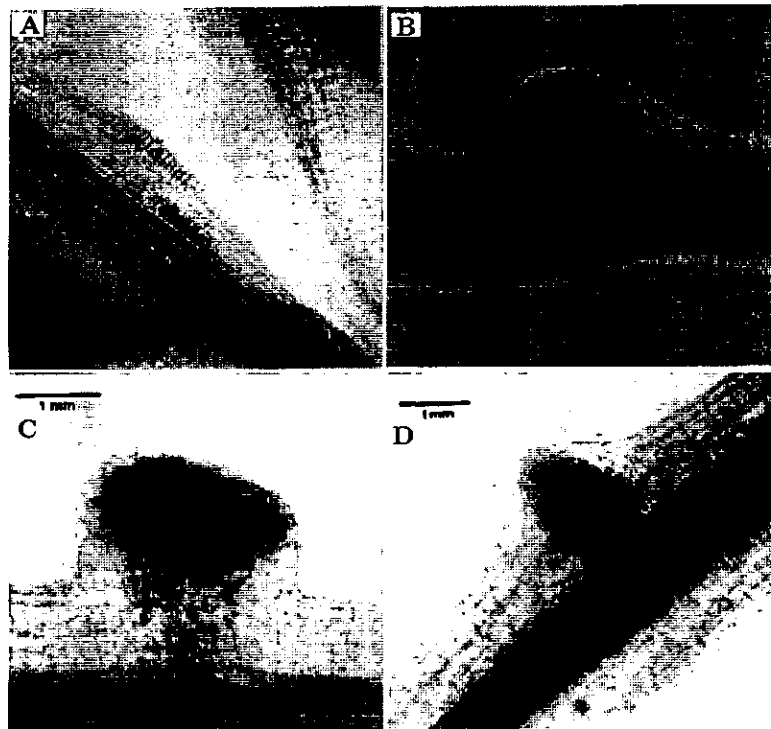
4.4 Actividad biológica: Inducción de primordios

En los ensayos de actividad biológica con los factores de nodulación y extractos butanólicos crudos se observó la capacidad de los FNs para inducir la división de las células meristemáticas, y primordios. Normalmente observamos primordios de nódulo a partir del 4^o día, cuando se usaron los extractos crudos (sin ningún paso de purificación por HPLC) o la bacteria y a partir del 5^o día para las plantas que se les agregó FNs purificados (Figura 11 A, B, C). No se encontraron primordios en raíces no inoculadas. Los FNs, inducen la formación de primordios sobre su huésped *Phaseolus vulgaris* a concentraciones de 10^{-6} - 10^{-8} M. Cuando se usan concentraciones más elevadas de FNs, es posible inducir estructuras tipo nódulos con haces vasculares en sus estados de desarrollo temprano (Figura 11 C), es decir, no totalmente desarrollados a juzgar, cuando comparamos con los haces vasculares de nódulos inducidos con la bacteria (datos no mostrados). En este estudio determinamos la concentración óptima para inducir la deformación de los pelos radiculares, encontrando que concentraciones de 10^{-8} M son adecuadas para inducir esta respuesta aunque no para inducir primordios. Cuando las concentraciones de

FNs se disminuyen obtenemos una disminución en la eficiencia de los pelos deformados.

Un promedio de 90 % de las raíces a las que se les adicionó la fracción que contenía los FNs o un extracto crudo (FNs sin ningún paso de purificación) dieron respuesta biológica. Esto es, la capacidad de inducir la formación de primordios, los cuales empiezan a formarse en la corteza externa (Figura 11 A). Cuando se aplicaron los FNs y los extractos crudos, 50 % de los primordios se indujeron aproximadamente en el sitio de la aplicación y el resto distribuidos a lo largo de la raíz. Los FNs son muy activos a bajas concentraciones (10^{-8} M), sin embargo, el pentámero de *N*-acetil glucosamina es incapaz de inducir una respuesta similar a la de los FNs.

Figura 11. Inducción de primordios nodulares en *Phaseolus vulgaris* en respuesta a los factores Nod purificados de *R. etli*. A, muestra el inicio de división celular en la corteza externa de raíces de frijol tratadas con factores Nod. B, un primordio bien desarrollado en la que se observa zonas de división tanto en la corteza externa como en la interna. C, muestra lo que conocemos como estructuras tipo nódulos, los inicios de formación de haces vasculares se pueden observar hacia la base del nódulo.



4.5 Publicación en Plant Molecular Biology

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

Isolation, chemical structures and biological activity of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium etli*

Luis Cárdenas¹, Jimena Domínguez¹, Carmen Quinto¹, Isabel M. López-Lara², Ben J. J. Lugtenberg², Herman P. Spaink^{2,*}, Geert Jan Rademaker³, Johan Haverkamp³ and Jane E. Thomas-Oates³

¹Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México; ²Institute of Molecular Plant Sciences, Leiden University, Wassenaarseweg 64, 2333 AL Leiden, The Netherlands (* author for correspondence); ³Department of Mass Spectrometry, Bijvoet Center for Biomolecular Research, Utrecht University, Sorbonnelaan 16, 3584 CA Utrecht, The Netherlands

Received 14 February 1995; accepted in revised form 9 June 1995

Key words: signal molecules, host specificity, nodulation, flavonoids, plant organogenesis, mass spectrometry

Abstract

Rhizobium etli is a microsymbiont of plants of the genus *Phaseolus*. Using mass spectrometry we have identified the lipo-chitin oligosaccharides (LCOs) that are produced by *R. etli* strain CE3. They are *N*-acetylglucosamine pentasaccharides of which the non-reducing residue is *N*-methylated and *N*-acylated with *cis*-vaccenic acid (C18:1) or stearic acid (C18:0) and carries a carbamoyl group at C4. The reducing residue is substituted at the C6 position with *O*-acetylucose. Analysis of their biological activity on the host plant *Phaseolus vulgaris* shows that these LCOs can elicit the formation of nodule primordia which develop to the stage where vascular bundles are formed. The formation of complete nodule structures, including an organized vascular tissue, is never observed. Considering the very close resemblance of the *R. etli* LCO structures to those of *R. loti* (I. M. López-Lara, J. D. J. van den Berg, J. E. Thomas Oates, J. Glushka, B. J. J. Lugtenberg, H. P. Spaink, Mol Microbiol 15: 627–638, 1995) we tested the ability of *R. etli* strains to nodulate various *Lotus* species and of *R. loti* to nodulate *P. vulgaris*. The results show that *R. etli* is indeed able to nodulate *Lotus* plants. However, several *Lotus* species are only nodulated when an additional flavonoid independent transcription activator (FITA) *nodD* gene is provided. *Phaseolus* plants can also be nodulated by *R. loti* bacteria, but only when the bacteria contain a FITA *nodD* gene. Apparently, the type of *nod* gene inducers secreted by the plants is the major basis for the separation of *Phaseolus* and *Lotus* into different cross inoculation groups.

Introduction

Soil bacteria of the genus *Rhizobium* are able to establish a symbiosis with specific leguminous plants by forming root nodules in which, after differentiation of the bacteria to bacteroids, at-

mospheric nitrogen is fixed. The shape and growth pattern of the nodule that is formed is determined by the plant. Determinate-type nodules develop from primordia in the outer cortex and indeterminate nodules develop from primordia in the inner cortex [7]. The specificities of various types

of rhizobia for host plants are very different. Some strains such as *Rhizobium* strain NGR234 [12] or strain GRH2 [14, accompanying paper] are able to nodulate a wide range of plant genera, whereas other strains, such as *R. etli*, only nodulate plant species belonging to a few genera (e.g. *Phaseolus*, a determinate nodule-forming plant) [19].

The *Rhizobium nod* (nodulation) genes, whose transcription is induced by flavonoids secreted by the plant, are involved in important stages of the nodule formation process and determine host specificity of the bacteria. These important roles of the *nod* genes are explained by the fact that they are required for the biosynthesis of lipo-chitin oligosaccharide (LCO) signal molecules. The LCO molecules from many rhizobial strains have been identified and they all appear to consist of an acylated chitin fragment which can contain strain-specific modifications [3, 9, 18, 20, 22]. Purified LCOs have been shown to induce several responses in the plant which are also induced by rhizobial infection. The responses that can be observed at the microscopic level include root hair deformation [10], root hair curling [17], formation of pre-infection threads [30], nodule primordia [2, 13, 24] and, in some cases, even complete nodule structures [25, 29].

In this paper we report our identification of the LCOs from *R. etli* strain CE3 and show that they are able to induce nodule primordia in the roots of the host plant *P. vulgaris*. Surprisingly, the structures of the LCOs are identical to those produced by various *R. loti* strains. We show that the barrier to nodulation of the non-host plant *Lotus* by *R. etli* is at the level of induction of the *nod* genes.

Materials and methods

Bacterial strains plasmids and growth conditions

R. etli strain CE3 [31] and *R. loti* strain E1R [13] were grown on TY medium (containing 16 g bacto-tryptone, 10 g bacto-yeast extract, and 5 g NaCl per litre). Strains overproducing *nod* metabolites were constructed by introducing *nodD* genes from

different rhizobial species, by means of triparental mating and using pRK2013 as helper plasmid [4]. The use of plasmids pMP280 (*nodD* of *R. loti* biovar. *viciae*) and pMP604 (containing a hybrid *nodD* which confers flavonoid independent transcription activation) has been described previously [13]. Cells to be used for detection and purification of Nod factors were grown at 30 °C to an OD₆₀₀ of 0.5–0.6 in liquid B⁻ medium [23]. Naringenin was added to the cultures when necessary for *nod* gene induction, to a final concentration of 1.5 μM. Strains containing plasmids were grown in the presence of 10 μg/ml tetracycline.

Detection of Nod metabolites using thin-layer chromatography (TLC) and high-performance liquid chromatography (HPLC)

Bacteria were grown for 22 h in B⁻ medium and then diluted to an OD₆₀₀ of 0.1. The cells were induced by the addition of naringenin and at the same time 0.5 μCi of *D*-[1-¹⁴C]-glucosamine (50 mCi/mmol, Amersham) or 0.1 μCi *L*-[methyl-¹⁴C]-methionine (55 mCi/mmol, Amersham) was added, and the culture was incubated at 29 °C for 18 h. Culture supernatants were extracted with a half volume of water-saturated *n*-butanol to yield a crude mixture of Nod metabolites. This fraction was evaporated to dryness, resuspended in 20 μl water-saturated *n*-butanol, and 1 μl of this solution was applied to octadecyl silica TLC plates (Sigma) as described [21]. Plates were developed in acetonitrile/water (1:1, v/v) and dried prior to detection of radiolabelled components using a Molecular Dynamics PhosphoImager equipped with Image Quant software. In order to obtain sufficient quantities of Nod metabolites for the structural determinations, cells were grown under the same conditions, but in the absence of radiolabelled glucosamine in 1 litre flasks. The culture supernatants were extracted with 0.2 volumes water-saturated *n*-butanol, and the extracts taken to dryness under vacuum. LCOs were redissolved in 20 ml 60 aqueous acetonitrile with vigorous shaking for 18 h, concentrated on an octadecyl

extraction column (J. T. Baker), and purified using reversed-phase HPLC, as described [13]. Quantities of the LCOs were estimated by comparison of HPLC peak intensities to a standard of the LCO NodRlv-V (C18;4, Ac) [24].

Bioassays

Seeds of *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa were surface-sterilized with absolute ethanol for 1 min, and then with 20% (v/v) hypochlorite solution for 5 min, followed by three water washes to remove residual hypochlorite. Sterilized seeds were germinated aseptically on agar plates (0.5%). The seedlings were mounted in a curled wire in a tube (20 cm × 3 cm) with the roots in 25 ml of Fåhræus medium [5]. The roots were inoculated at a point about 1 cm below the zone of emerging root hairs, with 1 µl of a solution containing a mixture of LCOs obtained after HPLC purification (the solution was prepared by pooling LCO-containing fractions 38–46 (peak I, Fig. 2), evaporating to dryness and redissolving in 1 ml 25% aqueous methanol). To each plant an amount of LCOs was added which is equivalent to that produced by 1 ml of naringenin-induced culture. The method of application of LCOs does not prevent their diffusion to other places of the root system. Roots were cleared for analysis according to the method of Truchet *et al.* [28]. Entire root systems, including inoculation sites, were bleached in 25% (v/v) hypochlorite solution for 20 min, and then stained in 0.01% methylene blue solution for 5 min and, when necessary, destained in 20% aqueous ethanol solution for 1 h. The frequency of nodule initiation was monitored under a stereoscopic microscope using magnifications of 30 × and 40 ×.

Chemical modifications of LCOs

Mild base de-esterification was carried out on 10% of peak I (Fig. 2), dried under vacuum, by redissolving the LCO in 250 µl of a 1:1 (v/v) mixture of 25% aqueous ammonia solution and methanol. The reaction was allowed to proceed at ambient temperature for 18 h when the volatile

reagents were removed under vacuum. The product was redissolved in 10 µl DMSO and 1 µl used for MS analysis. Peracetylation was carried out on 10% of peak I, which was dried under vacuum and then treated with 250 µl of a mixture (2:1, v/v) of trifluoroacetic anhydride and glacial acetic acid. The reaction proceeded for 20 min at ambient temperature and the reagents were then removed under vacuum. The product was redissolved in 10 µl DMSO and 1 µl used for MS analysis. Permethylation was carried out using 10% of peak I, which was dried and redissolved in 250 µl anhydrous dimethyl sulphoxide. One or two pellets of NaOH were rapidly ground in a glass pestle and mortar and added to the sample solution. After 10 min at room temperature, 100 µl methyl iodide was added, and after a further 10 min, a second 100 µl aliquot was added. After 20 min, 300 µl methyl iodide was added and after a final 20 min the reaction was terminated by adding first 1 ml 10 mg/ml sodium thiosulphate solution, followed immediately by 1 ml dichloromethane. The mixture was shaken thoroughly, and after centrifugation, the aqueous layer was removed and discarded. The organic layer was washed 3 times with 1 ml water, and dried under a stream of nitrogen. In order to retain the carbamoyl group on permethylation this procedure was modified slightly, so that the first aliquot of methyl iodide was added immediately after the NaOH, instead of waiting for 10 min. All other amounts and times remained exactly the same. Permethylated LCO preparations were redissolved in 10 µl DMSO and 1 µl used for FAB-MS analysis. Conversion of the Permethylated LCOs to their partially methylated alditol acetates was achieved as described [11]. Monosaccharide composition analysis was carried out after conversion of 15% of the LCOs in peak I to their TMS methyl glycosides, as described [21].

Fast-atom bombardment mass spectrometry and collision-induced dissociation tandem mass spectrometry

Positive-ion fast-atom bombardment mass spectra were obtained using MS1 of a JEOL JMS-

SX/SX102A tandem mass spectrometer operated at 10 kV accelerating voltage. The FAB gun was operated at 6 kV accelerating voltage with an emission current of 10 mA and using xenon as the bombarding gas. Spectra were scanned at a speed of 30 s for the full mass range specified by the accelerating voltage used, and were recorded and averaged on a Hewlett Packard HP9000 data system running JEOL Complement software. Collision-induced dissociation mass spectra were recorded with the same machine, with nitrogen as the collision gas in the third-field free-region collision cell, at a pressure sufficient to reduce the parent ion to one third of its original intensity. In all experiments mono-thioglycerol was used as the matrix.

Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

GC-MS analyses were performed using a Fisons MD800 mass spectrometer fitted with a Fisons GC8060 gas chromatograph, an on-column in-

jector and helium as the carrier gas. Monosaccharide derivatives were separated on a DB-5MS column (0.32 mm \times 30 m; J + W Scientific). TMS methyl glycosides were injected directly from solution in the TMS reagents (1 μ l injected) and separated using the following temperature programme: 110 $^{\circ}$ C for 2 min, then ramping at 30 $^{\circ}$ C/min to 170 $^{\circ}$ C, holding for 2 min, then ramping at 4 $^{\circ}$ C/min to 240 $^{\circ}$ C, and holding for 10 min. Partially methylated alditol acetates (PMAAS) were injected in solution in dichloromethane (1 μ l injected) and separated by using the following temperature programme: 50 $^{\circ}$ C for 2 min, then ramping at 40 $^{\circ}$ C/min to 130 $^{\circ}$ C, holding for 2 min, then ramping at 4 $^{\circ}$ C/min to 230 $^{\circ}$ C, and holding for 15 min. Mass spectra were recorded under conditions of electron impact in the positive ion mode with an electron energy of 70 eV, and were recorded using linear scanning from m/z 50–500 over 1 s.

Results

Production and purification of LCOs

The production of LCOs was assayed by *D*-[1- 14 C]-glucosamine or *L*-[methyl- 14 C]-methionine labelling studies as described in Materials and methods. In the presence of the flavonoid naringenin, *R. etli* strain CE3 produces radiolabelled metabolites which can be extracted with *n*-butanol and which behave like LCOs on TLC analysis (Figs. 1A and 1B). However, in the case of the labelling experiment with *D*-[1- 14 C]-glucosamine, metabolites that behave similar in the TLC analyses were also produced in the absence of naringenin (Fig. 1A, lane 1).

In order to be able to purify sufficient quantities of LCOs to allow chemical analysis we constructed a series of *R. etli* LCO-overproducing strains by introducing an additional *nodD* gene. The best strain is obtained when the *nodD* gene of *R. leguminosarum* bv. *viciae* is used (Figs. 1A and 1B, lanes 3 and 4). The HPLC separation of the extracts obtained after the reversed-phase prepurification step yields, in addition to the peak

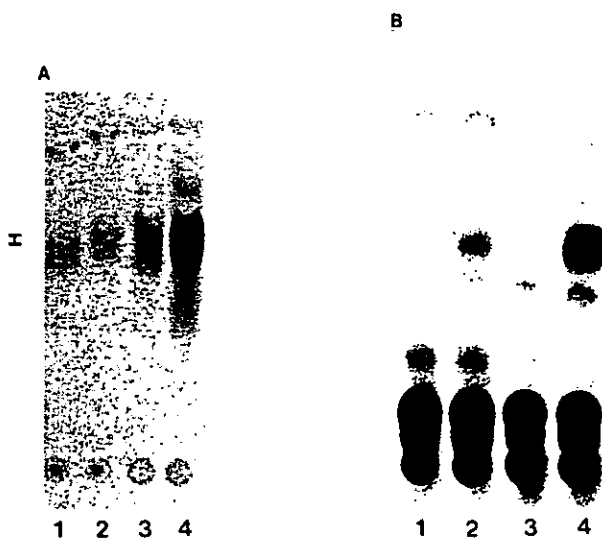


Fig. 1. Thin-layer chromatographic (TLC) analysis of radiolabelled metabolites of *R. etli*. A. *n*-butanol extracts of cells grown in the presence of [1- 14 C]-glucosamine were analysed. B. *n*-butanol extracts of cells grown in the presence of *L*-[methyl- 14 C]-methionine were analysed. Lanes: 1, strain CE3 without induction; 2, strain CE3 induced with naringenin; 3, strain CE3.pMP280 without induction; 4, strain CE3.pMP280 induced with naringenin.

resulting from naringenin (at RT 18), two inducible broad peaks, the major one corresponding to HPLC fractions 38–45 (peak I) and the minor one to fractions 48–49 (peak II) (Fig. 2). Peaks I and II were dried and redissolved in 1 ml 25% aqueous acetonitrile and were used for further studies. It should be noted that in the absence of the inducer naringenin UV-absorbing peaks co-eluting with fractions 38–45 one also detected. This result is in agreement with the radiolabelling studies which indicate that in the absence of inducer the *R. etli* strain is also able to produce a minor quantity of compounds with similar chromatographic behaviour as LCOs (Fig. 1A).

Structural determination of purified LCOs

The two LCO-containing peaks, I and II, were analysed by FAB-MS in the positive ion mode. The FAB mass spectrum obtained from peak I

(data not shown) contains signals corresponding to $[M + H]^+$ pseudomolecular ions at m/z 1501, 1459 and 1458, consistent with the presence of a LCO consisting of five GlcNAc residues and one deoxyhexose, a carbamoyl, an acetyl, a methyl and a C18:1 fatty acyl moiety and to LCOs lacking either the acetyl group or the carbamoyl group. The presence of signals at m/z 1609, 1567 and 1566, corresponding to thioglycerol adducts of the $[M + H]^+$ ions, is consistent with the presence of an unsaturated fatty acyl moiety.

The CID mass spectrum of the ion at m/z 1501 in peak I (Fig. 3), obtained on collision with nitrogen and recorded after scanning the second mass spectrometer for the fragment ions, contains signals at m/z 1483, 1092, 889, 686 and 483, corresponding to oxonium ions formed by cleavage of each successive glycosidic bond, with charge retention on the non-reducing terminus. These ions allow the sequence and substitution pattern of the LCO to be defined: the backbone

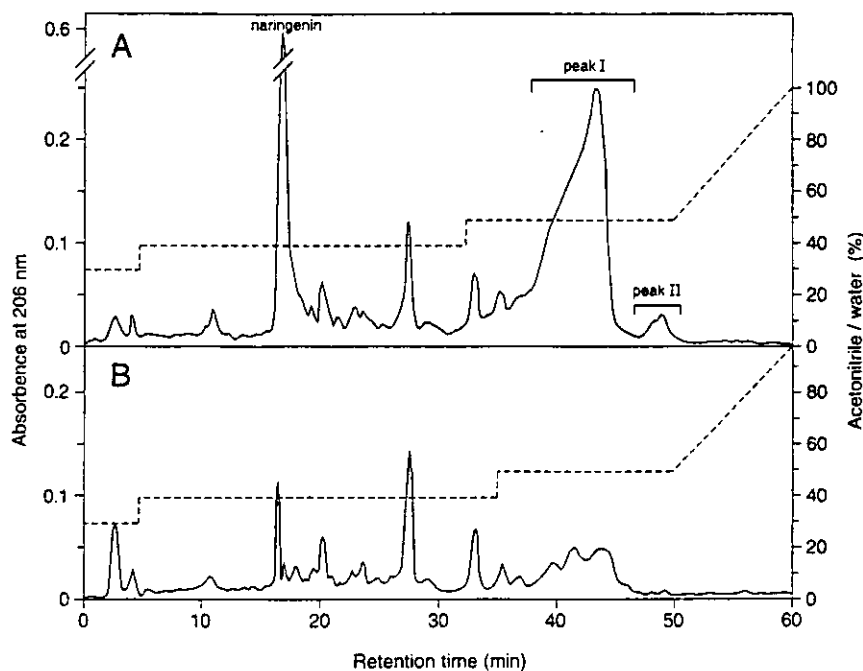


Fig. 2. High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of LCO extracts of *R. etli* strain CE3.pMP280. *n*-butanol extracts of 1 liter of bacteria grown in the presence (A) or absence (B) of naringenin and prepurified with reversed-phase extraction columns. The resulting samples were applied to a HPLC column using the shown acetonitrile/water gradient and fractions were collected each minute.

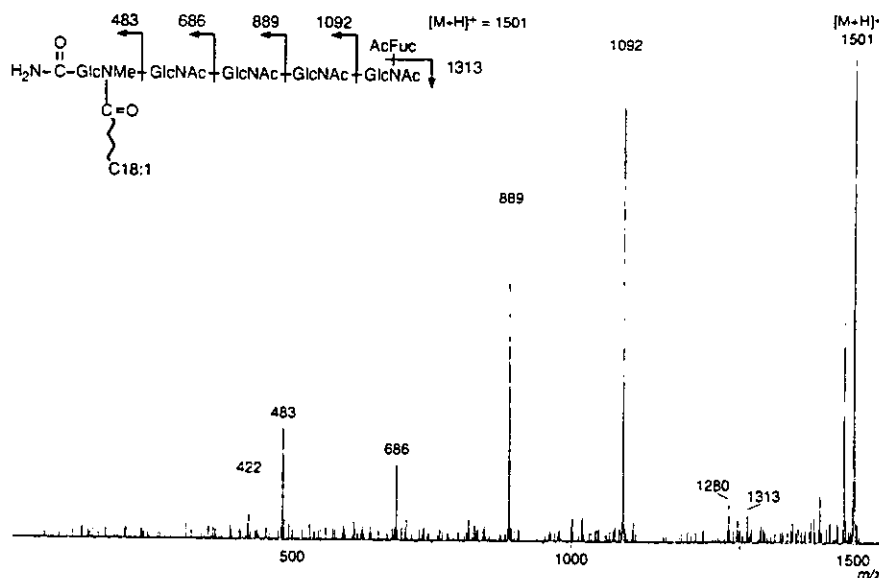


Fig. 3. CID mass spectrum and fragmentation scheme of the major LCO species in peak I of Fig. 2. The ion at m/z 422 arises by elimination of NH_2COOH from the oxonium ion at m/z 483.

is a linear GlcNAc5 oligosaccharide, bearing the C18:1 fatty acid, the methyl group and the carbamoyl group on the non-reducing terminal residue and an acetyl moiety and a deoxyhexose residue on the reducing terminal residue. The ion at m/z 1280 corresponds to an oxonium ion produced on loss of a single GlcNAc residue. This could arise either from the presence of a minor amount of an isomeric species in which the acetyl and deoxyhexose residue are not substituted on the reducing terminal residue, or alternatively could represent a low-abundance rearrangement ion analogous to that described by Ferro *et al.* [6]. The low-abundance ion at m/z 1313 arises on β -cleavage of an acetyl-deoxyhexose residue from the pseudomolecular ion, and is important in defining the attachment of the acetyl group to the deoxyhexose residue.

The FAB mass spectrum of peak II contains signals corresponding to $[\text{M} + \text{H}]^+$ ions at m/z 1503, 1461 and 1460, consistent with LCO species analogous to those found in peak I but bearing a C18:0 fatty acyl moiety instead of the C18:1 chains found in peak I. Ions corresponding to thiolglycerol adducts are not observed, which is

consistent with the presence of a saturated fatty acid. The CID mass spectrum of the pseudomolecular ion at m/z 1503 contains signals at m/z 1485, 1094, 891, 688, and 485, consistent with the presence of the saturated fatty acyl-containing analogue of the structure in peak I.

The nature of the linkages of the fatty acyl chain and the acetyl moiety to the LCO were established upon de-esterification of an aliquot of peak I in mild base. The FAB mass spectrum of the product contains a major $[\text{M} + \text{H}]^+$ pseudomolecular ion at m/z 1459 which represents a mass loss of 42 amu. This is consistent with cleavage of an acetyl ester under mildly basic conditions, with retention of the fatty acyl moiety, which is therefore concluded to be attached in amide linkage to the non-reducing terminal residue.

In order to determine whether the methyl group is attached to the nitrogen of the non-reducing terminal GlcNAc or to an oxygen, an aliquot of peak I was peracetylated. The FAB mass spectrum of the product contains a major $[\text{M} + \text{H}]^+$ pseudomolecular ion at m/z 2047. The mass shift with respect to the underivatized species corre-

sponds to the incorporation of 13 acetyl groups, which is consistent with the presence of 12 free hydroxyl groups, and the acetylation of the carbamoyl group in the native material. This indicates that the methyl group is attached to the nitrogen atom of the non-reducing terminal GlcNAc.

In order to preclude the theoretical possibility of the presence of a C19:1 fatty acyl group in place of a methyl group and a C18:1 fatty acyl chain, an aliquot of peak I was permethylated. The FAB mass spectrum of the product contains a signal corresponding to a $[M + H]^+$ pseudo-molecular ion at m/z 1668. This mass corresponds to the loss of the acetyl and the carbamoyl groups with the incorporation of 18 (rather than 19) methyl groups, indicating that the nitrogen on the non-reducing terminal GlcNAc bears a C18:1 fatty acyl and a separate methyl group.

The identity of the deoxyhexose residue was determined after methanolysis of an aliquot of peak I, and GC-MS analysis of its TMS methyl glycosides. The peak pattern and retention times of the deoxyhexosyl derivative from peak I are identical to those obtained from an authentic fucose standard, and are quite distinct from those corresponding to the TMS methyl glycosides obtained from a rhamnose standard, allowing the deoxyhexose residue in the LCO to be assigned as fucose.

In order to establish the linkage between the monosaccharide residues, and the site of attachment of the fucose residue to the reducing terminal HexNAc, the remainder of permethylated peak I was hydrolysed, reduced and acetylated. The resulting PMAAs were analysed using GC-MS. Derivatives corresponding to terminal HexNAc, 1,4-disubstituted HexNAc, and 4,6-disubstituted HexNAc were identified. We thus conclude that the LCO has a linear 1,4-linked HexNAc5 backbone, to which the acetylated deoxyhexose residue is attached via C-6 of the reducing-terminal residue.

The C-atom to which the carbamoyl group is attached was determined following methylation of an aliquot of peak I under conditions where the carbamoyl group is retained [27]. Subsequently,

this sample was hydrolysed, reduced and acetylated. The resulting PMAAs were analysed using GC-MS and the data from this experiment were compared with those obtained above. The intensity of the peak in the GC-chromatogram corresponding to the non-reducing terminal GlcNAc residue is greatly reduced, and derivatives corresponding to 3- and 6-substituted GlcNAcs are not observed, while the relative intensity of the peak corresponding to 4-substituted GlcNAc is more intense. These data are consistent with the conclusion that the carbamoyl group is located on C-4 of the non-reducing terminal GlcNAc.

Bioassays

The biological activity of the major LCO-containing fraction upon HPLC was assayed with an inoculation assay using *P. vulgaris* roots, and scored for induction of cortical cell division and production of nodule primordia. Nodule primordia are completely absent from uninoculated roots. An average of 90% of the roots inoculated with the LCO-containing fraction, or with a crude *n*-butanol extract, give a response in the formation of a discernible zone of cortical cell division or characteristic nodule primordia (Fig. 4A). Half of the primordia induced are observed at the site of inoculation, and the remainder are found elsewhere on the roots. Some of them eventually form nodule-like structures (Fig. 4B and 4C) with a frequency of three to five nodule-like structures per plant. The number of identifiable structures increases with increasing concentrations of LCOs applied (the maximum concentration tested was 10^{-7} M). They are observed as nodule primordia from the 5th day after inoculation (Fig. 4A), and as nodule-like structures from the 10th day after inoculation (Fig. 4B and 4C). These nodule-like structures are distinguishable from lateral roots since the focus of cell division in the nodule-like structures is located in the inner and outer cortex, while lateral root initiations contain a dense cortical primordium originating in the pericycle (Fig. 4D). When the purified LCO-containing fraction was used, there is a delay of about 6 days

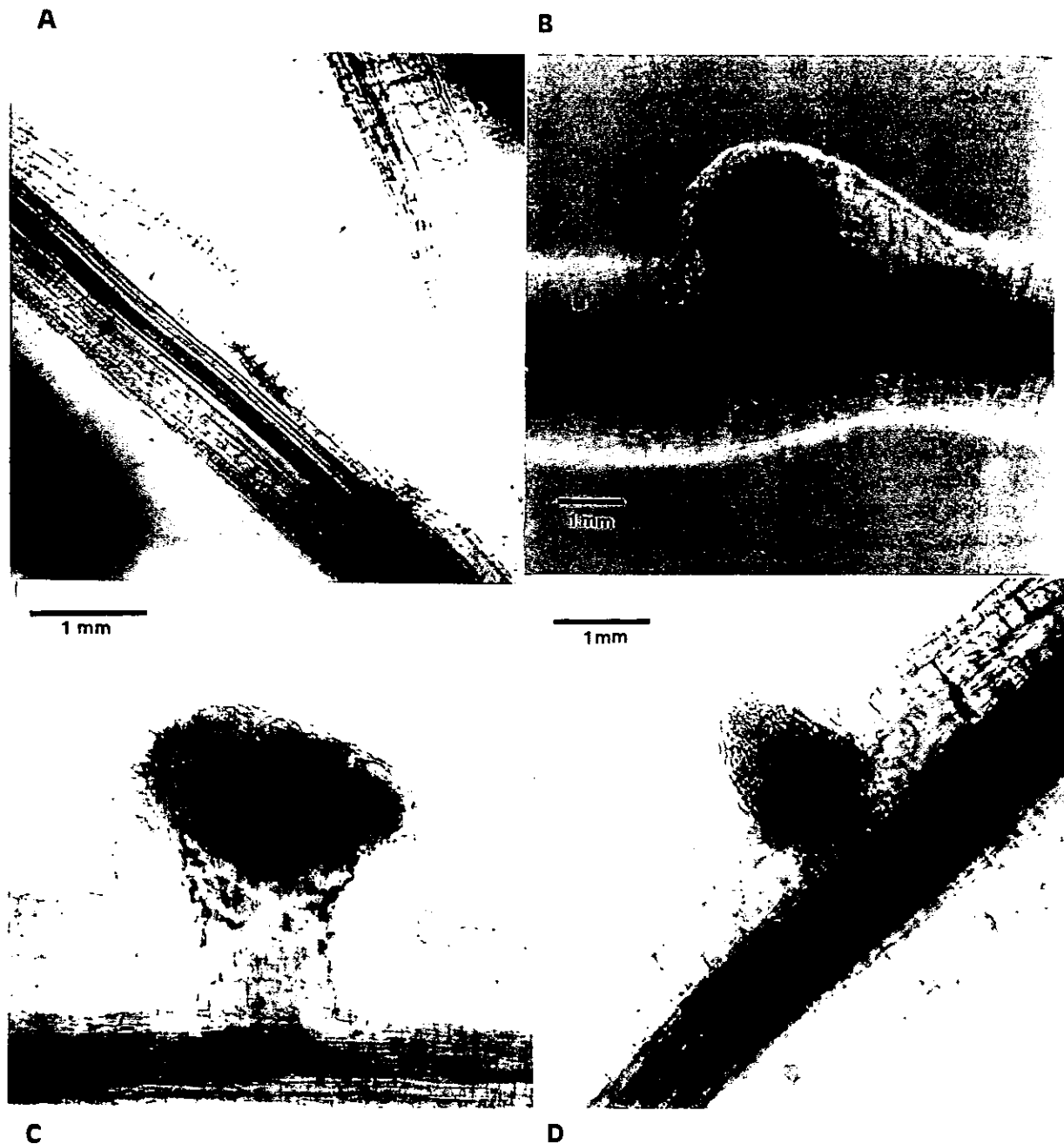


Fig. 4. Induction of nodule primordia on *Phaseolus vulgaris* by LCOs from *R. etli* (A–C) and comparison with a lateral root primordium (D). To each plant an amount of LCOs from peak 1 (Fig. 2) was added which is equivalent to that produced by 1 ml of naringenin-induced culture (approximate final concentration of LCOs: 10^{-7} M). Shown are examples of several stages of development observed 5 days (A) or 10 days (B and C) after inoculation.

in the development of the primordium and nodule-like structures compared to the crude extracts. The structures produced on inoculation

with the LCO-containing fraction or crude extracts are smaller than the nodules produced by bacterial inoculation. In addition, although they

have the same bifurcated type of vascularization (Fig. 4C), it is not as structured as in the nodules induced by the bacteria [14, 26].

Nodulation experiments on Lotus plants

Considering the apparent identity of the structures of the LCOs isolated from *R. etli* with those identified from *R. loti* [13], we have investigated whether the former strain is able to nodulate on *Lotus* plants. The results (Table 1) show that *R. etli* is not able to induce the formation of nodules or nodular structure on *Lotus corniculatus* and *L. caucasicus*. However, a derivative of *R. etli* strain CE3, which contains plasmid pMP604, is able to induce nodules on the roots of these *Lotus* species. Since plasmid pMP604 harbours a *nodD* gene which confers flavonoid-independent transcription activation (FITA) of the *nod* genes, a host-specific barrier for *R. etli* to nodulate some *Lotus* plants is apparently the lack of suitable *nod* gene inducers excreted by these plants. *L. preslii* is nodulated by *R. etli* as efficiently as by *R. loti*. The latter finding shows that the identities in LCO structures produced by these rhizobia is also biologically relevant.

The reverse situation, i.e. when *P. vulgaris* is inoculated with *R. loti* strains, was also tested (Table 1). The results show that only the *R. loti* strain which contains the FITA *nodD* gene is able to nodulate *P. vulgaris*. We therefore conclude that the lack of *nod* gene inducers is apparently the major barrier of nodulation of bean plants by *R. loti* bacteria.

Discussion

In this paper we describe the structures and biological activities of *R. etli* strain CE3 which was isolated as an endosymbiont of *Phaseolus vulgaris*. The structures of the LCOs of various other rhizobia which nodulate *Phaseolus* have already been reported. The rhizobial strains concerned are *Rhizobium* strain NGR234 [16], strain GRH2 [14], *R. tropici* [15] and *R. fredii* [1] that all have broad host ranges. *R. etli* is different from these strains in that it has a more narrow host range [19]. It is therefore of interest to compare the structures of the LCOs from these various strains.

The LCOs of *R. etli* are β -1,4-linked pentasaccharides consisting of one *N*-acyl-*D*-glucosamine and four *N*-acetyl-*D*-glucosamines. The major compounds are substituted with a carbamoyl group at C4 and a methyl group at the amino group on the non-reducing-terminal residue, and an acetylfucose at C6 on the reducing-terminal residue. The position of the acetyl group on the fucose cannot be determined by mass spectrometric methods. For NMR analysis, sufficient quantities have not yet been isolated. The fatty acyl chain carried by the non-reducing terminal glucosamine is either vaccenic acid (C18:1) or stearic acid (C18:0). LCO spot I in the TLC system (Fig. 1B) and the corresponding HPLC peak I (Fig. 2) are broader than expected for a single compound. This is consistent with the results of the mass spectrometric studies, that show that peak I is a mixture of compounds. Some minor compounds, such as the de-*O*-acetylated LCO or that lacking the carbamoyl group could

Table 1. Frequency of nodulation¹ of *Lotus* and *Phaseolus* species by *R. etli* and *R. loti* strains.

Bacterial strains	Plant species			
	<i>L. corniculatus</i>	<i>L. preslii</i>	<i>L. caucasicus</i>	<i>P. vulgaris</i>
<i>R. etli</i> CE3	0	100	0	100
<i>R. etli</i> CE3pMP604	10	100	20	100
<i>R. loti</i> E1R	100	100	90	0
<i>R. loti</i> E1R.pMP604	nt	nt	nt	100

¹ The percentage of nodulated plants was scored 19 days after inoculation with rhizobia. For the *Lotus* species ten plants were used for each experiment. For *P. vulgaris* four plants were used for each experiment.

also have been generated during purification as a result of partial degradation.

The LCOs of *R. etli* are different from any of the LCOs produced by any of the broad-host-range strains mentioned above. The methyl group is found in the LCOs from all the broad-host-range strains except for *R. fredii* [1]. Fucosylated or 2-*O*-methylfucosylated LCO structures are found also in *B. japonicum*, *B. elkanii* and *R. fredii* although these are not *O*-acetylated [1, 2]. The LCOs of strain NGR234, having the broadest host range of all known rhizobia, can contain *O*-acetylated 2-*O*-methylfucose moieties [16]. Surprisingly, the LCOs of *R. etli* are indistinguishable from those of various *R. loti* strains [13]. These *R. loti* strains have a very narrow host range, mainly confined to species of the genus *Lotus*. This raised the question as to whether *R. etli* is able to nodulate *Lotus* species. The results show that, although *R. etli* itself is not able to nodulate *Lotus* plants, a derivative of *R. etli* harbouring a *nodD* gene which activates transcription in the absence of flavonoids efficiently nodulates *Lotus* plants. Apparently, the lack of inducers excreted by the *Lotus* plants is the major barrier to nodulation by *R. etli*.

We have tested the biological activity of the *R. etli* LCOs on the host plant *Phaseolus vulgaris*. The purified LCOs are able to induce cell divisions in the root, starting in the outer cortex and thus following a developmental pattern which is characteristic of determinate nodules. In the accompanying paper [14] it is shown that the purified LCOs from strain GRH2 are also able to induce nodule primordia on *P. vulgaris*. In that study it was shown that the nodule primordia induced by LCOs are not able to develop into complete nodule structures. Here we show that the nodule primordia induced by the purified LCOs of the homologous symbiont *R. etli* also do not develop into complete nodular structures including a well-organized vascular structure. Mixtures of the LCOs produced were more effective in inducing nodule primordia but they were also not able to induce complete nodule structures. The higher effectiveness of the mixtures might indicate synergistic effects or, alternatively, the

loss of minor, biologically very active, LCO species during the purification. The combined results therefore suggest that an unknown rhizobial factor plays a role in the formation of full-grown nodules on *P. vulgaris*.

It has been shown that several *nod* genes encode enzymes involved in the processes of fatty acid biosynthesis, chitin synthesis and chitin modification [3, 20, 22]. Through their essential roles in the biosynthesis of the LCOs the *nod* genes are major mediators of the host specificity of nodulation. Geelen *et al.* [8] have provided evidence that *nodS* encodes a methyltransferase involved in the addition of the *N*-methyl substituent in *Azorhizobium*. Consistent with the presence of an *N*-methyl group in the LCOs of *R. etli* strain CE3 this strain also contains a *nodS* gene [32]. We are presently looking for the genes which are responsible for the addition of the acetylucose and carbamoyl moieties.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Mexican government IN206794 from DGPA and 3431-N from CONACyT (C.Q.), a Spanish Ministry of Education and Science fellowship (I.M.L.-L.), contracts from the European Union number BIO2-CT92-5112 (fellowship to I.M.L.-L.) and the Biotech Programme, as part of the project of technological priority 1993–1996 (grant BIO2-CT93-0400), by the Royal Dutch Academy of Arts and Sciences (H.P.S.) and the Netherlands Foundation for Chemical Research (SON) and the Netherlands Organization for the Advancement of Pure Research (NWO) (Utrecht group). H.P.S. was supported by a pionier grant from the NWO.

References

1. Bec-Ferté MP, Krishnan HB, Promé D, Savagnac A, Pueppke SG, Promé JC: Structures of nodulation factors from the nitrogen-fixing soybean symbiont *Rhizobium fredii* USDA257. *Biochemistry* 33: 11782–11788 (1994).
2. Carlson RW, Sanjuan J, Bhat R, Glushka J, Spaink HP.

- Wijffes HM, van Brussel AN, Stokkermans TJW, Peters K, Stacey G: The structures and biological signals produced by type I and type II strains of *Bradyrhizobium japonicum*. *J Biol Chem* 268: 18372–18381 (1993).
3. Dénarié J, Cullimore J: Lipo-oligosaccharide nodulation factors: A new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Cell* 74: 951–954 (1993).
 4. Ditta G, Stanfield S, Corbin D, Helinski DR: Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 7347–7351 (1980).
 5. Fåhræus G: The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J Gen Microbiol* 16: 374–381 (1957).
 6. Ferro M, Demont N, Promé D, Promé J-C, Boivin C, Dreyfus D: Detection and characterization of Nod factors by MALDI LSIMS and tandem mass spectrometry. Proceedings of the 13th International Mass Spectrometry Conference (Budapest, Hungary, 29 August–2 September 1994), Poster Th D3 (1994).
 7. Franssen HJ, Vijn I, Yang WC, Bisseling T: Developmental aspects of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Mol Biol* 19: 89–107 (1992).
 8. Geelen D, Mergaert P, Geremia RA, Goormachtig S, Van Montagu M, Holsters M: Identification of *nodS* and *nodU* genes in Nod locus I of *Azorhizobium caulinodans*: evidence that *nodS* encodes a methyltransferase involved in Nod factor modification. *Mol Microbiol* 9: 145–154 (1993).
 9. Göttfert M: Regulation and function of rhizobial nodulation genes. *FEMS Microbiol Rev* 104: 39–64 (1993).
 10. Heidstra R, Geurts R, Franssen H, Spaink HP, van Kammen A, Bisseling T: Root hair deformation activity of nodulation factors and their fate on *Vicia sativa*. *Plant Physiol* 105: 787–797 (1994).
 11. Lederkremer RM, Lima C, Ramirez MI, Ferguson MAJ, Homans SW, Thomas-Oates J: Complete structure of the glycan of lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *J Biol Chem* 266: 23670–23675 (1991).
 12. Lewin A, Cervantes E, Chee-Hoong W, Broughton W: *nodS* and *nodU*, two new *nod* genes of the broad host range *Rhizobium* strain NGR234 encode host-specific nodulation of the tropical tree *Leucaena leucocephala*. *Mol Plant-Microbe Interact* 3: 317–326 (1990).
 13. López-Lara IM, van den Berg JDJ, Thomas Oates JE, Glushka J, Lugtenberg BJJ, Spaink HP: Structural identification of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals of *Rhizobium lotii*. *Mol Microbiol* 15: 627–638 (1995).
 14. López-Lara IM, van der Drift KMG, van Brussel AAN, Haverkamp J, Lugtenberg BJJ, Thomas-Oates JE, Spaink HP: Induction of nodule primordia on *Phaseolus* and *Acacia* by lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from broad host range *Rhizobium* strain GRH2. *Plant Mol Biol*, co-submitted with this paper (1995).
 15. Poupot R, Martínez-Romero E, Promé J-C: Nodulation factors from *Rhizobium tropici* are sulfated or nonsulfated chitopentasaccharides containing an *N*-methyl-*N*-acetylglucosaminyl terminus. *Biochemistry* 32: 10430–10435 (1993).
 16. Price NPJ, Relić B, Talmont F, Lewin A, Promé D, Pueppke SG, Maillet F, Dénarié J, Promé J-C, Broughton WJ: Broad-host-range *Rhizobium* species strain NGR234 secretes a family of carbamoylated, and fucosylated, nodulation signals that are *O*-acetylated or sulfated. *Mol Microbiol* 6: 3575–3584 (1992).
 17. Relić B, Talmont F, Kopcinska J, Golinowski W, Promé J-C, Broughton WJ: Biological activity of *Rhizobium* sp. NGR234 Nod-factors on *Macropitium atropurpureum*. *Mol Plant-Microbe Interact* 6: 764–774 (1993).
 18. Schultze M, Kondorosi E, Ratet P, Buiré M, Kondorosi A: Cell and molecular biology of *Rhizobium*-plant interactions. *Int Rev Cytol* 156: 1–75 (1994).
 19. Segovia L, Young JPW, Martínez-Romero E: Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains in a new species, *Rhizobium etli* sp. nov. *Int Systematic Bact* 43: 374–377 (1993).
 20. Spaink HP: Rhizobial lipo-oligosaccharides: Answers and questions. *Plant Mol Biol* 20: 977–986 (1992).
 21. Spaink HP, Bloemberg GV, van Brussel AAN, Lugtenberg BJJ, van der Drift KMG, Haverkamp J, Thomas-Oates JE: Host specificity of *Rhizobium leguminosarum* is determined by the hydrophobicity of highly unsaturated fatty acyl moieties of the nodulation factors. *Mol Plant-Microbe Interact* 8: 155–164 (1995).
 22. Spaink HP, Lugtenberg BJJ: Role of rhizobial lipo-chitin oligosaccharide signal molecules in root nodule organogenesis. *Plant Mol Biol* 26: 1413–1422 (1994).
 23. Spaink HP, Okker RJH, Wijffelman CA, Pees E, Lugtenberg BJJ: Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. *Plant Mol Biol* 9: 29–37 (1987).
 24. Spaink HP, Sheeley DM, Van Brussel AAN, Glushka J, York WS, Tak T, Geiger O, Kennedy EP, Reinhold VN, Lugtenberg BJJ: A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature* 354: 125–130 (1991).
 25. Stokkermans TJW, Peters NK: *Bradyrhizobium elkanii* lipo-oligosaccharides signals induce complete nodules structures on *Glycine soja* Siebold et Zucc. *Planta* 193: 413–420 (1994).
 26. Taté R, Patriarca EJ, Riccio A, Defez R, Iaccarino M: Development of *Phaseolus vulgaris* root nodules. *Mol Plant-Microbe Interact* 7: 582–589 (1994).
 27. Thomas-Oates JE, van den Berg JDJ, Bloemberg GV, van der Drift KMG, Geiger O, López-Lara IM, Rademaker GJ, Spaink HP: Structural determination and biosynthetic studies of the Nod metabolites: the lipo-chitin oligosaccharides. In: Burlingame AL, Carr SA (eds)

- Mass Spectrometry in the Health and Life Sciences vol III, Humana Press, in press (1995).
28. Truchet G, Camut S, de Billy F, Odorico R, Vasse J: The *Rhizobium*-legume symbiosis: two methods to discriminate between nodules and other root derived structures. *Protoplasma* 149: 82–88 (1989).
 29. Truchet G, Roche P, Lerouge P, Vasse J, Camut S, De Billy F, Promé J-C, Dénarié J: Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. *Nature* 351: 670–673 (1991).
 30. van Brussel AAN, Bakhuizen R, van Spronsen P, Späink HP, Tak T, Lugtenberg BJJ, Kijne J: Induction of pre-infection thread structures in the host plant by lipo-oligosaccharides of *Rhizobium*. *Science* 257: 70–72 (1992).
 31. Vásquez M, Dávalos A, de las Peñas A, Sánchez F, Quinto C: Novel organization of the common nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* strains. *J Bact* 173: 1250–1258 (1991).
 32. Villalobos M, Nava N, Vazquez M, Quinto C: Nucleotide sequence of the *Rhizobium etli nodS* gene. *Gene* 150: 201–202 (1994).

5.0 RESULTADOS II

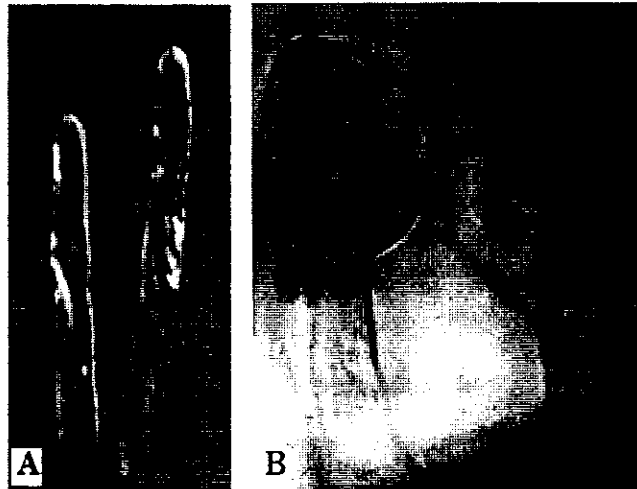
Respuesta del citoesqueleto a los factores Nod

5.0 RESULTADOS II

5.1 Actividad biológica sobre los pelos radiculares

Las raíces de frijol se expusieron a los FNs a las mismas concentraciones que se usaron para la inducción de primordios de nódulos. Sin embargo, hemos encontrado que necesitamos cantidades menores de los factores Nod para obtener deformación de los pelos radiculares, por lo que en estos casos utilizamos 10^{-8} M de factores Nod, siendo esta la concentración ideal. Cuando se observan las raíces 12 horas después de tratamiento con los FNs, normalmente encontramos estructuras como las que se muestran en la figura 12. Esta respuesta la hemos seguido desde sus estadios iniciales por medio de secuencias de imágenes. La respuesta tiene lugar durante la primera hora después de exponer los pelos radiculares a los FNs. Esto se observa como un hinchamiento de la región apical que se muestra en la figura 13 B y dos horas después, es una deformación visible, como se muestra en la figura 13 C. Estas deformaciones son el resultado de la respuesta a los factores Nod, ya que en presencia de los oligómeros de quitina que usamos como control, no se obtienen estos tipo de deformaciones (Figura 13 A).

Figura 12. Respuesta de los pelos radiculares de frijol a los factores Nod de *R. etli*. A, muestra la morfología de los pelos radiculares controles expuestos a los oligómeros de quitina y B, 12 horas después de exponer a los factores Nod.



5.2 Determinación de la velocidad de crecimiento y flujo citoplásmico

En este análisis complementario, hemos abordado el estudio del efecto de los FNs sobre el flujo citoplasmático. Las observaciones realizadas al microscopio nos muestran que existe una rápida reducción en la velocidad del flujo citoplasmático del orden de $\sim 0.4 \mu\text{m}/\text{seg}$ a $\sim 0.2 \mu\text{m}/\text{seg}$ en los primeros 5-10 min de estar en presencia de los FNs (Figura 14). Posteriormente esta velocidad retorna a los valores

originales. generalmente después de 30 min. Mediante el uso de un *software* adecuado es posible determinar la velocidad de crecimiento de los pelos radiculares (Figura 15). Los resultados obtenidos de la medición del crecimiento oscilan alrededor de $0.4 \mu\text{m}/\text{min}$, un crecimiento menor a lo reportado para otros ápices en crecimiento siendo. sin embargo, resultados reproducibles.

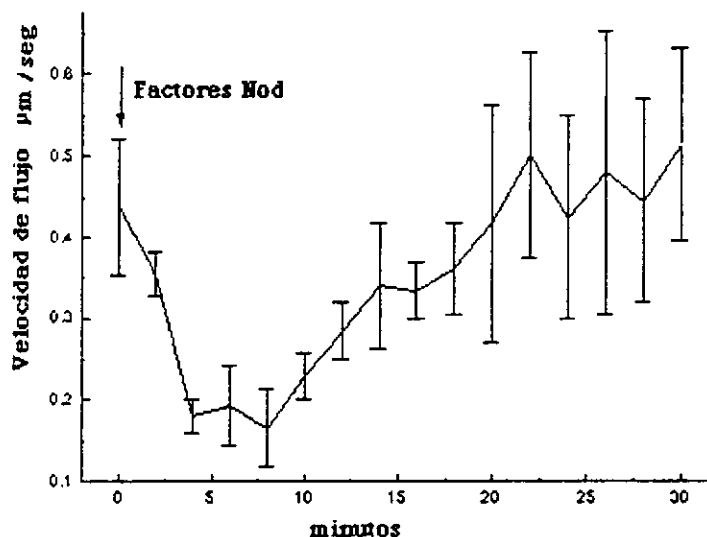
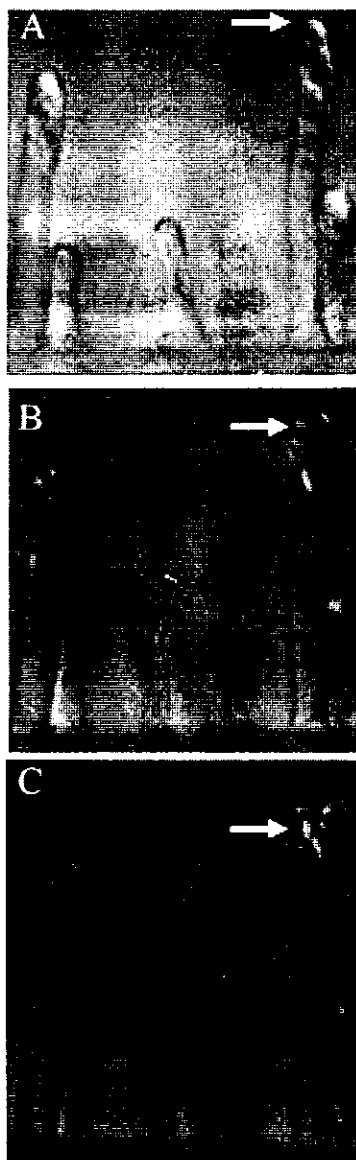


Figura 14. Efecto de los factores Nod sobre el flujo citoplasmático. El momento previo a la flecha indica la velocidad promedio de 5 pelos radiculares antes de la aplicación de los FNs y los tiempos después de la flecha indican el efecto de los FNs.

Figura 13. Respuesta de los pelos radiculares de frijol a los FNs de *R. Etli* por 2 horas en un mismo pelo radicular. A; expuestos únicamente a los oligómeros de quitina como control. La acumulación de citoplasma en la región apical (ver flecha) es muy clara. B; 60 min después de la exposición a los FNs, aquí puede observarse que la cantidad de citoplasma en la región apical disminuye y se acompaña por un hinchamiento de esta región. C; 2 hrs después de la aplicación de los FNs, nuevamente se observa la acumulación de citoplasma en la región apical al mismo tiempo que el crecimiento se reinicia con las características de una deformación. Los pelos radiculares que responden a los FNs difícilmente recuperan el sitio de crecimiento original, normalmente el reinicio del crecimiento reinicia en otro sitio que no corresponde al original.

5.3 Citoesqueleto de actina en pelos radiculares de frijol

Para determinar la organización del citoesqueleto de actina en pelos radiculares de *P. vulgaris*, microinyectamos faloidina fluoresceinada en los pelos radiculares vivos, específicamente en la región citoplásmica. La faloidina tiene la capacidad de unirse

de manera específica a los filamentos de actina y permite su visualización por microscopía confocal (Zhang et al., 1993; Miller et al., 1996). Debido a que la faloidina, como resultado de la estabilización de los microfilamentos eventualmente puede llegar a ser tóxica a la célula, todas las imágenes se adquirieron inmediatamente después de microinyectar el pelo, esto es entre 1 y 2 min después, cuando los pelos radiculares parecen normales a juzgar por varios criterios: el fuerte flujo citoplásmico ($\sim 0.4 \mu\text{m}/\text{seg}$), la morfología del citoplasma y la velocidad de crecimiento de la célula ($\sim 0.4 \mu\text{m}/\text{min}$). Con este enfoque, las células se trataron previamente con los FNs o los pentámeros de quitina y entonces se microinyectaron con faloidina a tiempos determinados. Las imágenes se adquirieron inmediatamente en el primer minuto, antes de que el flujo citoplásmico se detuviera, lo que sucede generalmente durante los primeros 10 min. Hemos calculado que la eficiencia de las microinyecciones es del orden de un 20 %.

Figura 15. Secuencia de video de un pelo radicular de frijol en crecimiento. Se tomó una imagen del pelo en crecimiento cada 30 segundos (A-F) mediante una cámara de video y se procesó con la ayuda de un *software* apropiado como se describe en métodos. La línea en la posición frontal nos da una idea del crecimiento en tanto que el ápice se aproxima a la línea.

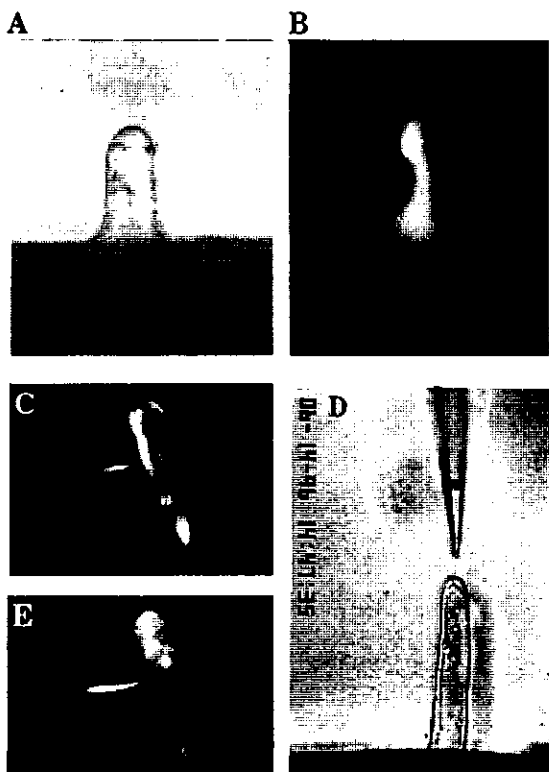
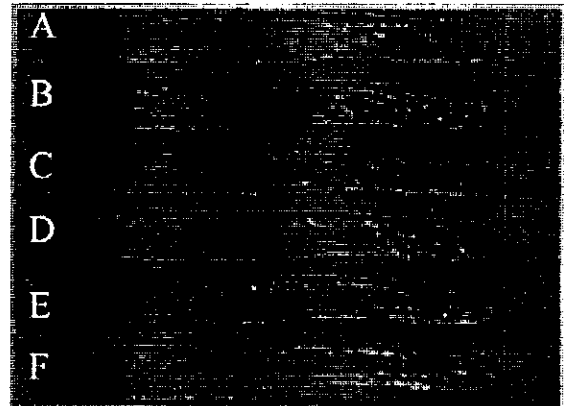


Figura 16. Imágenes al microscopio de pelos radiculares de frijol durante los diferentes pasos del método de microinyección. A, imagen en Nomarski de un pelo radicular y B, el mismo pelo con el colorante microinyectado en la vacuola. C y E, muestra como se observan las microinyecciones del colorante en el citoplasma, C es una célula recuperada y E, una célula muerta después de microinyectar. D, muestra la posición del microelectrodo específico para Ca^{2+} durante la determinación de influjos de corrientes de Ca^{2+} .

Las microinyecciones que no fueron exitosas, por ejemplo cuando se dañó la célula o la faloidina se depositó en la vacuola, la distribución del colorante fue fácilmente determinada y estos pelos se descartaron inmediatamente. Esto se observa muy claramente en la figura 16, en el panel A, en donde mostramos la imagen en Nomarski de un pelo normal y en el panel B la misma célula microinyectada en la vacuola. En la misma figura, en el panel C y E, se observan dos microinyecciones citoplásmicas, en el panel C, se muestra una célula que se ha recuperado rápidamente a juzgar por la distribución inmediata del colorante como consecuencia del flujo citoplásmico. Sin embargo, en el panel E, el colorante se ha quedado en el mismo lugar de la deposición, probablemente la célula se ha muerto o tomará un tiempo muy largo para recuperarse. Estos pelos microinyectados junto con los inyectados intravacuolarmente fueron descartados.

La eficiencia del 20 %, es razonable para nuestros propósitos, si consideramos que la vacuola ocupa más del 90 % del volumen celular como se puede observar en la figura 16 B. La obtención de un solo dato requiere de la habilidad y experiencia para manejar este sistema, así como del mantenimiento de los pelos vivos después de cada microinyección. Para reducir el daño celular, siempre se microinyectó en las regiones laterales de la célula, que son las zonas más difíciles pero que aseguran una mayor viabilidad de los pelos radiculares, los sitios de microinyección se muestran en la figura 16 panel C y E (ver la posición de la aguja). Con esta metodología, los microfilamentos de actina pueden ser observados más fácilmente en las células microinyectadas. Los patrones de distribución obtenidos con esta técnica superan cualquier sistema de fijación química ya que usamos un sistema *in vivo*.

Las células controles que no se expusieron a los FNs (Figura 17 A) o que se expusieron a los pentámeros de quitina como control de especificidad (Figura 17 B), muestran patrones de organización de los microfilamentos de actina muy similares, esto es, cables de microfilamentos que recorren lo largo del pelo radicular desde la base del mismo hasta la proximidad del ápice (Figura 17A, ver cabeza de flecha). En algunos casos los cables de actina colocalizan exactamente con los sitios que recorren las hebras transvacuolares. Algunas veces estos cables son lo suficientemente gruesos como los que se observan en la Figura 17 A (cabeza de flecha), pero con frecuencia también se encuentran cables más delgados y evidentemente son más flexibles como lo demuestran las curvaturas o dobleces.

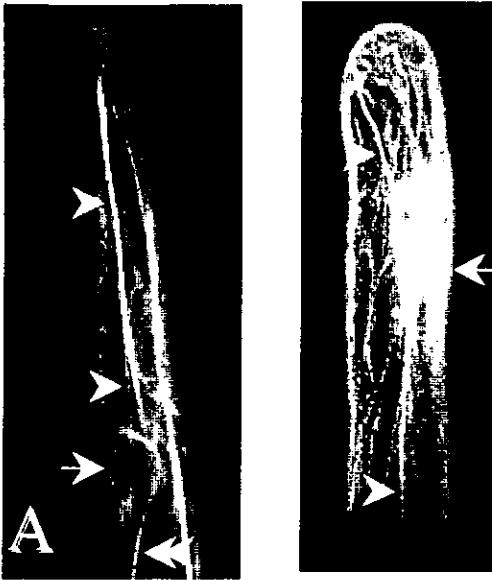


Figura 17. Organización de los microfilamentos de actina en pelos radiculares de *P. vulgaris*. A, muestra el arreglo de estos microfilamentos en ausencia de los factores Nod y B, en presencia de los oligómeros de quitina. Ambas células se microinyectaron con FITC-faloidina y se visualizaron al microscopio confocal. En A, se observan los cables largos de actina que recorren la longitud del pelo radicular (ver cabezas de flecha) desde su base hasta la proximidad del ápice. Las flechas indican el área nuclear, donde es muy fácil distinguir los microfilamentos más cortos que rodean al núcleo y que en alguna forma parecen continuar con los filamentos más largos (doble cabeza de flecha). B, muestra una sobreposición de 21 imágenes que se tomaron a cada μm para ilustrar todos los dominios alcanzados por los microfilamentos en el espacio citoplasmático.

Los microfilamentos de actina que rodean al núcleo (Figura 17 A, ver flecha) tienen la característica de ser delgados y se organizan con una arquitectura intrincada muy definida que parece estar conectada con los cables más gruesos de actina.

La figura 17 B es una secuencia de 21 imágenes de confocal adquiridas en un mismo pelo radicular cada $1 \mu\text{m}$ en el plano "Z" y reconstruida por sobreposición para mostrar la red completa de microfilamentos en la región del ápice y del núcleo en un mismo pelo radicular (ver flecha). Esta sobreposición de imágenes pone de manifiesto la complejidad de la organización de los microfilamentos de actina y cómo estos inervan la mayoría de los espacios citoplásmicos de los pelos radiculares.

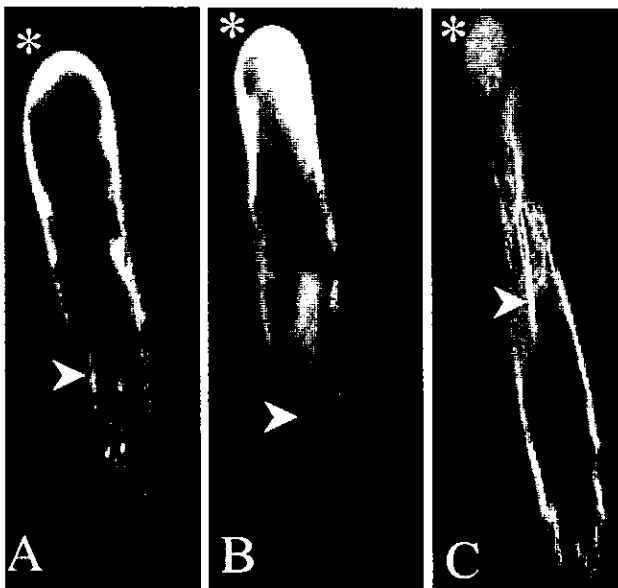


Figura 18. Citoesqueleto en pelos radiculares que se han visualizado como en la figura 1 pero 5-15 minutos después de exponerlos a una concentración de 10^{-8} M de los factores Nod. Hacia el extremo apical se puede observar claramente los filamentos y cables de actina fragmentados a juzgar por la alta fluorescencia difusa en esta región (A, B y C, ver asteriscos), aún se pueden observar algunos cables de microfilamentos (ver cabeza de flechas) pero estos son más pequeños, y el número también es menor si se compara con los controles.

Para estudiar el efecto de los FNs de *R. etli* sobre la arquitectura y organización de los microfilamentos de actina, los pelos radiculares se trataron previamente con los FNs a una concentración de 10^{-8} M. Durante los primeros 5-10 min después de exponer a los FNs se observa una rápida fragmentación de los cables de microfilamentos de actina lo cual se manifiesta por una reducción en el número, longitud y la marcada presencia de fluorescencia difusa en la región apical del pelo radicular (Figura 18 A, B y C, ver asterisco blanco). Existen algunos cables de actina largos hacia la región basal del pelo radicular pero son muy pocos y normalmente mucho más delgados que los cables de actina en las células controles. Después de 30 min de haber expuesto a los FNs, la estructura del citoesqueleto se recupera parcialmente. Esto lo proponemos basándose en que observamos la reaparición de los cables largos de actina que recorren nuevamente la longitud del pelo, desde la base hasta la región apical.

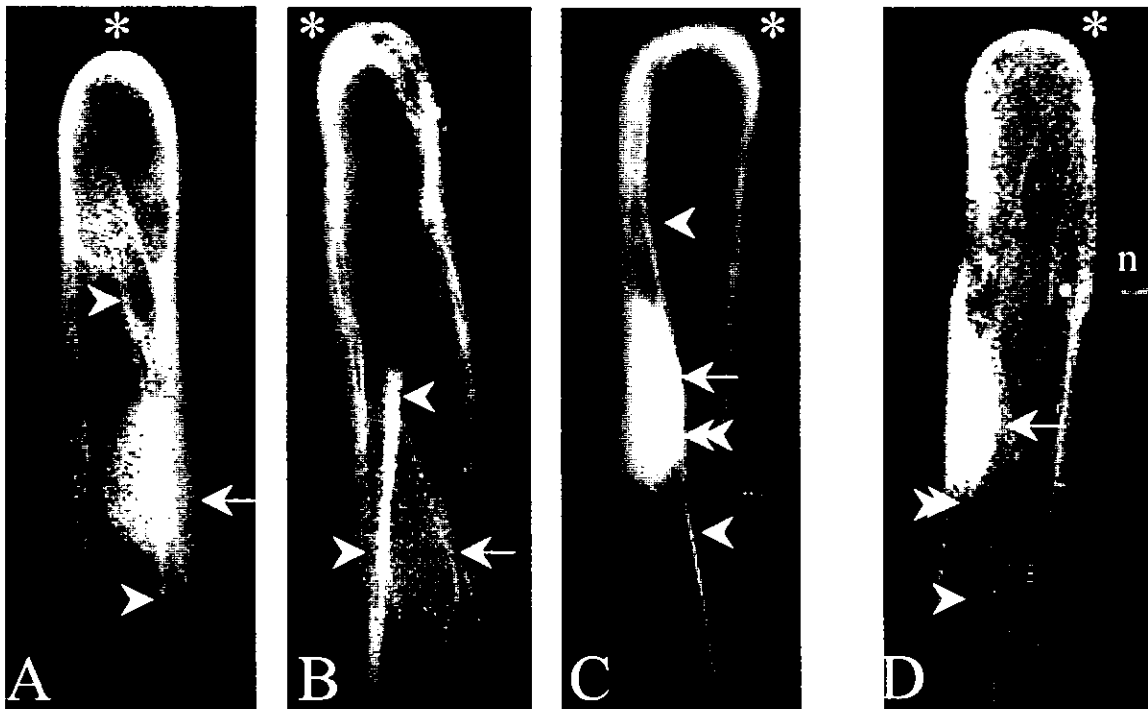


Figura 19. Citoesqueleto de actina en diferentes pelos radiculares 30-60 minutos después de aplicar los factores Nod. Los filamentos de actina se han recuperado parcialmente en longitud y número, formando nuevamente filamentos largos que recorren lo largo del pelo radicular (ver cabezas de flechas). Aún existen fragmentos de actina en el extremo apical como lo indica la alta fluorescencia en esta región (ver asteriscos). La alta fluorescencia en el área perinuclear (ver flechas) sugiere igualmente la presencia de microfilamentos cortos que parecen estar asociados con los cables gruesos de actina (ver doble cabeza de flechas). A, es una superposición de 21 imágenes tomadas cada μm para mostrar toda la distribución del citoesqueleto en el espacio citoplasmático. El sitio de microinyección se indica con la letra n.

En este momento hacemos dos observaciones muy importantes: aún cuando los cables de actina largos se recuperan, se mantiene una alta fluorescencia en el ápice, indicando la presencia de filamentos cortos en esta región (Figura 19 A, B, C y D, ver asteriscos). Por otro lado, en este momento, el núcleo llega a ser mucho más fluorescente que en las células controles (Figura 19 A, B, C, y D, ver flechas), lo cual indica que probablemente también se encuentra rodeado con más filamentos cortos de actina.

Después de exponer 4 h los pelos radiculares a los FNs y justamente cuando los pelos se han enroscado notablemente, encontramos que en estas células existe la presencia de “focos” de actina distribuidos preferentemente en la región apical (Figura 20 A y B, ver flechas). A estos tiempos, aún podemos observar una fluorescencia alta en el extremo del ápice (Figura 20 A y B, ver asteriscos) y los cables de actina pueden ser aún lo suficientemente largos para recorrer gran parte de la longitud de la célula (Figura 20 B, cabeza de flecha).

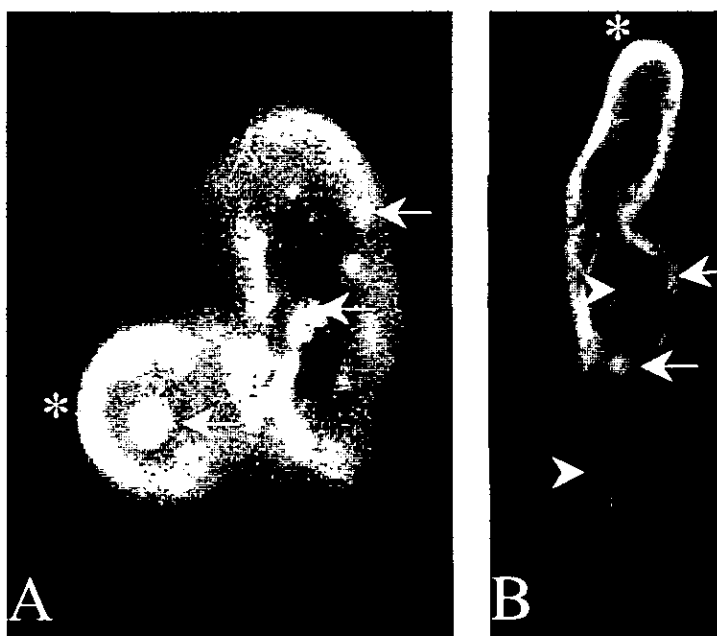


Figura 20. Citoesqueleto en pelos enroscados después de 4-6 horas de exponerse a los factores Nod. El citoesqueleto de actina se observa como cables largos que recorren el pelo radicular (ver cabeza de flecha), y la persistente presencia de actina fragmentada en el extremo apical (ver asteriscos). Lo nuevo en estos pelos enroscados lo constituye la presencia de focos de actina que se distribuyen en la proximidad apical (ver flechas).

Debido a que los FNs son estructuralmente parecidos a los oligómeros de quitina de hongos que mantienen cierta actividad como *elicitors* en ciertos tipos celulares (Boller, 1995) consideramos fundamental asegurarnos que la respuesta observada no se debiera a que los FNs se estuvieran degradando a fragmentos de quitina y que estos fueran finalmente los responsables de la respuesta observada. Para descartar esto, las células microinyectadas también se expusieron a 10^{-7} M de

penta-*N*-acetilquitopentaosa, un análogo inactivo de los FNs (Figura 17B). Los resultados obtenidos muestran que no hay ningún cambio en la organización de los microfilamentos de actina, siendo estos patrones prácticamente iguales a los obtenidos cuando las células no se exponen a los FNs.

5.4 Publicación en Plant Physiology

Cárdenas, L., Vidali, L., Domínguez, J., Pérez, H., Sanchez, F., Hepler, P. and Quinto, C. (1998). Rearrangement of Actin Microfilaments in Plant Root Hairs Responding to *Rhizobium etli* Nodulation signals. *Plant Physiol.* **116, 871-877.**

Rearrangement of Actin Microfilaments in Plant Root Hairs Responding to *Rhizobium etli* Nodulation Signals¹

Luis Cárdenas, Luis Vidali, Jimena Domínguez, Héctor Pérez², Federico Sánchez, Peter K. Hepler, and Carmen Quinto*

Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510–3, Cuernavaca Morelos 62271, Mexico (L.C., J.D., H.P., F.S., C.Q.); and Biology Department, Morrill Science Center, University of Massachusetts, Box 35810, Amherst, Massachusetts 01003–5810 (L.V., P.K.H.)

The response of the actin cytoskeleton to nodulation (Nod) factors secreted by *Rhizobium etli* has been studied in living root hairs of bean (*Phaseolus vulgaris*) that were microinjected with fluorescein isothiocyanate-phalloidin. In untreated control cells or cells treated with the inactive chitin oligomer, the actin cytoskeleton was organized into long bundles that were oriented parallel to the long axis of the root hair and extended into the apical zone. Upon exposure to *R. etli* Nod factors, the filamentous actin became fragmented, as indicated by the appearance of prominent masses of diffuse fluorescence in the apical region of the root hair. These changes in the actin cytoskeleton were rapid, observed as soon as 5 to 10 min after application of the Nod factors. It was interesting that the filamentous actin partially recovered in the continued presence of the Nod factor: by 1 h, long bundles had reformed. However, these cells still contained a significant amount of diffuse fluorescence in the apical zone and in the nuclear area, presumably indicating the presence of short actin filaments. These results indicate that Nod factors alter the organization of actin microfilaments in root hair cells, and this could be a prelude for the formation of infection threads.

Bacterial species of the genera *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, and *Azorhizobium* are gram-negative soil bacteria that infect the roots of leguminous plants, establishing a nitrogen-fixing symbiosis (Brewin, 1991; Hirsch, 1992; Mylona et al., 1995). The interaction of rhizobia and legumes begins with the production and recognition of signal molecules by their respective eukaryotic and prokaryotic symbiotic partners (Fisher and Long, 1992). Early events prior to nodule formation involve the attachment of bacteria to the plant root

hairs, root hair curling and deformation, and penetration of the bacteria as they invade the plant root hair cell by a newly formed infection thread. Simultaneously, cortical cells are mitotically activated, giving rise to the nodule primordium. Infection threads grow toward the primordium, and the bacteria are then released into the cytoplasm of the host cells, surrounded by a plant-derived peribacteroid membrane. The nodule primordium then develops into a mature nodule, and the bacteria differentiate into their endosymbiotic form that is capable of nitrogen fixation (for review, see Mylona et al., 1995).

In the first part of the signal exchange, the plant roots secrete flavonoids that lead to the activation of a set of rhizobial genes (the *nod* genes), which are essential for infection, nodulation, and the control of host specificity. These genes are responsible for the synthesis of LCOs, which are Nod factors that signal back to the plant (for review, see Schultze et al., 1994; Mylona et al., 1995; Dénarié et al., 1996). These Nod metabolites alone can trigger several plant responses implicated in nodule morphogenesis, including alterations in root hair morphology (Lerouge et al., 1990; Spaik et al., 1991; Price et al., 1992; Sanjuan et al., 1992; Schultze et al., 1992; Mergaert et al., 1993; Heidstra et al., 1994), changes in plant gene expression (Horvath et al., 1993; Journet et al., 1994; Cook et al., 1995), cortical cell dedifferentiation and mitosis (Spaik et al., 1991; Truchet et al., 1991; Relic et al., 1993), depolarization of root hair cell membrane potential (Ehrhardt et al., 1992; Felle et al., 1995; Kurkdjian, 1995), and, in some cases, the formation of mature structures resembling authentic nodules (Truchet et al., 1991; Mergaert et al., 1993; Stokkermans and Peters, 1994; Cárdenas et al., 1995). The root hair cells respond to Nod factors with morphological changes such as nuclear migration to the base of the cell and cytoplasmic bridges formed by cortical cells; these become the path of tip growth of the infection thread (Van Brussel et al., 1992).

The cytoskeleton is thought to be important for the initiation, development, and maintenance of the root nodules, as well as for root hair cell growth and polarity (Brewin, 1991; Pérez et al., 1994; Vidali et al., 1995). In the early

¹ This research was supported by grants from Dirección General de Asuntos del Personal Académico/Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM; nos. IN202595 and IN200196) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México (no. N-9608 to C.Q.), and by grants from the National Science Foundation (no. MCB-9601087 to P.K.H.; no. BBS-8714235 to the Microscopy Facility, University of Massachusetts, Amherst). L.C. and L.V. were supported by fellowships from CONACYT and DGAPA-UNAM, respectively.

² This article is dedicated to our dear friend and colleague Héctor Pérez, who passed away on November 10, 1996.

* Corresponding author; e-mail quinto@ibt.unam.mx; fax 52–73–136600.

Abbreviations: F-actin, filamentous actin; FITC, fluorescein isothiocyanate; LCO, lipochitin-oligosaccharide; Nod, nodulation.

stages of root nodule morphogenesis, there is evidence that the actin cytoskeleton participates in the formation of pre-infection threads and induction of cortical cell divisions (Bakhuizen, 1988). Ridge (1992) showed that the actin becomes fragmented in curled root hairs of *Vicia hirsuta* infected with *Rhizobium* spp. Examining alfalfa root hairs, Allen et al. (1994) found that in curled hairs there were some actin foci close to the tip when exposed to the Nod factors; disorganization of the streaming patterns was also observed.

However, both Ridge (1992) and Allen et al. (1994) examined only curled root hairs, which left unanswered the question of the response of the actin cytoskeleton to Nod factors during the initial minutes of exposure, well before root hair deformation. Determination of the earliest responses during the interaction is important because it is during this stage that the Nod signals secreted by *Rhizobium* spp. can establish the infection process. It is well known that during this stage the Nod factors induce membrane depolarization, ion mobilization, and cytoplasmic alkalinization (Ehrhardt et al., 1992; Felle et al., 1995). These processes could allow the bacteria to initiate a controlled manipulation of the host cytoskeleton and begin the events of infection thread formation.

By microinjecting FITC-phalloidin and examining the cells in the confocal microscope, we were able to visualize the actin cytoskeleton in living root hairs in the presence and absence of *Rhizobium etli* Nod factors. We found that these Nod factors induce processes that substantially modify the arrangement of actin microfilaments in bean (*Phaseolus vulgaris*) root hair cells as soon as 5 min after application of Nod factors. These changes are characterized by a dramatic breakdown of the actin bundles during the first minutes and recovery thereafter. Nod factors thus appear to induce rapid changes in the actin cytoskeleton, and these events may be a necessary prelude to the formation of infection threads.

MATERIALS AND METHODS

Plant Growth

Seeds of bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv Negro Jamapa) were surface sterilized, germinated, and grown as previously described (Cárdenas et al., 1995).

Mounting Living Root Hairs

Two-day-old seedlings were placed in liquid medium containing 2 mM CaCl₂ and 2.5 mM Mes, pH 6.2. After 8 h root hairs were usually well adapted to the medium. Intact seedlings containing the growing root hairs were mounted in chambers constructed on glass coverslips, forming a well, and were then visualized under the microscope (Diaphot 300, Nikon) with a ×40 water immersion lens with a numerical aperture of 0.75 (Zeiss). No mounting substance was needed and the well was filled with approximately 0.5 mL of the same medium that was replaced every 15 min to maintain the same calcium concentration during the microinjection.

Injection of FITC-Phalloidin

Microneedles were pulled in a vertical pipette puller (model 700D, David Kopf Instruments, Tujunga, CA) from filamented capillaries. FITC-phalloidin (Molecular Probes, Eugene, OR) was prepared as a 20- μ M solution in 10% (v/v) methanol. Before use, the FITC-phalloidin was sonicated and centrifuged at 20,000g to remove insoluble particles. The microneedle was back-filled with 1 μ L of the dye and microinjected into root hairs by hydraulic pressure. Microinjections were made with the help of a second micromanipulator that held a blunt needle to support the hair cells during impalement. Based on calculations from other plant cell systems, we estimated that there was at least a 100-fold dilution upon injection. Thus, the final phalloidin concentration was at most 200 nM.

Root hairs were treated with either the *Rhizobium etli* Nod factors or penta-*N*-acetylchitopentaose (a control factor; see below) prior to each microinjection. The living root hairs were selected before they were loaded with FITC-phalloidin by observing the normal cytoplasmic streaming (average 0.4 μ m/s) and tip growth, which we have determined to be 0.4 μ m/min. Microinjections were carried out anywhere in the root hair except its tip dome. Microinjected cells were scanned under the confocal microscope (MRC-600, Bio-Rad) and photographed within the 1st min after the dye was loaded to record the response of the actin cytoskeleton immediately.

Incubation of Root Hairs with Nod Factors

R. etli Nod factors were purified by HPLC as previously described (Cárdenas et al., 1995), resuspended in 1% (w/v) Chaps (the nondenaturing, zwitterionic detergent [3-[3-cholamidopropyl]-dimethylammonio]-1-propane-sulfonate) and diluted to 0.01% with the Nod factor at a final concentration of 10⁻⁸ M (the optimal concentration to induce root hair deformation). In contrast to alfalfa root hairs, which induce nodule-like structures when provided with 10⁻¹⁰ M Nod factor (Ehrhardt et al., 1996), bean root hairs require concentrations that are 10⁻⁸ M or higher (Martinez et al., 1993, 1995; Cárdenas et al., 1995) for an equivalent response.

Before application, the Nod factors were mixed with 0.5 mL of 2 mM CaCl₂ and 2.5 mM Mes, pH 6.2, and were then added gently to the growing root hairs to replace the Nod-factor-free medium. As a negative control we used 10⁻⁷ M penta-*N*-acetylchitopentaose (Seikagaku America, St. Petersburg, FL) dissolved in Chaps and under the same conditions as the Nod factors. Even at a 10-fold higher concentration than the Nod factors, the control chitin oligomer failed to induce an actin or cytoplasmic response.

RESULTS

To determine the organization of actin microfilaments in *P. vulgaris* root hair cells, we microinjected FITC-phalloidin into the cytoplasm of individual living root hairs. FITC-phalloidin specifically stains F-actin microfilaments and permits their visualization by confocal microscopy (Zhang

et al., 1993; Miller et al., 1996) (Fig. 1). Because phalloidin eventually becomes toxic to the cell, presumably through its stabilization of F-actin, all images were taken within 1 min from the time of microinjection. At this time the root hairs appeared normal: vigorous cytoplasmic streaming (approximately $0.4 \mu\text{m/s}$) and normal cytoplasmic morphology and growth rates (approximately $0.4 \mu\text{m/min}$) were observed.

With this procedure the cells were first treated with Nod factors or chitin oligomers and then with FITC-phalloidin microinjection at appropriate time intervals. Thereafter, images were acquired usually within 1 min and certainly well before cytoplasmic streaming had stopped, which generally occurred after 10 min. The efficiency of the microinjections was approximately 20%; those that were unsuccessful, e.g. the cell was injured or the FITC-phalloidin was delivered to the vacuole, were easily detected by a clearly noncytoplasmic distribution of the fluorescence (data not shown). To reduce damage, we microinjected into the shank of the hair, as shown in Figure 3D (see "n").

The distribution of actin microfilaments can be seen clearly in the cells that had received the injections. In untreated cells lacking Nod factors (Fig. 1A) or in the presence of the control factor penta-*N*-acetylchitopentaosa (Fig. 1B), bundles of microfilaments were observed running longitudinally from the base to the tip of the root hair cell (Fig. 1A, arrowheads) in a path that resembled the transvacuolar strands. Sometimes these bundles were quite thick, as depicted in Figure 1A (arrowheads), but more often they were thin and flexible, as indicated by their curved profiles.

Microfilaments surrounding the nucleus were also observed (Fig. 1A, arrow); these were usually thin but well defined, and in some instances they seemed to be continuous with the thicker elements (Fig. 1A, double arrowhead). Figure 1B is a sequence of 21 confocal images acquired at $1\text{-}\mu\text{m}$ intervals in the *z* axis and reconstructed to show the complete actin network close to the tip and the actin filaments around the nucleus (arrow). This projection image emphasizes the complexity of the actin microfilament system and reveals how it permeates all of the cytoplasmic domains of the root hair.

The Nod factors used in the present study, which had been previously isolated from *R. etli* strain CE3 and characterized by MS (Cárdenas et al., 1995), are *N*-acetylglucosamine pentasaccharides in which the nonreducing residue is *N*-methylated and *N*-acylated with *cis*-vaccenic acid (C18:1) or stearic acid (C18:0), and carries a carbamoyl group at C4. The reducing end is substituted at the C6 position with *O*-acetylfucose. Analysis of their biological activity on the host plant *P. vulgaris* showed that these LCOs at a concentration of 10^{-7} M elicited the formation of nodule primordia, which developed to the stage at which vascular bundles are formed (Cárdenas et al., 1995). In this study, the optimal concentration to induce root hair deformation was 10^{-8} M; a higher concentration gives the same results with regard to the root hair response, and a lower concentration results in a diminished effect.

To test the effect of the *R. etli* Nod factors on the structure and organization of the actin microfilaments in living root hair cells of *P. vulgaris*, we microinjected FITC-phalloidin into root hairs that had already been exposed to these

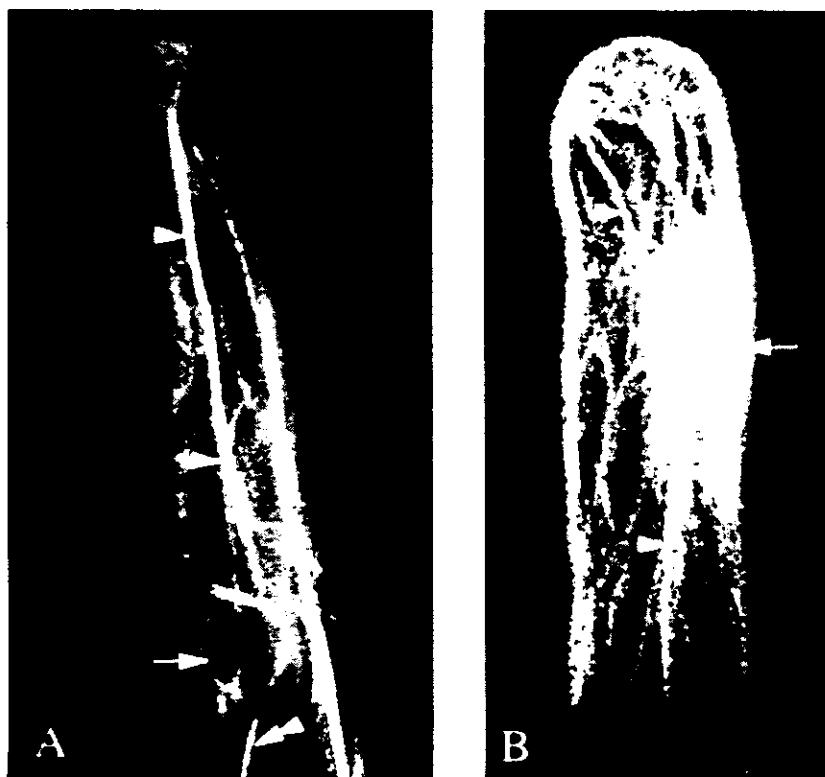


Figure 1. Organization of actin microfilaments in the root hair cells of *P. vulgaris* in the absence of Nod factors (A) and in the presence of penta-*N*-acetylchitopentaosa (B). FITC-phalloidin was microinjected into both cells and the outcome was visualized by confocal microscopy. Both A and B show large actin bundles running along the root hair (arrowheads) from the base to the tip, and microfilaments surrounding the nucleus are also observed (double arrowheads). A, Arrow indicates the nuclear area, and the double arrowhead indicates one of the large actin bundles surrounding the nucleus. B, Superimposition of 21 images acquired every $1 \mu\text{m}$ along the *z* axis.

factors at a concentration of 10^{-8} M. During the first 5 to 10 min after the application of Nod factors, there appeared to be a rapid breakdown of the microfilament bundles, as evidenced by a reduction in their number and length, concomitantly with a marked increase in diffuse fluorescence toward the apex of the root hair (Fig. 2, asterisks). Because phalloidin does not bind actin monomers, we attribute this high level of diffuse fluorescence to the presence of very short filaments of actin. Longer bundles of microfilaments are evident farther back from the apex, but these are few in number and usually quite thin.

After 1 h of Nod factor application, the structure of the cytoskeleton partially recovered, as evidenced by the reappearance of long actin microfilament bundles running from the base to near the tip of the root hair cell. However, the recovering cells were different from the initial controls in that they still possessed a high level of fluorescence at the tip (Fig. 3, asterisks). It was interesting that at this time the nucleus became brighter compared with controls (Fig. 3, arrows), suggesting that there had been an increase of short actin filaments around it.

After 4 h of exposure to Nod factors, and when curling of the root hair had become evident, we noted the appearance of punctate foci of fluorescence in the apical region (Fig. 4, arrows). The elevated level of diffuse fluorescence also persisted at the tip (Fig. 4, asterisks). At this time the actin cytoskeleton was evident as long bundles running along the root hair cell (Fig. 4B, arrowheads).

Because the Nod factors are structurally related to chitin-oligosaccharide molecules, which have biological activity on some plant cells (Boller, 1995), it is possible that they were degraded to chitin fragments at the plant surface and that these chitin fragments may be the active molecules stimulating the actin reorganization. To rule out this possibility, phalloidin was microinjected in the presence of 10^{-7} M penta-*N*-acetylchitopentaose, an inactive analog of the active LCOs, into root hair cells (Fig. 1B). As when Nod factors were absent, no changes were found in the organization of actin microfilaments.

DISCUSSION

Our results show that there is a dramatic change in the actin cytoskeleton in response to Nod factors. These responses were detected after 5 to 10 min of exposure to Nod factors and were well characterized by a rapid breakdown of the actin bundles. The most dramatic effect was detected at the tip, which was visualized as a region of abundant fluorescence, suggesting the presence of short actin filaments. It was interesting that during the continued exposure to Nod factors, bundles of actin microfilaments reappeared in the shank of the root hair. However, a zone of short filaments remained at the tip.

It was proposed previously that the actin cytoskeleton could have a pivotal role during the establishment of the interaction between *Rhizobium* sp. and the legume plant.

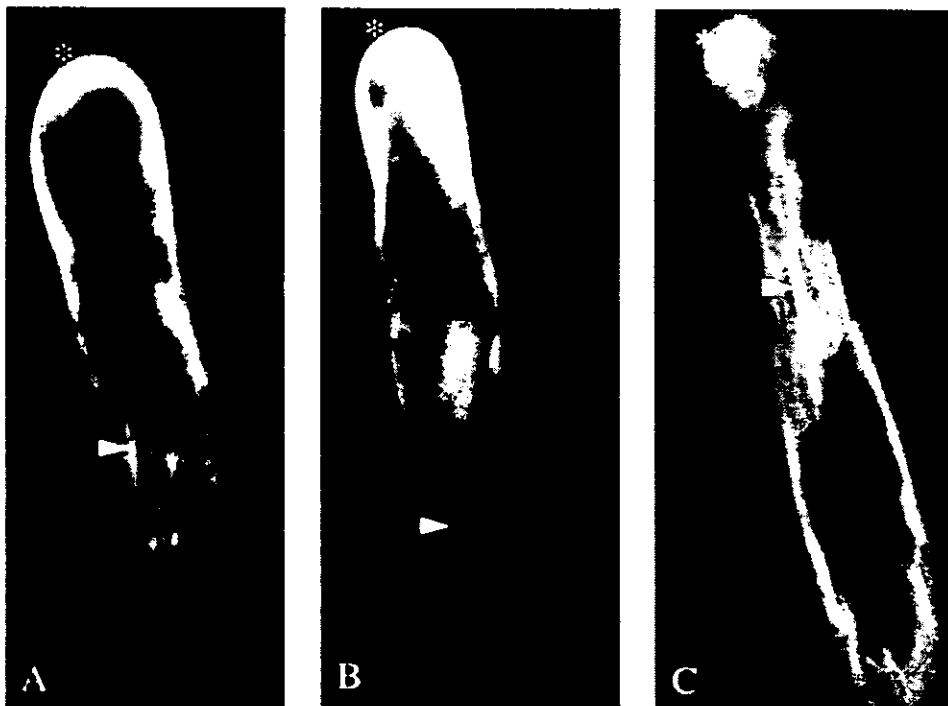


Figure 2. Actin cytoskeleton stained as in Figure 1 but after 5- to 15-min treatment with Nod factors at a final concentration of 10^{-8} M on three independent root hairs (A, B, and C). Toward the tip of the root hair the long bundles of actin microfilaments are fragmented, which accounts for the high level of diffuse fluorescence (asterisks). Large bundles of microfilaments are also observed (arrowheads), but these are reduced in size, number, and extent compared with the controls.

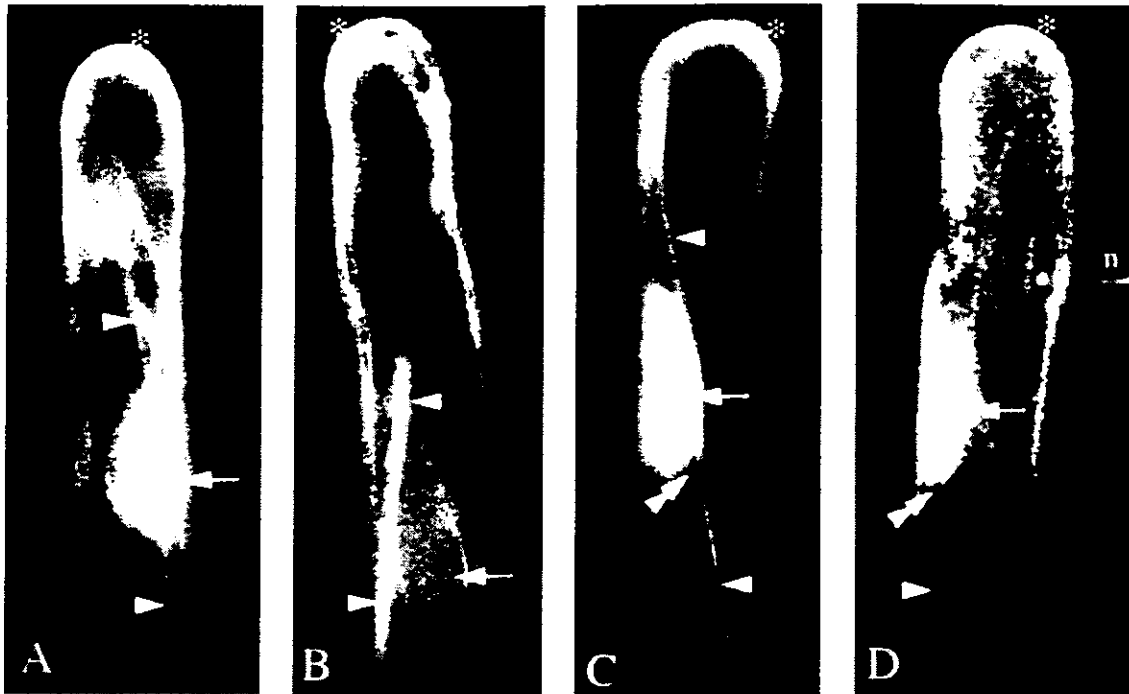


Figure 3. Actin cytoskeleton visualized 30 to 60 min after Nod factor treatment on four independent hairs. The actin microfilaments have partially recovered to form large bundles running along the length of the hair (arrowheads). Fragmented microfilaments are still accumulated at the tip (asterisks). The bright, diffuse staining around the nucleus (arrows) suggests the presence of numerous short microfilament fragments that appear to be associated with long microfilament bundles (see C and D for detail). D. Superimposition of 21 images acquired every 1 μm . n, The site of microinjection.

Ridge (1992), using *Rhizobium* sp. bacteria to elicit a response, showed a diffuse fluorescence in the deformed region of curled root hairs of *Vicia*; no actin bundles were evident in the treated hairs. He proposed that this area is a region where the actin could be fragmented in response to the presence of the bacteria. In a further study, Allen et al. (1994), using the purified Nod factors from *Rhizobium meliloti*, showed the presence of actin foci in curled root hairs of alfalfa. These actin foci were not detected by Ridge (1992), perhaps because of the different approaches used in each study, with bacteria in one (Ridge, 1992) and Nod factor in the other (Allen et al., 1994). However, these studies did not address the question of the response of actin cytoskeleton at the beginning of the infection process by *Rhizobium* spp. Thus, the results herein reveal for the first time, to our knowledge, that the effects of Nod factors are both dramatic in magnitude and fast, being evident within 5 to 10 min. In addition, it is important to note that the images shown in this study were obtained from living cells and do not contain artifacts arising from chemical fixation procedures.

We conclude that *R. etli* Nod factors induce substantial alterations to the architecture of actin microfilaments in the root hair cells of the host plant. The root hair cells that are most susceptible to *Rhizobium* sp.-induced deformation and infection thread development are those that are rapidly expanding (Bhuvaneswari et al., 1981). This suggests that the inward growth of infection threads may involve a reorganization of the normal processes of cell growth. It has been proposed that attached rhizobia incite a local

stimulation in the rate of plant cell wall expansion (Callaham and Torrey, 1981; Ridge and Rolfe, 1985; Van Batenburg et al., 1986; Van Spronsen et al., 1994).

Cytological examination of the apical growing tip of the uninfected root hair revealed cytoskeletal connections between the nucleus and the growing root hair tip (Lloyd et al., 1987). It is known, for instance, that the infection process uncouples the nucleus from the tip and that the uncoupled nucleus guides the infection thread toward the base of the cell (Fahraeus, 1957; Nutman, 1959). Presumably, the initiation of an inwardly growing infection thread is brought about by a reorganization of the cytoskeleton that targets cytoplasmic vesicles containing wall components to the growing point of the cell (Brewin, 1991) and regulates the nucleus-to-tip distance (Lloyd et al., 1987). In this respect, it is interesting to note that the nucleus is usually found surrounded by microfilaments, which may be necessary for the subsequent movement of the nucleus and the advancing infection thread.

Many bacteria have the capacity to enter and live within eukaryotic cells by triggering the host's signal transduction mechanism, which usually involves kinases or messengers such as calcium and inositol phosphates (Rosenshine and Finlay, 1993). These induce rearrangements of the host cytoskeleton, thereby facilitating bacteria uptake (Theriot, 1995). It is reasonable to suggest that *Rhizobium* spp. and other nodulating bacteria possess these same characteristics.

It has been proposed that the increases in the intracellular level of calcium triggered by Nod factors could participate in the modulation of the actin cytoskeleton (Sánchez et al.,

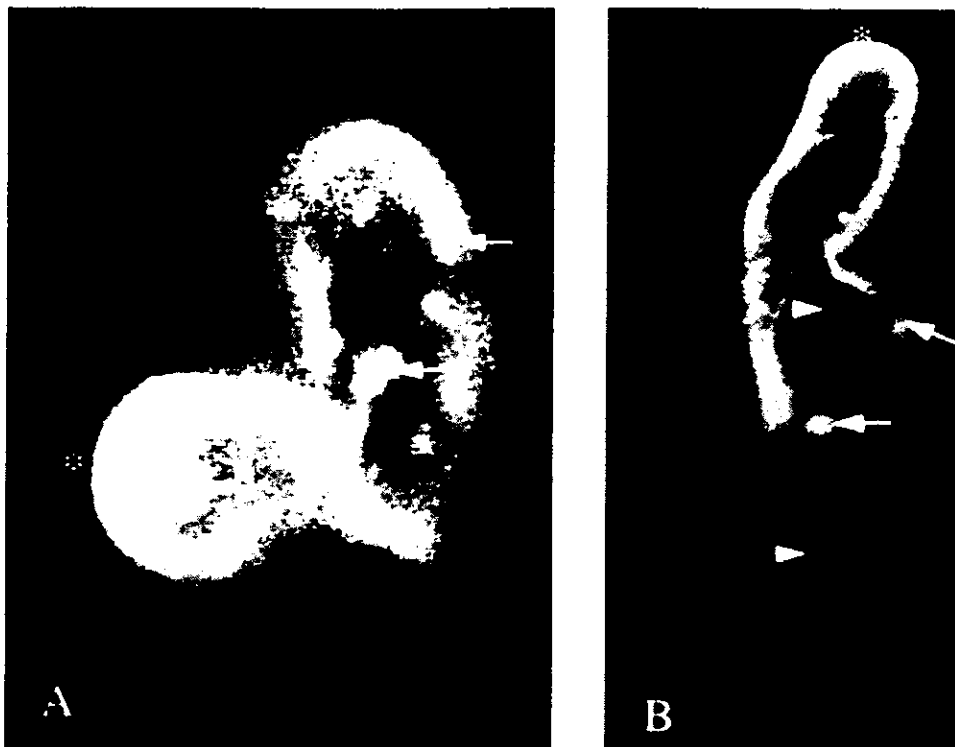


Figure 4. Two different curled root hairs after 4- to 6-h treatment (A and B) with Nod factor. The actin cytoskeleton is present as long actin bundles that run along the hair (arrowheads), some short actin microfilaments at the tip remain (asterisks), and there are punctate foci of actin evident at the tip region and scattered around the root hair (arrows).

1991; Allen et al., 1994). Specifically, it seems plausible that the appearance of the short filaments soon after the application of Nod factor is due to a calcium elevation. In support of this proposal is the observation that alfalfa root hairs exhibit oscillatory increases in intracellular calcium in response to Nod factors (Ehrhardt et al., 1996). Furthermore, in tip-growing pollen tubes, elevated levels of calcium induce fragmentation of F-actin (Kohno and Shimmen, 1987) and cause an arrest of cytoplasmic streaming (Kohno and Shimmen, 1988). Cytosolic alkalinization (Felle et al., 1996) and membrane depolarization (Ehrhardt et al., 1992; Felle et al., 1995) in root hairs exposed to Nod factor have been reported. Although their role in the infection process remains to be elucidated, it is possible that they affect the structure and distribution of actin. Note, for example, the pronounced effect that elevated pH has on the remodeling of actin in *Dictyostelium* sp. (Edmonds et al., 1995).

Experiments are in progress to investigate the factors that trigger the actin cytoskeleton response and to correlate them with effects on cytoplasmic streaming and other cellular processes. Although the detailed processes are not yet established, it seems likely that the dramatic reorganization of the actin cytoskeleton depicted in the present study participates in a fundamental way in controlling the apical root hair deformation and curling that precede bacterial infection and Nod.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Drs. B. Barkla, G. Cassab, O. Pantoja, and M.A. Villanueva for critical reading of the manuscript. We

also thank the central microscopy facility at the University of Massachusetts, Amherst, for the use of the confocal microscope.

Received August 21, 1997; accepted November 24, 1997.
Copyright Clearance Center: 0032-0889/98/116/0871/07.

LITERATURE CITED

- Allen NS, Bennett MN, Cox DN, Shipley A, Ehrhardt DW, Long SR (1994) Effects of Nod factors on alfalfa root hair Ca^{2+} and H^+ currents and on cytoskeletal behavior. In MJ Daniels, JA Downie, AE Osbourn, eds, *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, Vol 3. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 107-113
- Bakhuizen R (1988) The plant cytoskeleton in the *Rhizobium*-legume symbiosis. PhD thesis. Leiden University, The Netherlands
- Bhuvaneshwari TV, Bhagwat AA, Bauer WD (1981) Transient susceptibility of root cells in four common legumes to nodulation by rhizobia. *Plant Physiol* 68: 1144-1149
- Boller T (1995) Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 46: 189-214
- Brewin NJ (1991) Development of the legume root nodule. *Annu Rev Cell Biol* 7: 191-226
- Callaham DA, Torrey JG (1981) The structural basis for infection of root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium*. *Can J Bot* 59: 1647-1664
- Cárdenas L, Domínguez J, Quinto C, López-Lara IM, Lugtenberg BJJ, Spaik HP, Rademaker GJ, Haverkamp J, Thomas-Oates JE (1995) Isolation, chemical structures and biological activity of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium chti*. *Plant Mol Biol* 29: 453-464
- Cook D, Dreyer D, Bonnet D, Howell M, Nony E, VandenBosch K (1995) Transient induction of a peroxidase gene in *Medicago truncatula* precedes infection by *Rhizobium meliloti*. *Plant Cell* 7: 43-55

- Dénarié J, Debelle F, Promé JC (1996) *Rhizobium* lipo-chitoooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu Rev Biochem* 65: 503–535
- Edmonds BT, Murray J, Condeelis J (1995) pH regulation of the F-actin binding properties of *Dictyostelium* elongation factor 1a. *J Biol Chem* 270: 15222–15230
- Ehrhardt DW, Atkinson EM, Long SR (1992) Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science* 256: 998–1000
- Ehrhardt DW, Wais R, Long SR (1996) Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Cell* 85: 673–681
- Fahraeus G (1957) The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J Gen Microbiol* 16: 374–381
- Felle HH, Kondorosi E, Kondorosi A, Schultze M (1995) Nod signal-induced plasma membrane potential changes in alfalfa root hairs are differentially sensitive to structural modifications of the lipochitoooligosaccharide. *Plant J* 7: 939–947
- Felle HH, Kondorosi E, Kondorosi A, Schultze M (1996) Rapid alkalization in alfalfa root hairs in response to rhizobial lipochitoooligosaccharide signals. *Plant J* 10: 295–301
- Fisher R, Long SR (1992) *Rhizobium*-plant signal exchange. *Nature* 357: 655–660
- Heidstra R, Geurts R, Franssen H, Spaik HP, Van Kammen A, Bisseling T (1994) Root hair deformation activity of nodulation factors and their fate on *Vicia sativa*. *Plant Physiol* 105: 787–797
- Hirsch A (1992) Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol* 122: 211–237
- Horvath B, Hedistra R, Lados M, Moerman M, Spaik HP, Promé JC, Van Kammen A, Bisseling T (1993) Lipooligosaccharides of *Rhizobium* induce infection-related early nodulin gene expression in pea root hairs. *Plant J* 4: 727–733
- Journet EP, Pichon M, Dedieu A, De Billy F, Truchet G, Barker DG (1994) *Rhizobium meliloti* Nod factors elicit cell specific transcription of the ENOD12 gene in transgenic alfalfa. *Plant J* 6: 241–249
- Kohno T, Shimmen T (1987) Ca²⁺-induced fragmentation of actin filaments in pollen tubes. *Protoplasma* 141: 177–179
- Kohno T, Shimmen T (1988) Mechanism of Ca²⁺ inhibition of cytoplasmic streaming in lily pollen tubes. *J Cell Sci* 91: 501–509
- Kurkdjian AC (1995) Role of the differentiation of root epidermal cells in Nod factor from *Rhizobium meliloti*-induced root-hair depolarization of *Medicago sativa*. *Plant Physiol* 107: 783–790
- Lerouge P, Roche P, Faucher C, Maillat F, Truchet G, Promé JC, Dénarié J (1990) Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 344: 781–784
- Lloyd CW, Pearce KJ, Rawlins DJ, Ridge RW, Shaw PJ (1987) Endoplasmic microtubules connect the advancing nucleus to the tip of legume root hairs, but F-actin is involved in basipetal migration. *Cell Motil Cytoskeleton* 8: 27–36
- Martinez E, Laeremans T, Poupot R, Rogel MA, López L, Garcia F, Vanderleyden J, Promé JC, Lara F (1995) Nod metabolites and other compounds excreted by *Rhizobium* spp. In IA Tikhonovich, NA Provorov, VI Romanov, WE Newton, eds, Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications. Proceedings of the 10th International Congress on Nitrogen Fixation, St. Petersburg, Russia, May 28–June 3, 1995. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Martinez E, Poupot R, Promé JC, Pardo MA, Segobia L, Truchet G, Denarie J (1993) Chemical signaling of *Rhizobium* nodulating bean. In R Palacios, J Mora, WE Newton, eds, New Horizons in Nitrogen Fixation. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 171–175
- Mergaert P, Van Montagu M, Promé JC, Holsters M (1993) Three unusual modifications, a D-arabinosyl, an N-methyl, and a carbamoyl group are present on Nod factors of *Azorhizobium caulinodans* strain ORS571. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 1551–1555
- Miller DD, Lancelle SA, Hepler PK (1996) Actin microfilaments do not form a dense meshwork in *Lilium longiflorum* pollen tube tips. *Protoplasma* 195: 123–132
- Mylona P, Pawlowski K, Bisseling T (1995) Symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell* 7: 869–885
- Nutman PS (1959) Some observations on root-hair infection by nodule bacteria. *J Exp Bot* 10: 250–263
- Pérez HE, Sánchez N, Vidali L, Hernández JM, Lara M, Sánchez F (1994) Actin isoforms in non-infected roots and symbiotic nodules of *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 193: 51–56
- Price NPJ, Relic B, Talmont F, Lewin A, Promé D, Pueppke SG, Maillat F, Dénarié J, Promé JC, Broughton WJ (1992) Broad-host range *Rhizobium* species strain NGR234 secretes a family of carbamoylated, and fucosylated, nodulation signals that are O-acetylated or sulphated. *Mol Microbiol* 6: 3575–3584
- Relic B, Talmont F, Kopcinska J, Golinowski W, Promé JC, Broughton WJ (1993) Biological activity of *Rhizobium* sp. NGR234 Nod-factors on *Macroptilium atropurpureum*. *Mol Plant-Microbe Interact* 6: 764–774
- Ridge RW (1992) A model of legume root hair growth and *Rhizobium* infection. *Symbiosis* 14: 359–373
- Ridge RW, Rolfe BG (1985) *Rhizobium* sp. degradation of legume root hair cell wall at the site of infection thread origin. *Appl Environ Microbiol* 50: 717–720
- Rosenshine I, Finlay BB (1993) Exploitation of host signal transduction pathways and cytoskeletal functions by invasive bacteria. *Bioassays* 15: 17–24
- Sánchez F, Padilla JE, Pérez HE, Lara M (1991) Control of nodulin genes in root-nodule development and metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42: 507–528
- Sanjuan J, Carlson RW, Spaik HP, Bhat R, Barbour WM, Glushka J, Stacey G (1992) A 2-O-methylfucose moiety is present in the lipo-oligosaccharide nodulation signal of *Bradyrhizobium japonicum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8789–8793
- Schultze M, Kondorosi E, Ratet P, Buiré M, Kondorosi A (1994) Cell and molecular biology of *Rhizobium*-plant interactions. *Int Rev Cytol* 156: 1–75
- Schultze M, Quiclet-Sire B, Kondorosi E, Virelizier H, Glushka JN, Endre G, Géro SD, Kondorosi A (1992) *Rhizobium meliloti* produces a family of sulphated lipo-oligosaccharides exhibiting different degrees of plant host specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 192–196
- Spaik HP, Sheeley DM, Van Brussel AAN, Glushka J, York WS, Tak T, Geiger O, Kennedy EP, Reinhold VN, Lugtenberg BJJ (1991) A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature* 354: 125–130
- Stokkermans TJW, Peters NK (1994) *Bradyrhizobium elkanii* lipooligosaccharide signal induces complete nodule structures on *Glycine soja* Siebold et Zucc. *Planta* 193: 413–420
- Theriot J (1995) The cell biology of infection by intracellular bacterial pathogen. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11: 213–239
- Truchet G, Roche P, Lerouge P, Vasse J, Camut S, de Billy F, Promé JC, Dénarié J (1991) Sulphated lipooligosaccharide signals from *Rhizobium meliloti* elicit nodule organogenesis in alfalfa. *Nature* 351: 670–673
- Van Batenburg FHD, Jonker R, Kijne JW (1986) *Rhizobium* induces marked root hair curling by redirection of tip growth: a computer simulation. *Physiol Plant* 66: 476–480
- Van Brussel AAN, Bakhuizen R, Van Spronsen PC, Spaik HP, Tak T, Lugtenberg BJJ, Kijne JW (1992) Induction of pre-infection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipo-oligosaccharides of *Rhizobium*. *Science* 257: 70–72
- Van Spronsen PC, Bakhuizen R, Van Brussel AAN, Kijne JW (1994) Cell wall degradation during infection thread formation by the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* is a two-step process. *Eur J Cell Biol* 64: 88–94
- Vidali L, Pérez HE, Valdés VV, Noguez R, Zamudio F, Sánchez F (1995) Purification, characterization, and cDNA cloning of profilin from *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol* 108: 115–123
- Zhang DH, Wadsworth P, Hepler PK (1993) Dynamics of microfilaments are similar, but distinct from microtubules during cytokinesis in living, dividing plant cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 24: 151–155

6.0 RESULTADOS III

Respuesta del Ca^{2+} intracelular a los factores Nod

6.0 RESULTADOS III

6.1 Cuantificación de Ca^{2+} citosólico en pelos radicales de *Phaseolus vulgaris*

Para determinar si existe alguna correlación entre los influjos de Ca^{2+} en los ápices de crecimiento de los pelos radicales jóvenes y viejos realizamos análisis radiométricos para cuantificar el calcio en estos pelos. Por otro lado también era de nuestro interés determinar si existen gradientes de Ca^{2+} en los pelos radicales como en otros sistemas vegetales con ápices en crecimiento (Clarkson et al., 1988; Schiefelbein et al., 1992; Jones et al., 1995; Pierson et al., 1996, Felle et al., 1997). Para lograr esto, microinyectamos fura-2 en los pelos radicales de frijol.

Puesto que en nuestros experimentos iniciales el fura-2 unido a un dextran de 10 kD se secuestraba rápidamente en la vacuola 10 min después de haber sido microinyectado en el citoplasma (Figura 21), probamos un dextran de 70 kD el cual proporcionó mejores resultados. Este colorante unido a este dextran de 70 kD, permanece de manera estable en el citosol y permite realizar las mediciones aún 40 minutos después de que los pelos han sido microinyectados. En los pelos radicales jóvenes (30-150 μm) siempre se observa un gradiente de Ca^{2+} muy claro, que decrece en cuanto se hacen viejos a juzgar por la longitud ($> 200 \mu\text{m}$) de los mismos. En los pelos radicales jóvenes que se encuentran creciendo rápido, hemos encontrado valores alrededor de 400 nM (Figura 22).



Figura 21. Pelos radicales microinyectados con fura-2 dextranizado (10 kD). El colorante sensible a calcio se secuestra después de 10 min en la vacuola (colores amarillo, rojo y blanco). Las zonas citoplasmáticas aparecen en tonos azules y la región nuclear se indica con una flecha.



Figura 22. Gradiente de Ca^{2+} en pelos radicales de frijol microinyectados con fura-2 dextranizado (70 kD). Las células se expusieron a los oligómeros de quitina como un control negativo y éstos presentan un claro gradiente de Ca^{2+} con los valores más altos en el extremo apical ($\pm 400 \text{ nM}$). Este gradiente se encontró únicamente en la región apical y se extiende alrededor de 30 μm a partir del ápice. En ausencia de los oligómeros los resultados son similares, indicando que los oligómeros de quitina no inducen respuesta o cambios en los gradientes de Ca^{2+} .

En los pelos radiculares que no se encuentran creciendo no observamos gradiente de Ca^{2+} alguno (dato no mostrado). En la figura 22, los resultados muestran que los pelos radiculares controles (expuestos a los pentámeros), presentan un gradiente bien definido en el ápice donde el Ca^{2+} alcanza valores de 400 nM y disminuye gradualmente en los próximos 30 μm hasta 80-100 nM. En algunos casos, después de adquirir secuencias largas hacia la base, aproximadamente 30 μm después del ápice, se observaron algunos focos con niveles de Ca^{2+} ligeramente superiores al basal, pero no mayores que los valores encontrados en el ápice (Figura 22, ver punta de flecha). Los pelos radiculares que no se expusieron a los pentámeros de glucosamina mostraron un resultado similar. Esto indica que estos oligómeros no inducen respuestas celulares que pudieran mimetizar los efectos de los FNs (resultado no mostrado).

6.2 Cambios en el Ca^{2+} citosólico en respuesta a los FNs

Cuando los pelos radiculares de frijol microinyectados con el fura-2-dextran se expusieron a los FNs, el calcio intracelular aumentó dramáticamente en el ápice del pelo durante los primeros cinco minutos (Figura 23). Este incremento es de aproximadamente tres veces y los valores aumentan hasta 1500 nM en el ápice del pelo. En cuanto nos alejamos 10 μm del ápice, los niveles bajan rápidamente a los valores basales de 100 nM. Encontramos algunos focos con niveles de calcio ligeramente por arriba del nivel basal, alrededor de 200 nM en la proximidad del núcleo y en algunos puntos en el citoplasma (Figura 23, ver flecha).

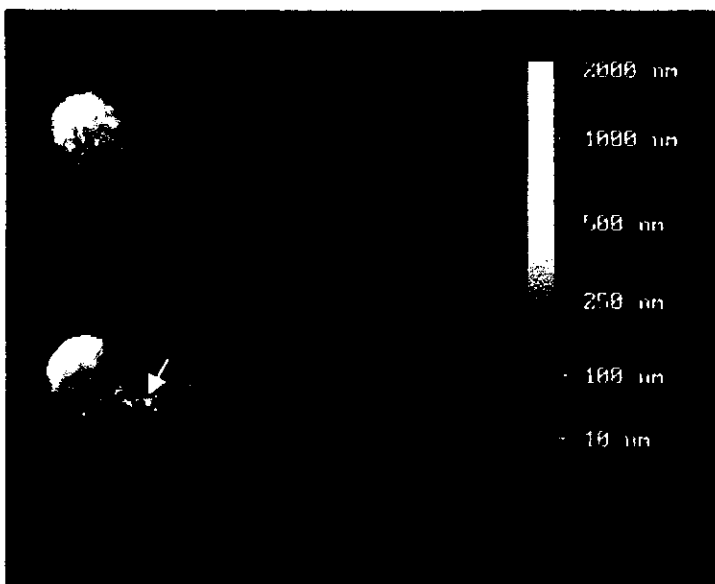


Figura 23. Respuesta del Ca^{2+} citosólico a los factores Nod. Las células microinyectadas con fura-2 se expusieron a los factores Nod. En los primeros 5 minutos después de aplicar los factores Nod, los niveles basales de Ca^{2+} (400 nM) incrementaron hasta valores de 1.5 μM . Este incremento en Ca^{2+} se encuentra localizado únicamente en el extremo apical.

Se observaron cambios en el Ca^{2+} citosólico con diferentes patrones después de 15 min, éstos corresponden a los ya descritos previamente en la Figura 23. Esto es un fino gradiente de Ca^{2+} en el ápice del tubo de alrededor de 1500 nM; las fluctuaciones en el gradiente con valores de 400 a 1800 nM (Figura 24) y finalmente, elevaciones muy claras en la vecindad del núcleo (Figura 25). Esta última respuesta se caracterizó por patrones de fluctuaciones, desde valores basales hasta picos de 800 nM. En algunos casos, se observaron focos con altos niveles de Ca^{2+} dentro de la región apical del pelo radicular. En la figura 24 se muestra una secuencia de 14 imágenes adquiridas cada 3 segundos y en la que se pueden observar muy claramente estos focos de alta concentración de Ca^{2+} . Esta área del ápice del pelo radicular es muy activa en la movilización de calcio. Algunos focos llegan a presentar niveles de Ca^{2+} de 1200 nM y algunas veces de alrededor de 1800 nM (Figura 24, ver flechas en a y b). Es interesante notar que algunos de estos puntos aparecen 3 segundos después con los niveles basales de 100 nM (Figura 24, ver punta de flechas). Esto indica que este ion se moviliza por algún mecanismo de secuestro o exclusión del citosol. Hemos encontrado que el área alrededor del núcleo es una zona muy activa en la movilización de Ca^{2+} , incrementando desde los niveles basales de 100 nM hasta 1000 nM (Figura 25, ver punta de flecha).

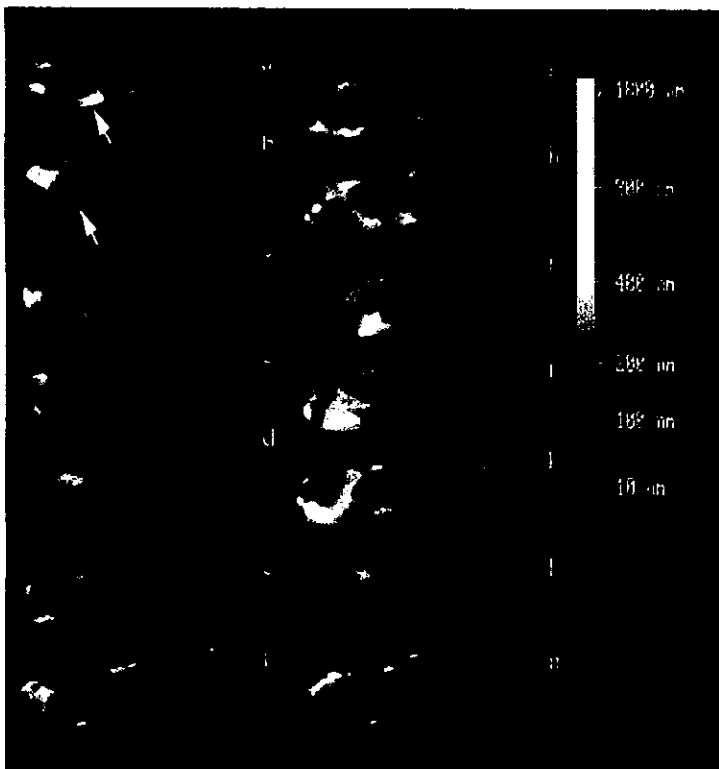


Figura 24. Respuesta del Ca^{2+} citosólico después de 10 minutos de exponer a los factores Nod. En este momento, los pelos radiculares presentan una respuesta muy activa en la región apical. Esta respuesta está dada por algunos focos con alto contenido de calcio que se originan en el ápice y se mueven en esta área. Aquí mostramos una secuencia de 13 imágenes (de a hasta m) que se adquirieron cada 3 segundos para describir la dinámica y respuesta del calcio intracelular en respuesta a los factores Nod. Esta respuesta muestra una rápida movilización de Ca^{2+} que se origina en el ápice y está formada por focos con alta concentración de Ca^{2+} (color rojo). En algunos casos, estos focos que pueden encontrarse en la vecindad de la vacuola, disminuyen su contenido de Ca^{2+} a niveles basales en un tiempo de 3 segundos (a y b, ver flechas).

El área alrededor del núcleo constituye una zona muy activa en la movilización de Ca^{2+} , incrementando desde los niveles basales de 100 nM hasta 1000 nM (Figura 25, ver punta de flecha). Este último resultado es similar a lo reportado por Ehrhardt y colaboradores (1996), con la salvedad de que los datos aquí reportados muestran cambios en la concentración de Ca^{2+} en el ápice del pelo, siendo esta respuesta de mayor magnitud que la encontrada en el área nuclear (Figura 25, ver flecha).

Los datos obtenidos sugieren fuertemente que la respuesta del Ca^{2+} citosólico después de la adición de los FNs puede estar dada por los inlfujos de Ca^{2+} en el ápice. Sin embargo, no descartamos la liberación de calcio de reservorios intracelulares, a juzgar por los focos de alto contenido de Ca^{2+} en diferentes zonas del pelo. Estos podrían tener su origen intracelular en el retículo endoplásmico, en mitocondria o en vacuola. De acuerdo con estos resultados, decidimos cuantificar la concentración de calcio extracelular y su posible papel como fuente de Ca^{2+} .

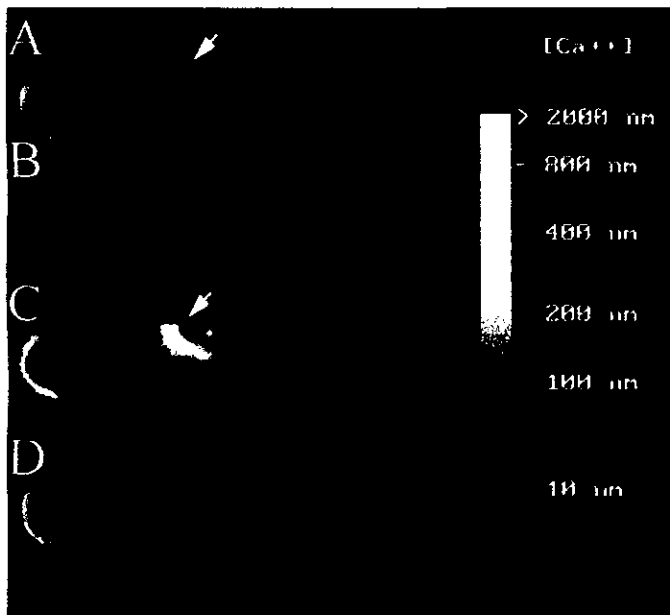


Figura 25. Fluctuaciones en Ca^{2+} después de 15 minutos de haber tratado con los factores Nod. Aquí mostramos una sola célula con una alta concentración de Ca^{2+} en la región perinuclear, éste efecto se acompaña con una clara respuesta en la región apical. Las imágenes se tomaron cada 3 segundos y corresponden al mismo pelo radicular. A, muestra incrementos en Ca^{2+} en el área perinuclear (ver flecha) y el ápice. B, muestra como estos niveles en Ca^{2+} bajan inmediatamente después; C, muestra nuevamente los incrementos en Ca^{2+} en el ápice (ver flecha) y en la región perinuclear y D, nuevamente una baja en estas concentraciones de Ca^{2+} . El ápice presenta valores de hasta 1000 nM, y el área nuclear de 800 nM.

6.3 Cuantificación de Ca^{2+} extracelular en pelos radiculares

Los flujos de Ca^{2+} extracelular se midieron y mapearon a lo largo de los pelos radiculares en crecimiento y en aquellos que no lo están, con un microelectrodo ion específico (ver métodos). Los oligómeros de quitina (pentámeros) se usaron nuevamente como control, observándose que estas moléculas no inducen ninguna respuesta semejante a la inducida por los FNs. Los pelos radiculares que crecen en la presencia del oligómero presentan un inlfujo de Ca^{2+} característico, de alrededor de

13 pmoles/cm²/seg, dentro de una zona de 0-30 μm partiendo del ápice del pelo (Figura 26, controles; Figura 27A).

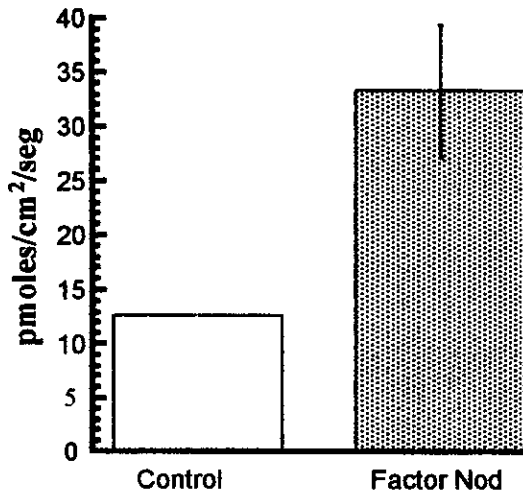


Figura 26. Efecto de los factores Nod de *R. etli* sobre los influxos de corrientes de Ca²⁺ en pelos radiculares de frijol. Se tomaron 10 pelos radiculares controles en presencia del pentámero de quitina y 13 pelos radiculares en presencia de los factores Nod. Los resultados se muestran en la figura.

El influxo de calcio se encuentra localizado claramente en el ápice (Figura 27 C). Todas las otras áreas del pelo no presentan ningún influxo de Ca²⁺. Los pelos que crecieron en ausencia del oligómero presentan influxos similares, de alrededor de 33 pmoles/cm²/seg, indicando que estas moléculas efectivamente no alteran el influxo de calcio en los pelos radiculares y por lo tanto constituyen un control adecuado.

6.4 Cuantificación de los influxos de Ca²⁺ en pelos radiculares que responden a los FNs.

Después de tratar a los pelos radiculares con los FNs, los influxos de calcio en el ápice se ven aumentados de manera notable. Estos influxos de Ca²⁺ se incrementan a partir de los niveles registrados en las células controles, éste es de 13 pmoles/cm²/seg hasta 33 pmoles/cm²/seg (Figura 26, Factor Nod, 27B) o incluso mayor en algunos casos y en un tiempo de 5-10 min después del tratamiento. Esta respuesta permanece en tanto los FNs estén presentes en el medio. Cinco minutos después de remover los FNs podemos ver que estos influxos elevados empiezan a descender hasta alcanzar los niveles basales (13 pmoles/cm²/seg, dato no mostrado). Esto indica que la molécula activa debe estar presente de manera continua en el medio para mantener la respuesta. Por lo tanto los resultados de cuantificación de calcio extracelular correlacionan con nuestros resultados obtenidos previamente de calcio intracelular.

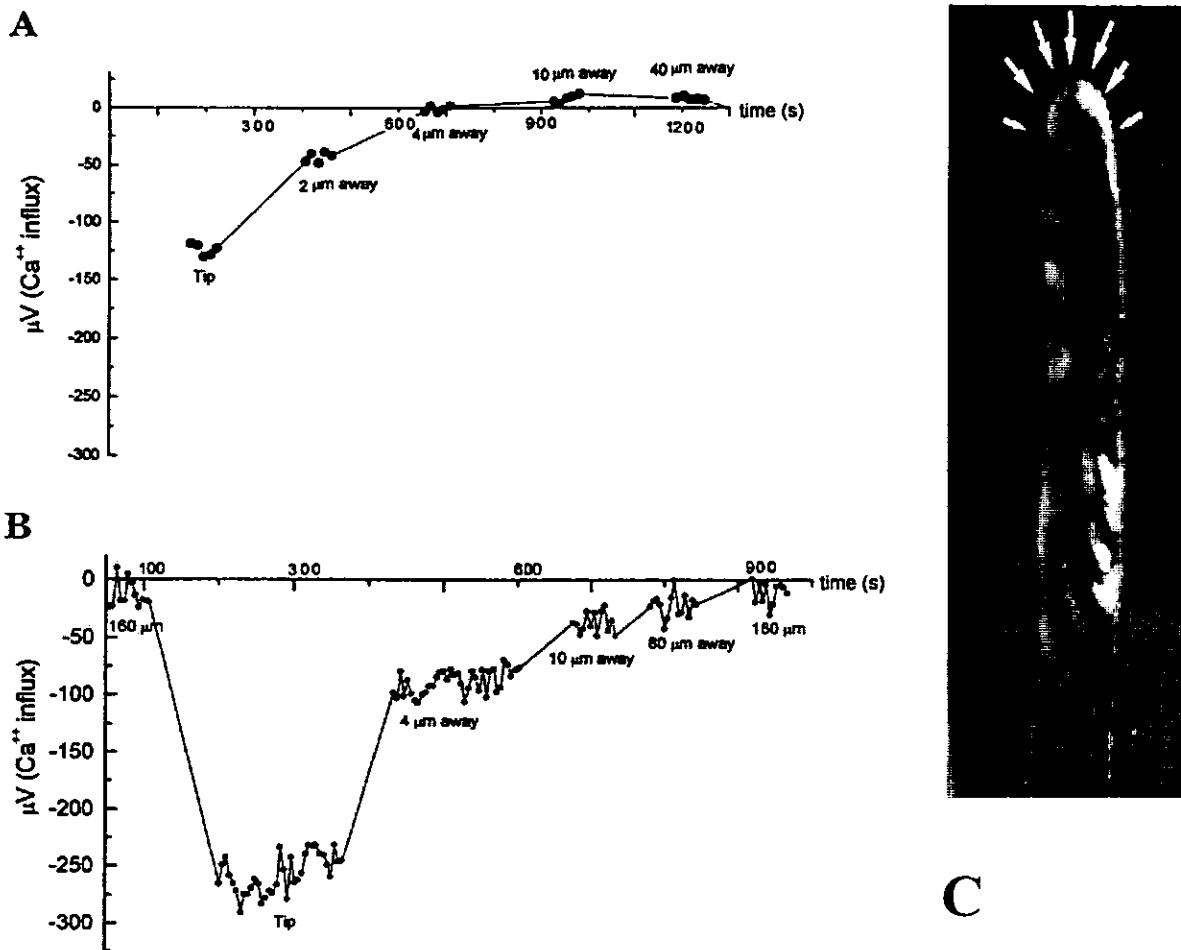


Figura 27. Gráficas que muestran los influjos de corrientes de Ca^{2+} obtenidas a diferentes distancias del ápice mediante el uso de un microelectrodo específico para este ion (*vibrating probe*) para determinar el tamaño de la corriente. A, muestra los valores no procesados encontrados en los pelos controles (microvolts).. B, muestra la misma situación pero en presencia de los factores Nod. C, muestra un pelo radicular con los vectores indicando las direcciones de los influjos de calcio.

Como resultado de los datos obtenidos con el microelectrodo vibrador (*vibrating probe*), resulta posible la determinación del tamaño de la fuente de calcio en el extremo apical. Para ésto, se obtuvieron los siguientes resultados tomando los valores de mediciones del influjo de calcio a diferentes distancias desde el ápice que se muestran en la figura 27 A y B en la forma descrita en la metodología: en los pelos controles existe un tamaño de la fuente de calcio de alrededor de $2.2 \mu\text{m}$ ($-31 \mu\text{V}$) en tanto que en los pelos radiculares expuestos a los factores Nod presentan un incremento a $4.5 \mu\text{m}$ ($-49 \mu\text{V}$) como se describe en la figura 27. Este aumento en

la fuente de calcio nos permite explicar muchos de los resultados observados y que se discutirán en la sección de discusión.

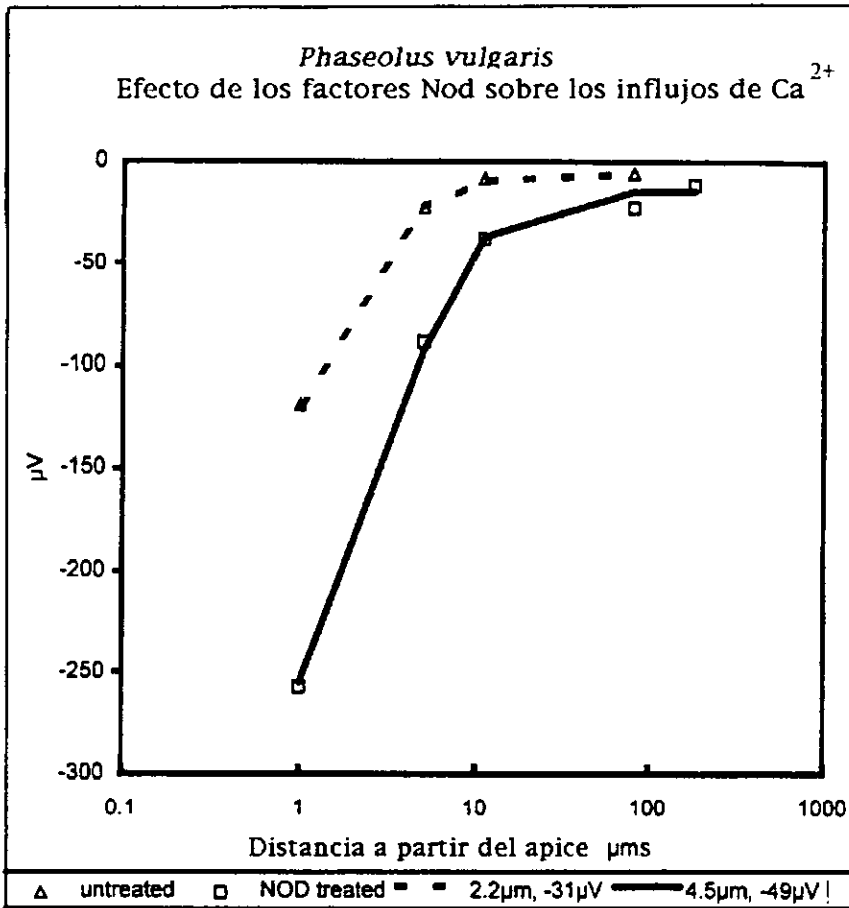


Figura 28. Estimación del tamaño de la corriente de Ca^{2+} en el ápice. En los pelos controles existe un tamaño para la corriente de 2.2 µm y un valor de 4.5 µm para los pelos radiculares que responden a los factores Nod.

6.6 Publicación (sometido a The Plant cell)

Cárdenas, L., Feijo, J.A., Kunkel, J., Sánchez, F., Hepler, P., and Quinto, C. (1998). *Rhizobium* Nod Factors Induce Increases in Intracellular Free Calcium and Extracellular Calcium Influxes in Bean Root Hairs. (1998).

***Rhizobium* Nod Factors Induce Increases in Intracellular Free Calcium and Extracellular Calcium Influxes in Bean Root Hairs.**

Luis Cárdenas^a, José A. Feijó^b, Joe G. Kunkel^c, Federico Sánchez^a, Terena Holdaway-Clarke^c, Peter K. Hepler^c and Carmen Quinto^{a,1}

^aDepartamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, UNAM. Apartado Postal 510-3, Cuernavaca Morelos 62271, México

^bDepartamento de Biología Vegetal, Facultad de Ciencias de Lisboa, Bloco C2, 1700 Lisbon, Portugal

^cBiology Department, Morrill Science Center, University of Massachusetts. Box 35810, Amherst MA 01003-5810, USA

¹To whom correspondence should be addressed

ABSTRACT:

Application of Nod factors to growing, responsive root hairs of the bean *Phaseolus vulgaris* induces marked changes in both the intracellular cytosolic free calcium (Ca^{2+}) and in the influx of extracellular Ca^{2+} . The intracellular $[Ca^{2+}]$, which has been measured by ratiometric imaging in cells microinjected with fura-2-dextran (70 kD), elevates within 5 min from ~ 400 nM to ~ 1,500 nM in localized zones in the root hair apex. Of particular note is the observation that the elevated regions of $[Ca^{2+}]$ appear to shift position during short time intervals. Increases in and fluctuations of the intracellular $[Ca^{2+}]$ are also observed in the perinuclear region after 10-15 min treatment with Nod factors. The extracellular Ca^{2+} flux, detected with the non-invasive, ion specific vibrating electrode, is inwardly directed and also increases quickly in response to Nod factors from 100 μV to 250 μV . Chitin oligomers, which are structurally similar but biologically inactive when compared to the active Nod factors, fail to elicit changes in either intracellular or extracellular Ca^{2+} . The similar timing and location of the intracellular elevations and the increased extracellular influx provide support for the idea that Ca^{2+} participates in secretion and cell wall remodeling, which occur in anticipation of root hair deformation and curling.

INTRODUCTION:

Species of the genera *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Azorhizobium*, are Gram-negative soil bacteria that elicit the development of root (and sometimes stem) nodules on plant hosts, which the bacteria inhabit as nitrogen fixing endosymbionts (Brewin, 1991; Hirsch, 1992; Mylona *et al.*, 1995). The plant roots secrete signals, usually flavonoids, that activate a set of rhizobial *nod* genes. These are then responsible for the synthesis of lipochitin-oligosaccharides (LCOs), the Nod factors, which signal back, and activate early nodule development in the host plant (for reviews: Schultze *et al.*, 1994; Mylona *et al.*, 1995; Dénarié *et al.*, 1996). There are many processes associated with nodule morphogenesis that Nod factors alone can trigger including alteration in root hair morphology (Lerouge *et al.*, 1990; Spaink *et al.*, 1991; Price *et al.*, 1992; Sanjuan *et al.*, 1992; Schultze *et al.*, 1992; Mergaert *et al.*, 1993; Heidstra *et al.*, 1994), changes in plant gene expression (Horvath *et al.*, 1993; Journet *et al.*, 1994; Cook *et al.*, 1995), cortical cell dedifferentiation and mitosis (Spaink *et al.*, 1991; Truchet *et al.*, 1991; Relic *et al.*, 1993), depolarization of root hair cells' membrane potential (Ehrhardt *et al.*, 1992; Felle, *et al.*, 1995; Kurkdjian, 1995), actin cytoskeleton rearrangements (Allen *et al.*, 1994; Cárdenas *et al.*, 1998) and, in some instances, the formation of mature structures resembling authentic nodules (Truchet *et al.*, 1991; Mergaert *et al.*, 1993; Stokkermans and Peters, 1994; Cárdenas *et al.*, 1995).

Despite this array of activities it is nevertheless an unanswered question how the Nod factors induce these events. For several reasons it seems reasonable to implicate changes in calcium ion concentration ($[Ca^{2+}]$) as being part of the signal transduction process. Not only does Ca^{2+} participate generally in a wide number of plant cell responses (Felle *et al.*, 1988, Bush, 1993; Gilroy *et al.*, 1993; Poovaiah and Reddy 1993; Webb *et al.*, 1995; Felle and Hepler, 1997), but evidence indicates that it may be involved specifically in the bacterial infection process in legume roots (Munns 1970, Sethi and Reporter 1981). Evidence includes the observation in root hairs of alfalfa, following exposure to Nod factors, of changes in the extracellular currents of H^+ and Ca^{2+} (Allen *et al.*, 1994), and an oscillatory spiking of the intracellular Ca^{2+} in the perinuclear region (Ehrhardt *et al.* 1996). Curiously, the later studies failed to denote an apical intracellular Ca^{2+} gradient or modulation thereof, despite the increasing number of reports which indicate that these gradients are common features of growing root hairs (Clarkson *et al.* 1988, Schiefelbein *et al.*, 1992; Jones *et al.*, 1995; Felle and Hepler, 1997, Gilroy, 1997).

More recent studies that provide direct evidence for a role for Ca^{2+} in Nod factor-induced root hair deformation derive support from different approaches. Felle *et al.* (1998), using ion selective electrodes to measure the $[Ca^{2+}]$ in the extracellular space, show that the concentration drops within seconds following application of Nod factor, consistent with an influx of the ion into the cytosol. Furthermore, similar changes in the membrane potential and extracellular concentrations of H^+ , Cl^- , K^+ are induced by application of either Nod factor or the Ca^{2+} ionophore A23187 (Felle *et al.*, 1998). Of particular relevance are two studies using fluorescent ion imaging that report apical changes in the cytosolic $[Ca^{2+}]$ as a result of Nod factor application (Gehring *et al.*, 1997; de Ruijter *et al.*, 1998). The first describes the occurrence of plateau-like increases in the intracellular $[Ca^{2+}]$ in *Vigna* root hairs, which remain high for a few minutes then fall to basal levels (Gehring *et al.*, 1997). However, in this study, which has used acetoxymethyl esters of fura-2 and fluo-3 as Ca^{2+} indicators, it is not clear that the dyes are located in the cytoplasm; indeed, given the immediate decline in the signal upon the addition of EGTA (Gehring *et al.*,

1997) in seems highly plausible that the reported changes are in reality emanating from the cell wall space. A more compelling observation has been made by de Ruijter *et al.* (1998), who have used acid loading of indo-1 and show that the apical $[Ca^{2+}]$ increases 6-10 fold in root hairs of *Vicia sativa*, which have been treated with Nod factor. However, in this last study, the first observation is after 70 min incubation in Nod factor, and thus does not show the early events.

While it seems likely that the intracellular $[Ca^{2+}]$ elevates in response to Nod factor, and further participates as part of the signal transduction pathway, there are nevertheless uncertainties especially about when and where the early changes occur, and how they lead to root hair deformation. With the view that more information would be helpful, we have isolated and purified Nod factors from *Rhizobium elii* (Cárdenas *et al.*, 1995), and herein report their effect on both cytosolic Ca^{2+} and extracellular Ca^{2+} current influxes in *P. vulgaris* (a legume forming determinate nodules). Using ratiometric imaging for intracellular Ca^{2+} , and the ion-specific vibrating electrode for the extracellular Ca^{2+} currents, we show large changes that occur within the first few minutes in root hairs responding to Nod factors.

RESULTS:

Nod factors biological activity on root hairs

P. vulgaris root hair cells were treated with chitin oligomers or Nod factors as described in the methods, and visualized under the light microscope after Nod factors application. Since chitin-oligosaccharide molecules are structurally related to Nod factors and express biological activity on some plant cells (Boller, 1995), we included one, namely the pentamer of *N*-acetylglucosamine, which does not produce a biological response in *P. vulgaris*, as a control agent in all the experiments. Treatment of root hairs with active Nod factors (10^{-8} M), as shown in Figure 1, panels B and C, induces a distinct swelling response at the tip of the hair. Usually these swelling responses are observed after 1 hr, but they continue for the next 2 hrs. A more striking result is shown in Fig. 1, panels D, E and F, where new polarized growth points, bifurcations and curling, are noticed, respectively. These marked changes in morphology were sometimes observed after 3 hrs exposure to Nod factors, but more often after 4 hrs. The root hairs responding to the Nod factors corresponded to the regions determined by Heidstra *et al.* (1994) as zone II, or newly mature root hairs. In Fig. 1, panel A, we show that no biological responses were observed when the root hairs were exposed to the control chitin oligomer, at the same concentration used for Nod factors.

Measurement of cytosolic $[Ca^{2+}]$ in root hairs of *Phaseolus vulgaris*; effects of Nod factors:

To determine the cytosolic $[Ca^{2+}]$ in the root hairs and to probe for localized gradients we have performed ratiometric dye measurements (Pierson *et al.*, 1996, Felle and Hepler, 1997). From extensive experience in other cell types, including root hairs of *Sinapis* (Felle and Hepler, 1997), we have found that dextranated indicator dyes are virtually essential in order retain the dye in the cytoplasmic compartment and to prevent its sequestration into vacuoles or extrusion from the cell. We therefore initially used fura-2 linked to a 10 kD dextran molecule, but surprisingly found that within 10 min even this became sequestered into the vacuole. We therefore shifted to a 70 kD form of fura-2, and found that this remained cytoplasmic for over 1 hr.

In younger root hair cells (30-150 μ m) we always observed a clear calcium gradient at the apex that decreased as the hair became older as determined by the increase in length (> 200 μ m).

We also performed ratiometric Ca^{2+} measurements in growing and non-growing root hair cells at different stages. Younger growing root hair cells possessed a distinct apical Ca^{2+} gradient (Fig. 2), whereas non-growing hairs did not (data not shown). As shown in Figure 2, a control treated root hair exhibits an apical Ca^{2+} gradient that reaches ~ 400 nM at the tip, and descends to basal levels of 80-100 nM within 30 μm from the tip. In some instances, slightly elevated Ca^{2+} spots (150nM) were observed at variable distances from the tip (Figure 2, see arrow head). Root hair cells exposed to the control chitin oligomers showed similar results to untreated controls, indicating that the chitin oligomers do not induce a cellular response that mimics the effect of the Nod factors (data not shown).

When root hair cells loaded with fura-2-dextran were exposed to Nod factors, increases in the intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ at the apex were clearly observed in 7 of 10 cells examined; an example is shown in (Fig. 3). A nearly four fold elevation in the $[\text{Ca}^{2+}]$, (~ 1500 nM), was observed over the control within the first 5 min at the extreme apex of the hair. Thus, a very steep gradient in $[\text{Ca}^{2+}]$ emerged, which decreased sharply to basal levels of ~ 100 nM within 10 μm from the tip. In the vicinity of the nucleus and scattered around the cytoplasm occasional spots of slightly higher Ca^{2+} levels (200 nM) were found (Fig 3, see arrow head).

After 15 minutes, changes in cytosolic Ca^{2+} followed different patterns. As previously described (Fig. 3), a sharp gradient of Ca^{2+} , with a high point of ~ 1500 nM, occurred at the tip. In addition, fluctuations of this tip gradient from 400 to 1800 nM (Fig. 4) were noted, as well as marked elevations of Ca^{2+} within the vicinity of the nucleus. Using sequential imaging at short time intervals we further observed fluctuations in the $[\text{Ca}^{2+}]$ in local regions (Figs. 4, 5), which created "hot spots"; these could arise in the apical region or in the vicinity of the nucleus. Figure 4 is a sequence of 14 images acquired at 3 sec intervals that displays these Ca^{2+} hot spots, and shows their dynamic behavior during a relatively short time period. These images show that localized regions quickly appear in which the $[\text{Ca}^{2+}]$ extends up to 1200 nM to 1800 nM (Figure 4, see arrows), but then suddenly drops to basal levels of 100 nM (Fig 4, see arrow heads).

In addition, the nuclear area shows dramatic changes in the intracellular Ca^{2+} with increases in the ion concentration from 100 nM to 1000 nM being observed (Fig. 5, see arrows). This result is similar to that reported by Ehrhardt *et al.*, (1996) but, with the important difference that, at the same time these root hairs displayed changes in the $[\text{Ca}^{2+}]$ in the vicinity of the nucleus they were also showing equivalently large changes in the apical region (Fig. 5, see arrow head).

Extracellular Ca^{2+} influx measurements in root hairs; effects of Nod factors:

Extracellular Ca^{2+} fluxes were measured and mapped along growing and nongrowing root hairs with a noninvasive ion selective vibrating probe (see methods). Application of this method to untreated root hairs and those challenged with the inactive chitin oligomer revealed the presence of inward fluxes of Ca^{2+} with a magnitude of 13 pmoles/cm²/sec (Fig. 6). Of particular note the influx was localized to the apex of the root with no signal being detected at any other region. Again, the lack of response by the structurally similar chitin oligomers emphasizes the efficacy of these molecules as control agents.

After treatment with Nod factors, an altered pattern of apical Ca^{2+} influx was observed. Within 5-10 min and remaining as long as the Nod factors were present in the medium, the Ca^{2+} influx increased from 13 pmoles/cm²/sec to 33 pmoles/cm²/sec or higher (Fig. 6.). However, 5 min after removal of the Nod factors from the medium, the rate of apical Ca^{2+} influx returned to

basal levels 13 pmoles/cm²/sec, demonstrating that the active molecules must be continuously present in the medium to maintain these responses (data not shown).

By moving the electrode known distances away from the tip and recording the decline in signal it is possible to infer the size of area into which the Ca²⁺ influx occurs. Studies on both control and Nod factor-treated root hairs indicate the influx of Ca²⁺ is highly localized in the apical dome. Specifically the data allow us to infer that the area of Ca²⁺ influx in control root hairs is 2.2 μm in diameter, and that this increases to 4.5 μm in cells responding to Nod factors (Fig. 9).

DISCUSSION:

Application of active Nod factors to growing root hairs of the bean, *Phaseolus vulgaris*, causes an increase both in the intracellular [Ca²⁺], as measured by ratiometric imaging, and in the inwardly directed extracellular flux of Ca²⁺, as detected with the ion selective vibrating electrode. These changes in Ca²⁺, which are not generated by the structurally similar but inactive chitin oligomers, occur quickly, being evident usually within 5 min, and are maintained for over an hour as long as the active Nod factors are present. In addition, these changes are localized mainly to the apex of the root hair, although increases in the intracellular [Ca²⁺] are also observed after some minutes in interior regions of the root hair apical cytoplasm and in the vicinity of the nucleus.

The changes of intracellular [Ca²⁺] follow a complex pattern, especially during the first 5 min, that has not been described heretofore. Firstly, however, it is important to note that the responsive root hair, prior to treatment, exhibits a modest, but nonetheless distinct, apical gradient in which the [Ca²⁺] reaches ~ 400 μM at the tip and declines to basal level of ~ 100 μM within 30 μm. Thereafter, following application of Nod factors, the apical Ca²⁺ rises quickly to 1500 μM. Of special interest is the observation that as time progresses the high region of Ca²⁺ does not remain statically at one locus, but instead moves about within the apical zone. Thus, during sequential imaging at 3 sec intervals, it is possible to observe a particular locus rise to 1200-1800 μM and then fall to basal level within a few sec. The structural observations indicate that these "hot spots" need not be associated with the plasma membrane, but that they can occur at interior cytoplasmic locations, although normally confined to the apical region of the root hair. Finally, elevations and fluctuations in the intracellular [Ca²⁺] have been observed in the perinuclear region, in agreement with the finding of Ehrhardt *et al.* (1996).

The changes in extracellular Ca²⁺ influx are also rapid in time and dramatic in magnitude following application of Nod factors. Although Allen *et al.* (1994) have reported changes in the Ca²⁺ current in root hairs of alfalfa following Nod factors, these were relatively small, with -6.5 μV in control root hairs and -11 μV in those treated with Nod factors. In addition, these changes were sometimes expressed as an efflux, rather than influx. In bean root hairs we consistently observe an influx that increases in magnitude from 113 pmoles/cm²/sec to 33 pmoles/cm²/sec within 5 minutes. It is unlikely that the changes in Ca²⁺ noted herein are related to the depolarization in membrane potential, since in alfalfa root hairs the Ca²⁺ response occurs prior to membrane depolarization (Ehrhardt *et al.*, 1996; Felle *et al.*, 1998).

When taken together there is remarkable agreement between the intracellular and extracellular Ca²⁺ results, with the ion in each compartment undergoing marked changes shortly after the application of Nod factors and with the ion activity for each being focused primarily at

the tip of the root hair. We think that there is a likely causal relationship, however we hasten to add that there is not necessarily a one-to-one accounting between these different expressions of Ca^{2+} . For example, some of the rise in intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ may derive from release from internal stores, e.g., from endoplasmic reticulum or the nuclear envelope in the region of the nucleus, rather than just influx from the extracellular environment (Ehrhardt *et al.* 1996). Similarly some of the extracellular influx may not be crossing the plasmalemma, but rather entering the wall space due to Nod factor-induced changes in the ion-binding properties of the cell wall. For example, the marked remodeling of the cell wall, which must occur as part of root hair deformation and curling, could involve changes in the pectic and other wall components that increase the local affinity for Ca^{2+} (Carpita and Gibeaut 1993). Unfortunately the vibrating electrode cannot distinguish between ion entry into the cell wall domain and ion movement across the plasmalemma (Holdaway-Clarke *et al.* 1997). However, Felle *et al.* (1998) show that application of the Ca^{2+} channel-blocker Nifedipine prevents decrease in extracellular $[\text{Ca}^{2+}]$, indicating that wall absorption is not the main cause of Ca^{2+} influx at the tip. Further investigation will be required to determine what contribution, if any, the wall space makes to total Ca^{2+} influx in root hairs.

The quantitative measurement of both intracellular and extracellular Ca^{2+} permits us to model their relationship, and generate a deeper understanding of regulatory processes. If we assume that the root hair is a cylinder, and that the diffusion of Ca^{2+} is $1 \times 10^{-7} \text{cm}^2/\text{sec}$, using measured values of $2000 \mu\text{M}$ for the high point of the gradient and the exponential decline, we can calculate, from Fick's Law, that the gradient will require an entry of approximately $1 \text{ pmoles}/\text{cm}^2/\text{sec}$ to be maintained. For lesser gradients with peaks at $500 \mu\text{M}$, a flux of $0.2 \text{ pmoles}/\text{cm}^2/\text{sec}$ would be required. Measurement of the extracellular flux, produces values substantially in excess of that figure, indicating that Ca^{2+} entering the cell must accumulate in some compartment, perhaps binding to the cell wall, or being sequestered into internal stores by capacitative Ca^{2+} entry. Given the contrary observations of Felle *et al.* (1998), showing that wall absorption is likely to be a minor component, further work is needed to determine which intracellular compartment is the destination of Ca^{2+} entering at the tip.

In considering the significance of the results provided in this study, it becomes important to compare them to previously published work. There have only been a few other studies thus far, and while the emerging conclusion is that Nod-factors cause a rise in intracellular Ca^{2+} , the details of these studies differ substantially from each other and from that provided herein. Ehrhardt *et al.* (1996), for example, provided compelling evidence for the occurrence of Nod-induced Ca^{2+} "spikes" in the vicinity of the nucleus, but offer no evidence for an apical Ca^{2+} gradient in root hairs of alfalfa. However, inspection of Fig. 3 in Ehrhardt *et al.* (1996) indicates that the root hair in this example is not growing, possibly accounting for the lack of an apical gradient. These matters are additionally perplexing, given the previous demonstration by Allen *et al.* (1994) of Ca^{2+} -specific currents, and changes therein, associated with the root hairs of the same species. By contrast the results presented here reveal that the apex of the bean root hair is the dominant location for changes in Ca^{2+} following application of Nod-factors. While there are changes in the vicinity of the bean root hair nucleus, as with alfalfa, these appear later than the apical changes.

A more recent study of *Vigna* root hairs allows that active Nod-factors induce a rapid "plateau-like" increase in intracellular Ca^{2+} (Gehring *et al.*, 1997). However, the results presented to support their conclusion are fraught with substantial problems. Gehring *et al.* (1997) use the

acetoxymethyl ester form of both fura-2 and fluo-3, but fail to take into account the likelihood that perhaps a significant percentage of the dye is cleaved by extracellular (wall bound) esterases and never enters the cell. That the above criticism has merit derives from their published graphs (Fig. 3A, D; Gehring *et al.*, 1997) showing that the alleged intracellular Ca^{2+} signal, which is elevated in response to Nod-factors, declines to basal level within a few sec after the addition of EGTA. Correspondingly, the application of extracellular Ca^{2+} caused a rapid increase in the signal. The rapidity of these secondary responses, together with the realization that intact plasma membranes are quite impermeable to either EGTA or Ca^{2+} , lends strong support to the conclusion that the changes in $[\text{Ca}^{2+}]$ being reported are largely derived from the extracellular compartment. It should also be noted that the results obtained with the two dyes are quite different with the fura-2 signal rising fast, but then declining to basal level in 13-15 min while the fluo-3 signal continues to rise beyond 15 min. Finally, the imaging fails to provide evidence for an apical gradient or for the kinds of precisely localized events as shown herein.

The study of de Ruijter *et al.* (1998) provides evidence in good agreement with that reported herein. Using indo-1 they are able to show cytoplasmic loading of the dye in root hairs of *Vicia sativa*. Of particular note is the demonstration of large apical increases in cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$ following Nod factor application, in root hairs that have started to deform. However, due to technical limitations, stemming from the time that it takes to load indo-1, they were restricted to events 70 min and later after the incubation in Nod factors, and were not able to detect the early changes, as reported herein. Also, as noted by the authors, the dye in the cells thus loaded tended to bleach rapidly, preventing them from making recordings of the $[\text{Ca}^{2+}]$ for longer than 1-5 minutes.

Recent work by Felle *et al.* (1998) in which changes in the extracellular concentrations of Ca^{2+} are reported, with the idea that both the extracellular influx and intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ change in response to Nod factors, it is important to probe the function of the ion. For intracellular Ca^{2+} there is substantial support for the conclusion that the ion facilitates secretion (Almers, 1990; *et al.*, Creutz, 1992; Gilroy and Jones, 1992; Llinas *et al.*, 1992; Zorec and Tester, 1992; Battey and Blackbourn, 1993; Blackbourn and Battey, 1993). Here it is worth noting the parallels to growing pollen tubes and hyphae, highly polarized, rapidly extending cells that possess a marked elevation of Ca^{2+} at the locus of vesicle fusion (Garrill *et al.*, 1993; Pierson *et al.*, 1996). Although root hairs grow more slowly than pollen tubes or hyphae, nevertheless the presence of an apical gradient that associates closely with the region of polarized growth, and the fact that the gradient is absent in non-growing root hairs, provides support for the close connection between elevated intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ and growth-dependent secretion. In addition, the apparent mobility of the Ca^{2+} "hot spots", observed 15 min or so after application of Nod-factors, fits well with the process of apical deformation. Here it is reasonable to postulate a scenario in which the mobile "hot spots", perhaps produced by calcium-induced calcium release (CICR) from internal stores, generate patches of deposited wall material, accounting for the evident deformation of the cell apex and loss of polarity.

Elevated intracellular Ca^{2+} would also be expected to alter the structure and organization of the cytoskeleton. There is emerging evidence that the actin microfilaments, which extend as long cables in untreated root hairs, are markedly fragmented within 5-10 min following the application of Nod-factors (Cárdenas *et al.*, 1998). These observations are consistent with the activation of a Ca^{2+} -sensitive, actin-binding protein, such as gelsolin, which will fragment the existing bundles (Janmey *et al.*, 1995). There might be similar effects on microtubules, but these

have not yet been documented. In any event, the rapid loss of the highly organized actin microfilament organization will also contribute to the momentary loss of cell polarity and the induction of a new developmental program that leads to root hair deformation and curling, which are necessary for bacterial infection.

Finally, it is possible that elevated intracellular Ca^{2+} modulates gene expression. The changes in the vicinity of the nucleus, noted herein and more thoroughly by Ehrhardt *et al.* (1996), are well positioned for such an effect, however, it must be emphasized that these temporally follow the marked changes in $[\text{Ca}^{2+}]$ observed in the apex of the root hair, and might therefore be of lesser importance, or follow a secondary pathway for recognition of Nod factors, as proposed by Felle *et al.* (1996).

In conclusion we provide evidence for profound changes in both the intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ and the extracellular Ca^{2+} influx in root hairs of *Phaseolus* responding to Nod-factors. It seems clear, though, given the obvious differences between the published accounts, that much more work is needed. One consideration is the realization that all studies thus far have been done on different species. Alfalfa, for example, produces nodules that are indeterminate in growth while those of *Phaseolus* and *Vigna* are determinate. Nevertheless, it is reasonable to expect a greater degree of agreement in the data than has been realized thus far. In the current results from *Phaseolus* there is the attractive feature that the Ca^{2+} changes temporally precede and spatially correspond to the part of the root hair that undergoes marked changes in morphology. A connection between the anticipatory Ca^{2+} changes and the subsequent cell shape deformation seems inescapable.

METHODS:

Plant Material

Seeds from *Phaseolus vulgaris* cv Negro Jamapa were surface sterilized with hypochlorite solution at 20 % (v:v) during 5 min and then with absolute ethanol for 1 min, followed by 5 washes to remove residual hypochlorite and ethanol. Sterilized seeds were germinated aseptically in petri dishes containing a filter paper that was previously wetted to ensure germination.

Mounting living root hairs

Two day old seedlings were adapted to liquid medium containing 0.05 mM CaCl_2 , 2.5 mM MES (pH 6.2); after 8 h, root hairs were usually well adapted and growing fast, e.g., 0.4 $\mu\text{m}/\text{min}$. Intact seedlings containing the growing root hairs were mounted in chambers constructed on glass cover slips forming a well and visualized under the microscope (Diaphot 300, Nikon) with a 40X water immersion lens, N.A 0.75 (Zeiss, Germany). No mounting substance was needed and the well was filled with approximately 0.5 ml of the same medium, which was replaced every 15 min to maintain the same $[\text{Ca}^{2+}]$ during the microinjection procedure.

Injection of Indicator Dye

Microneedles were pulled in a vertical pipette puller (Kopf model 700D, David Kopf Instruments, CA) from filamented capillaries. Fura-2 conjugated to 70,000 MW dextran (Molecular Probes; Eugene, OR), was prepared as a 20 μM stock solution in water. Before use,

this was sonicated and spun at 5,000 X g to remove particles, which can clog the needle. The microneedle was back-filled with 1 μ l of the indicator dye and microinjected into root hairs by pressure. The living root hairs, mainly those in the region corresponding to zone II, were selected prior to loading them with fura-2, by observing normal cytoplasmic streaming and tip growth. Microinjections were carried out along the shank of the root hair, and never at the extreme apex. To successfully microinject the root hairs we used two needles: a blunt needle supporting the hair cell, while a sharp needle, containing indicator dye and coming from the opposite direction, impales the hair and introduces the dye. Microinjection into the vacuole was avoided by introducing the needle gently into the regions on the shank of the hair cell with evident pools of cytoplasm. Once the cells were loaded with the indicator dye and had completely recovered from the microinjection wounding, they were challenged with Nod factors or the control chitin oligomer.

Incubation of Root Hairs with Nodulation Factors

R. etli Nod factors were purified by HPLC as described (Cárdenas *et al.*, 1995), resuspended in 1% (w/v) of a nondenaturing zwitterionic detergent, CHAPS [(3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane-sulfonate)] and diluted to 0.01% final concentration containing Nod factors at 10^{-8} M. Before application, the Nod factors were previously mixed with 0.5 ml of 2 mM CaCl_2 , 2.5 mM MES (pH 6.2) and then added gently to the growing root hairs to replace the Nod factors free medium. As a control we used chitin oligomers of penta-*N*-acetylchitopentaose (Seikagaku America, Inc. Japan) at 10^{-7} M, dissolved in CHAPS under the same condition as Nod factors.

Intracellular calcium measurements

After loading fura-2-dextran into the cytoplasm of the root hair cells, the distribution of free-intracellular Ca^{2+} was determined by imaging with a ratiometric ion microscope which consisted of a Nikon Diaphot 300 inverted microscope with a highly regulated Hg vapor lamp as light source and a thermoelectrically cooled CCD camera (Photometrics, Tucson, AZ), as the fluorescence detector (Pierson *et al.*, 1994, 1996).

Extracellular calcium measurements

Microelectrodes were pulled in two stages with an ideal tip diameter of ~ 2 μ m, as described by Smith *et al.* (1994). These electrodes were backfilled with an appropriate electrolyte of 100 mM of the ion to be measured and front loaded by capillarity with the liquid ion exchanger (LIX). We used the program 3DVIS, version 6, which was modified from the original to achieve better results within the objectives of our work. The software computes a rolling average of the μ V differences between two points in the medium 10 μ m apart. An appropriate sample size and rate of logging data can be set independently of the rolling average sample size. Direct logging can accumulate data faster than a rolling average cycle. Thus it acquires more data, however due to the rolling nature of the averaging process each adjacent datum is statistically correlated. Care was taken to use only independent observations in our calculations. In order to determine the area of the current source, we did step away measurements by stepping the probe away from the calcium source as described by Kunkel and Bowdan (1989). The probe efficiency was determined using previous standard curves (Kutreiber and Jaffe, 1990; Smith *et al.*, 1994), which were based on data acquired at equispaced intervals from the calcium source.

LITERATURE CITED:

- Allen, N.S., Bennet, M.N., Cox, D., Shipley, A., Ehrhardt, D., and Long, S.R.** (1994). Effects of Nod factors on alfalfa root hair Ca^{2+} and H^+ currents and cytoskeleton behavior. *In* *Advances in Molecular Genetics and Plant Microbe Interactions*, M.G. Daniels, J.A. Dawnie and A.E. Osborne, eds. (Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers), pp. 107-114.
- Allen, G.J., Muir, S.R., and Sanders, D.** (1995). Release of Ca^{2+} from individual plant vacuoles by both InsP_3 and cADP-ribose. *Science* **268**, 735-737.
- Andersland, J.M., and Parthasarathy, M.V.** (1993). Conditions affecting depolymerization of actin in plant homogenates. *J. Cell. Sci.* **104**, 1273-1279.
- Battey, N.H. and Blackbourn, H.D.** (1993). The control of exocytosis in plant cells. *New Phytol.* **125**, 307-338.
- Blackbourn, H.D. and Battey, N.H.** (1993). Annexin-mediated secretory vesicle aggregation in plants. *Physiologia Plantarum* **87**, 528-534.
- Berridge, M. J.** (1993) Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Nature* **361**, 315-325.
- Bhuvaneswari, T.V., Bhagwat, A.A., Bauer, W.D.** (1981). Transient susceptibility of root cells in four common legumes to nodulation by *Rhizobia*. *Plant Physiol.* **68**, 1144-1149.
- Boller, T.** (1995). Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu Rev. Plant Physiol. & Plant Mol. Biol.* **46**, 189-214.
- Bowler, C. Neuhaus, G., Yamagata, H., and Chua, N.** (1994). Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction. *Cell* **77**, 73-81.
- Brewin, N.J.** (1991) Development of the legume root nodule. *Annu. Rev. Cell Biol.* **7**, 191-226.
- Bush, D.S.** (1993). Regulation of cytosolic calcium in plants. *Plant Physiol.* **103**, 7-13.
- Bush, D.S.** (1995). Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annu. Rev. Plant Physiol. & Plant Mol. Biol.* **46**, 95-122.
- Callaham, D.A. and Torrey, J.G.** (1981). The structural basis of infection of root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium*. *Can. J. Bot.* **59**, 1647-1664.
- Cárdenas, L., Domínguez, J., Quinto, C., López-Lara, I.M., Lugtenberg, B.J.J., Spaink, H.P., Rademaker, G.J., Haverkamp, J., Thomas-Oates, J.E.** (1995). Isolation, chemical structures and biological activity of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium etli*. *Plant Mol. Biol.* **29**, 453-464.
- Cárdenas, L., Vidali, L., Domínguez, J., Pérez, H., Sanchez, F., Hepler, P., and Quinto, C.** (1998). Rearrangement of actin microfilaments in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Plant Physiol.* **116**, 871-877.
- Carpita, N.C., and Gibeaut, D. M.** (1993). Structural models of primary cell walls of flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* **3**, 1-30.
- Clapham, D.E.** (1995). Calcium signaling. *Cell* **80**, 259-268.
- Clarkson, D.T., Brownlee, C., Ayling, S.M.** (1988). Cytoplasmic calcium measurements in intact higher plant cells: results from fluorescence ratio imaging of fura-2. *J. Cell Sci.* **91**, 71-80.
- Cook, D., Dreyer, D., Bonnet, D., Howell, M., Nony, E., VandenBosch, K.** (1995). Transient induction of a peroxidase gene in *Medicago truncatula* precedes infection by *Rhizobium meliloti*. *Plant Cell* **7**, 43-55.
- Creutz C.E.** (1992). The annexins and exocytosis. *Science* **258**, 924-931.

- Dénarié, J., Debelle, F., Promé, J.C.** (1996). *Rhizobium* lipo-chitoooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 503-535.
- Dolmetsch, R.E., Lewis, R.S., Goodnow, C.C., and Healy, J.** (1997). Differential activation of transcription factors induced by Ca^{2+} response amplitude and duration. *Nature* **386**, 855-858.
- Ehrhardt, D.W., Atkinson, E.M, Long, S.R.** (1992). Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science* **256**, 998-1000.
- Ehrhardt, D.W, Wais, R., Long, S.R.** (1996). Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Cell* **85**, 673-681.
- Felle, H.H.** (1988) Auxin causes oscillations of cytosolic free calcium and pH in *Zea mays* coleoptiles. *Planta*. **174**, 495-499.
- Felle, H.H., Kondorosi, E., Kondorosi, A., Schultze, M.** (1995). Nod signal-induced plasma membrane potential changes in alfalfa root hairs are differentially sensitive to structural modifications of the lipochitoooligosaccharide. *Plant J.* **7**, 939-947.
- Felle, H.H., Kondorosi, E., Kondorosi, A., Schultze, M.** (1996). Rapid alkalization in alfalfa root hairs in response to rhizobial lipochitoooligosaccharide signals. *Plant J.* **10**, 295-301.
- Felle, H.H., and Hepler, P.** (1997). The cytosolic Ca^{2+} concentration gradient of *Sinapsis alba* root hairs as revealed by Ca^{2+} -selective microelectrode test and fura-dextran ratio imaging. *Plant Physiol.* **114**, 39-45.
- Felle, H.H., Kondorosi, E., Kondorosi, A., Schultze, M.** (1998). The role of ion fluxes in Nod factor signalling in *Medicago sativa*. *Plant J.* **13**, 455-463.
- Fisher, R. and Long, S.R.** (1992). *Rhizobium*-plant signal exchange. *Nature* **357**, 655-660.
- Garrill, A., Jackson, S.L., Lew, R. R. and Heath, I.B.** (1993). Ion channel activity and tip growth: tip localized stretch-activated channels generate an essential Ca^{2+} gradient in the oomycete *Saprolegnia ferax*. *Eur. J. Cell Biol.* **60**, 358-365.
- Gehring et al** (1997)
- Gilroy, S., Read, N.D., and Trewavas, A.J.** (1990). Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged inositol tris phosphate initiate stomatal closure. *Nature* **346**, 769-771.
- Gilroy, S., and Jones, R.L.** (1992). Gibberellic acid and abscisic acid coordinately regulate cytoplasmic calcium and secretory activity in barley aleurone protoplast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 3591-3595.
- Gilroy, S., Bethke, P.C. and Jones, R.L.** (1993). Calcium homeostasis in plants. *Cell Sci.* **106**, 453-462.
- Heath I.B.** (1990). Tip growth in plant and fungal cells. London: Academic press.
- Heidstra, R., Geurts, R., Franssen, H., Spaink, H.P., van Kammen, A., Bisseling, T.** (1994). Root hair deformation activity of nodulation factors and their fate on *Vicia sativa*. *Plant Physiol.* **105**, 787-797.
- Hepler, P.K., and Wayne, R.O.** (1985). Calcium in plant development. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **36**, 397-439.
- Hepler, P.K.** (1997). Tip growth in pollen tubes: calcium leads the way. *Trends Plant Sci.* **2**, 79-80.
- Hirsch, A.** (1992). Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.* **122**, 211-237.
- Holdaway-Clarke, T.L., Feijó, J.A., Hackett, G.R., Kunkel, J.G. and Hepler, P.K.** (1997). Pollen tube growth and the intracellular cytosolic calcium gradient oscillate in phase while extracellular calcium influx is delayed. *Plant Cell* **9**, 1999-2010.

- Horvath, B., Hedistra, R., Lados, M., Moerman, M., Spaink, H.P., Promé, J.C., van Kammen, A., Bisseling, T.** (1993). Lipooligosaccharides of *Rhizobium* induce infection-related early nodulin gene expression in pea root hairs. *Plant J.* **4**, 727-733.
- Jaffe, L.F. and Levy, S.** (1987). Calcium gradients measured with a vibrating calcium-selective electrode. Proceedings, 9th annual conference IEEE Rng. Med. Biol. Soc. Boston, November 13-16.
- Journet, E.P., Pichon, M., Dedieu, A., De Billy, F., Truchet, G., Barker, D.G.** (1994). *Rhizobium meliloti* Nod factors elicit cell specific transcription of the *ENOD12* gene in transgenic alfalfa. *Plant J.* **6**, 241-249.
- Kohno, T., Shimmen, T.** (1987). Ca^{2+} -induced fragmentation of actin filaments in pollen tubes. *Protoplasma* **141**, 177-179.
- Kühntreiber, W., and Jaffe, L.F.** (1990). Detection of extracellular calcium gradients with a calcium-specific vibrating electrode. *J. Cell. Biol.* **110**, 1565-1573.
- Kurkdjian, A.C.** (1995). Role of the differentiation of root epidermal cells in Nod factor from *Rhizobium meliloti*-induced root-hair depolarization of *Medicago sativa*. *Plant Physiol.* **107**, 783-790.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J.C., Dénairé, J.** (1990). Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* **344**, 781-784.
- Llinás, R. Sugimori, M., Silver, R.B.** (1992). Microdomains of high calcium concentration in a presynaptic terminal. *Science* **256**, 677-679.
- McAinsh, S.R., Webb, A.A.R., Taylor, J.E. and Hetherington, A.M.** (1995). Stimulus-induced oscillations in guard-cell cytosolic free calcium. *Plant Cell* **7**, 1207-1219.
- Mergaert, P., van Montagu, M., Promé, J.C., Holsters, M.** (1993) Three unusual modifications, a D-arabinosyl, an N-methyl, and a carbamoyl group are present on Nod factors of *Azorhizobium caulinodans* strain ORS571. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 1551-1555.
- Miller, D.D., Callaham, D.A., Gross, D.J., and Hepler, P.K.** (1992). Free Ca^{2+} gradient in growing pollen tubes of *Lilium*. *J. Cell Sci.* **101**, 7-12.
- Miller, D.D., de Ruijter, N.C.A, D.A. and Emons, A.M.C.** (1992). Free Ca^{2+} gradient in growing pollen tubes of *Lilium*. *J. Cell Sci.* **101**, 7-12.
- Mylona, P., Pawlowski, K., Bisseling, T.** (1995). Symbiotic Nitrogen Fixation. *Plant Cell* **7**: 869-885.
- Pierson, E.S., Miller, D.D., Callaham, D.A., Shipley, A.M., Rivers, B.A., Cresti, M., and Hepler, P.K.** (1994). Pollen tube growth is coupled to the extracellular calcium ion flux and the intracellular calcium gradient: Effect of BAPTA-type buffers and hypertonic media. *Plant Cell* **6**, 1815-1828.
- Pierson, E.S., Miller, D.D., Callaham, D.A., van Aken, J., Hackett, G., and Hepler, P.K.** (1996). Tip-localized calcium entry fluctuates during pollen tube growth. *Dev. Biol.* **174**, 160-173.
- Poovaiah, B.W. and Reddy, A.S.N.** (1993) *Crit. Rev. Plant Sci.* **12**, 185-211.
- Price, N.P.J., Relic, B., Talmont, F., Lewin, A., Promé, D., Pueppke, S.G., Maillet, F., Dénairé, J., Promé, J.C., Broughton, W.J.** (1992). Broad-host range *Rhizobium* species strain NGR234 secretes a family of carbamoylated, and fucosylated, nodulation signals that are O-acetylated or sulphated. *Mol. Microbiol.* **6**, 3575-3584.

- Relic, B., Talmont, F., Kopcinska, J., Golinowski, W., Promé, J.C., Broughton, W.J.** (1993). Biological activity of *Rhizobium* sp. NGR234 Nod-factors on *Macroptilium atropurpureum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**, 764-774.
- Ridge, R.W.** (1993). A model of legume root hair growth and *Rhizobium* infection. *Symbiosis* **14**, 359-373.
- de Ruijter, N.C.A., Rook, M.B., Bisseling, T. and Emons, A.M.C.** (1998). Lipochito-oligosaccharides re-initiate root hair tip growth in *Vicia sativa* with high calcium and spectrin-like antigen at the tip. *Plant J.* **13**, 341-350.
- Sanjuan, J., Carlson, R.W., Spaink, H.P., Bhat, 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*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 8789-8793.
- Schatten, G., Bestor, T., Balczon, R., Henson, J., and Schatten, H.** (1985) Intracellular pH shift leads to microtubule assembly and microtubule-mediated motility during sea urchin fertilization: correlation between intracellular pH and microtubule activity and depressed intracellular pH and microtubule disassembly. *Eur. J. Cell Biol.* **36**, 116-127.
- Schroeder, J.I. and Hagiwara, S.** (1990). Repetitive increases in cytosolic Ca²⁺ of guard cells by abscisic acid activation of nonselective Ca²⁺ permeable channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9305-9309.
- Schultze, M., Quiclet-Sire, B., Kondorosi, E., Virelizier, H., Glushka, J.N., Endre, G., Géro, S.D., Kondorosi, A.** (1992). *Rhizobium meliloti* produces a family of sulphated lipo-oligosaccharides exhibiting different degrees of plant host specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 192-196.
- Schultze, M., Kondorosi, E., Ratet, P., Buiré, M., Kondorosi, A.** (1994). Cell and molecular biology of *Rhizobium*-Plant interactions. *Int. Rev. Cytol.* **156**, 1-75.
- Sethi, R.S., Reporter, M.** (1981). Calcium localization pattern in clover root hair cells associated with infection process. Studies with aureomycin. *Protoplasma* **105**, 321-325.
- Smith, J.S., Sanger, R.H., Jaffe, L.F.** (1994). The vibrating Ca²⁺ electrode: A new technique for detecting plasma membrane regions of Ca²⁺ influx and efflux. *Meth Cell Biol.* **40**, 115-134.
- Spaink, H.P., Sheeley, 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.
- Stokkermans, T.J.W., Peters, N.K.** (1994). *Bradyrhizobium elkanii* lipooligosaccharide signal induces complete nodule structures on *Glycine soja* Siebold et Zucc. *Planta* **193**, 413-420.
- Theriot, J.** (1995). The cell biology of infection by intracellular bacterial pathogen. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **11**, 213-239.
- Truchet, G., Roche, P., Lerouge, P., Vasse, J., Camut, S., de Billy, F., Promé, J.C., Dénarié, J.** (1991). Sulphated lipooligosaccharide signals from *Rhizobium meliloti* elicit nodule organogenesis in alfalfa. *Nature* **351**, 670-673.
- Tsien, R.W. and Tsien, R.Y.** (1990). Calcium channels, stores, and oscillations. *Ann. Rev. Cell. Biol.* **6**, 715-760.
- Van Batenburg, F.H.D., Jonker, R. and Kijne, J.W.** (1986). *Rhizobium* induces marked root hair curling by redirection of tip growth: a computer simulation. *Physiol. Plant.* **66**, 476-480.

- 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 of *Rhizobium*. *Science*. **257**, 70-72.
- Van Spronsen, P.C., Bakhuizen, R., van Brussel, A.A.N., Kijne, J.W.** (1994). Cell wall degradation during infection thread formation by the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* is a two-step process. *Eur. J. Cell Biol.* **64**, 88-94.
- Webb, A.A.R., Taylor, J.E., McAinsh, M.R., and Hetherington, A.M.** (1995). Calcium ions as intracellular second messengers in plants. *Adv. Bot. Res.*, in press.
- Ward, J.M and Schroeder J.I.** (1994). Calcium-activated K⁺ channels and calcium-induced calcium release by slow vacuolar ion channels in guard cell vacuoles implicated in the control of stomatal closure. *The Plant Cell* **6**, 669-683.
- Zhang, D.H., Wadsworth, P., Hepler, P.K.** (1993). Dynamics of microfilaments are similar, but distinct from microtubules during cytokinesis in living, dividing plant cells. *Cell. Motil. Cytoskel.* **24**, 151-155.
- Zorec, R. and Tester, M.** (1992). Cytoplasmic calcium stimulates exocytosis in a plant secretory cell. *Bioph. J.* **63**, 864-867.

7.0 DISCUSION

En este trabajo mostramos el aislamiento, la purificación y la determinación de la estructura química de los FNs de *R. etli*. Estos metabolitos son capaces de inducir la deformación de los pelos radiculares de frijol, así como también primordios y estructuras tipo nódulos. Los pelos radiculares responden con un cambio dramático en el citoesqueleto de actina en respuesta a éstos FNs. Dicha respuesta se detecta durante los primeros 5-10 min después de exponer a los FNs y se caracteriza por una rápida fragmentación de los cables de actina. El efecto más dramático se observó en el ápice como una región de abundante fluorescencia sugiriendo la presencia de filamentos cortos de actina. Es interesante que aún bajo la continua exposición a los FNs, hay una fase de recuperación en la cual se vuelven a formar los cables largos de actina que recorren lo largo del pelo radicular, pero permanece con cierta intensidad la fluorescencia en la región apical.

Estudios previos han propuesto que el citoesqueleto de actina podría tener un papel clave en el establecimiento de la interacción simbiótica entre la leguminosa y la bacteria. Ridge (1992), mostró una fluorescencia difusa en la región deformada por el enroscamiento en pelos radiculares de *Vicia*, en presencia de la bacteria para inducir la respuesta. Sin embargo, ningún cable de actina era evidente en estos estudios. Este autor propuso que dicha área es una región donde la actina podría fragmentarse en presencia de la bacteria. Allen et al. (1994), usando los FNs purificados de *R. meliloti*, demostró la presencia de focos de actina en los pelos enroscados de alfalfa, que Ridge no había descrito. Sin embargo, en los estudios de Ridge y Allen no se aborda la pregunta elemental de ¿cuál es el papel del citoesqueleto en las etapas más tempranas en respuesta a los FNs?. Tanto Ridge como Allen usaron pelos que ya se habían enroscado, esto implica que las células habían estado expuestas durante más de 4 horas, por lo que no pueden considerarse eventos iniciales.

Los resultados aquí descritos revelan por vez primera, que el efecto de los FNs sobre el citoesqueleto de actina es dramático en magnitud y rapidez, ocurre durante los primeros 5 min. Además es importante señalar que las imágenes mostradas en este trabajo se obtuvieron en células vivas y no contienen artificios que puedan surgir como resultado de procedimientos tales como la fijación química.

En este trabajo hemos concluido que los FNs de *Rhizobium* inducen alteraciones drásticas en la arquitectura de los microfilamentos de actina de los pelos

radiculares de la planta huésped. Se sabe que los pelos radiculares más susceptibles a la deformación inducida por el *Rhizobium* y el desarrollo de hilo de infección son aquellos que se están expandiendo rápidamente (Bhuvaneswari et al., 1981). Para la formación del hilo de infección se necesita un cambio en la reorganización de los procesos de polaridad en la célula. Esto requiere de cambios en la estructura y organización del citoesqueleto. Los resultados aquí descritos apoyan fuertemente el papel de los microfilamentos de actina en este proceso.

La movilización de iones durante es algo que ha constituido un intenso objeto de estudio en los últimos dos años. Sin embargo, muchos de los trabajos hasta ahora descritos en la literatura han dejado muchas preguntas sin contestar. Se sabe que para la formación del hilo de infección es necesario un cambio de polaridad, formando un túnel a lo largo del cual la bacteria viajará hasta alcanzar las células de la corteza. Esto refleja la necesidad de una modulación altamente regulada del citoesqueleto y iones como el calcio en la célula huésped, en la que la bacteria juega un papel central. Los resultados aquí descritos, demuestran que los FNs son capaces de inducir la deformación de los pelos radiculares y desarrollo de meristemas y estructuras tipo nódulos en ausencia de la bacteria. Sin embargo, para la completa formación del hilo de infección se requiere de la presencia de la bacteria. Esto probablemente se debe a que la bacteria unida al pelo radicular induce una estimulación local en la pared celular del pelo radicular (Callaham y Torrey, 1981; Van Batenburg et al., 1986; Ridge y Rolfe, 1985; Van Spronsen et. al., 1994).

Se ha descrito que los ápices en crecimiento de los pelos radiculares no infectados mantienen conexiones de actina entre el núcleo y el ápice del pelo radicular en crecimiento (Lloyd et al., 1987). Del mismo modo, se sabe que los procesos de infección desacoplan el núcleo del ápice en crecimiento y se ha sugerido que el núcleo desacoplado podría dirigir o guiar el hilo de infección hacia la base del pelo radicular (Fahraeus, 1957; Nutman, 1959). Se ha descrito que en el establecimiento de la polaridad del cigoto de *Fucus*, los microtúbulos parecen tener un papel fundamental (Shaw y Quatrano, 1996). Los microfilamentos de actina por otro lado, son muy importantes en las células de *Fucus*, ya que se acumulan en los sitios de adhesión, cerca de los ápices de crecimiento (Henry et al., 1996), y agentes como la citocalasina bloquean la determinación del eje de división (Quatrano, 1973). De igual forma en los pelos radiculares, probablemente la iniciación del cambio de polaridad se hace posible por la reorganización del citoesqueleto que

dirige a las vesículas citoplasmáticas, que contienen componentes de la pared celular, hacia el nuevo ápice en crecimiento (Brewin, 1991). Además, el citoesqueleto podría de igual forma regular la distancia entre el ápice y el núcleo (Lloyd, et al., 1987). En este aspecto, es interesante mencionar que el núcleo generalmente lo hemos observado rodeado de microfilamentos, lo cual puede ser un requisito para mantener la distancia entre el núcleo y el hilo de infección en crecimiento.

La manipulación del citoesqueleto del huésped por bacterias patógenas se ha descrito en otros sistemas, en los que éstas han adquirido la capacidad de entrar y vivir dentro de la célula eucariótica. Por lo general, en estos sistemas, las bacterias patogénicas han adquirido la capacidad de manejar los mecanismos de transducción de señales de la célula huésped como las proteínas cinasas, y los segundos mensajeros como el calcio y los fosfoinosítidos (Rosenshine y Finlay, 1993). Estos compuestos tienen la capacidad de inducir rearrreglos del citoesqueleto y facilitar la entrada de la bacteria (Theriot, 1995), lo cuál nos hace plantear la posibilidad de que *Rhizobium* posee características similares.

Se ha sugerido que los incrementos en los niveles de calcio intracelular inducidos por los FNs podrían participar en la modulación del citoesqueleto de actina (Sánchez et al., 1991; Allen et al., 1994;). Específicamente es factible suponer que la formación de filamentos cortos de actina, inmediatamente después de exponer a los FNs, se debe al aumento de calcio que se observa en esta zona. En apoyo a esta idea se encuentran las observaciones de las oscilaciones de calcio en pelos radiculares de alfalfa en respuesta a los FNs (Ehrhardt et al., 1996). En tubos polínicos se ha demostrado que niveles de calcio elevado inducen fragmentación de los filamentos de actina (Kohn y Shimmen, 1987) y causan la detención en el flujo citoplasmático (Kohn y Shimmen, 1988). Se han descrito otras respuestas celulares a los FNs como la alcalinización del citoplasma (Felle et al., 1996), y depolarización de la membrana (Ehrhardt et al., 1992; Felle et al., 1995). El papel de estas respuestas no está bien entendida pero probablemente podrían afectar la estructura y distribución de los microfilamentos de actina. En este sentido, es muy importante señalar el efecto tan pronunciado que tiene elevar el pH intracelular en *Dictyostelium* sobre la reorganización de los microfilamentos de actina (Edmonds et al., 1995).

Es bien sabido que el ápice en crecimiento mantiene un estado muy dinámico ya que constituye el sitio donde se pueden estar fusionando las vesículas a una

velocidad hasta de 5000 por min, permitiendo velocidades de crecimiento de 200 $\mu\text{m min}^{-1}$ (Heath, 1990; para revisión ver Battey y Blackbourn, 1993). El crecimiento es un proceso altamente organizado donde se conjuga el equilibrio entre la deposición de componentes de pared celular y crecimiento de la misma. El papel del Ca^{2+} en los ápices en crecimiento se ha documentado muy bien en tubos polínicos, donde los gradientes de éste ion se han descrito muy bien (Pierson et al., 1996). Dichos gradientes sugieren que el resultado principal del crecimiento polarizado es dirigir las vesículas a un área específica del ápice en crecimiento. Esto ha llevado a pensar que el crecimiento apical polarizado requiere del papel fundamental del Ca^{2+} , no sólo en tubos polínicos sino en otros ápices en crecimiento como pelos radiculares, rizoides de chara, hifas y protonemas de musgos (Clarkson et al., 1988; Schiefelbein et al., 1992; Battey y Blackbourn, 1993; Jones et al., 1995; Pierson et al., 1996, Felle y Hepler, 1997). Se han sugerido algunos de los mecanismos por los cuales el *Rhizobium* induce la formación del hilo de infección en los pelos radiculares (para revisión ver Brewin, 1991 y Mylona, et al., 1995). En este trabajo mostramos evidencias de la modulación del citoesqueleto, probablemente a través de la inducción de corrientes de calcio en respuesta a los FNs. El Ca^{2+} se sabe que tiene un efecto en la deposición de las vesículas con los precursores de la pared celular, esto es favoreciendo la fusión y la incorporación de los componentes de pared. Es por ello que resulta bastante razonable proponer al Ca^{2+} como un elemento clave en la organización de los microfilamentos. De acuerdo a nuestra evidencia experimental, proponemos que los FNs son los responsables de modificar la organización del citoesqueleto. Es probable que este proceso requiera la participación del Ca^{2+} como un modulador importante para inducir los procesos de deformación, y enroscamiento del pelo radicular.

Nuestros resultados muestran que en *P. Vulgaris* existen cambios dramáticos tanto en Ca^{2+} intracelular como en influjo extracelular cuando se exponen a los FNs activos. La respuesta intracelular y extracelular del Ca^{2+} es específica ya que únicamente los FNs y no los oligómeros son capaces de inducir estos cambios. Esta respuesta en Ca^{2+} se encontró principalmente en el ápice y la vecindad del núcleo. Generalmente la respuesta se inicia durante los primeros 5 min y dura hasta 60 min o más en algunos casos. Los niveles en Ca^{2+} en los pelos radiculares que están respondiendo a los FNs, son claramente distinguibles de los niveles encontrados en los pelos creciendo en presencia o ausencia de los oligómeros. Los pelos radiculares

que se exponen a los oligómeros (pentámeros) o en ausencia del mismo, presentan los mismos niveles en Ca^{2+} . Esto es muy importante ya que prueba la especificidad de la respuesta por los FNs y no a los pentámeros. El Ca^{2+} en los pelos controles lo hemos observado como un gradiente apical muy claro, cuyos valores son muy similares a los descritos para otros pelos radiculares en crecimiento (Clarkson et al., 1988; Felle y Hepler, 1997).

La respuesta de este gradiente de Ca^{2+} en respuesta a los podría ser el responsable de la modulación del citoesqueleto que se describe en la primera parte de este trabajo. El incremento en Ca^{2+} puede inducir la fragmentación de los microfilamentos y como una consecuencia, esto puede originar la disminución del flujo citoplasmático que se observa en los 5 minutos después de aplicar los FNs. La presencia de altos niveles de Ca^{2+} en el sitio de fusión de vesículas nos permite apoyar la idea de que este catión podría estar implicado en la modulación del citoesqueleto. El Ca^{2+} de alguna forma podría regular la fusión de vesículas en el ápice en crecimiento al regular los procesos de exocitosis, como ya se ha sugerido muchas veces (Almers, 1990; et al., Creutz, 1992; Gilroy y Jones, 1992; Llinas et al., 1992; Zorec y Tester, 1992; Battey y Blackbourn, 1993, Blackbourn y Battey, 1993). Se sabe que el grado de relajamiento del citoesqueleto está influenciado por Ca^{2+} en células móviles como amoeba y "slime moulds" (Stockem & Klopocka, 1988). Parece probable que éstas respuestas podrían estar mediadas por proteínas de unión a Ca^{2+} o de unión a actina, por ejemplo anexinas, gelsolina o fragminina (Hasegawa et al., 1980; Kohno y Shimmen 1987; Battey y Blackbourn, 1993).

Los cambios de Ca^{2+} que hemos descrito siguen un patrón bastante complejo durante los primeros 5 minutos, ésto no se había descrito por ningún otro grupo de trabajo. Además, es muy importante señalar que los pelos radiculares seleccionados, antes del tratamiento, presentan un modesto pero característico gradiente apical en el cual el Ca^{2+} alcanza valores de 400 nM en el ápice y desciende a niveles basales de 100 nM después de 30 μm . Después de la aplicación de los factores Nod, el Ca^{2+} en el ápice aumenta rápidamente hasta valores de 1500 nM. Es de especial interés mencionar la observación de que conforme pasa el tiempo las regiones con alta concentración de Ca^{2+} no permanecen en un solo lugar de manera estática, sino que se mueven dentro de la región apical. Durante la adquisición de imágenes en secuencia a intervalos de 3 segundos, es posible observar "locus" particulares de alta concentración de Ca^{2+} con valores de 1200-1800 nM y ver como éste baja hasta

los niveles basales en pocos segundos. Finalmente, las elevaciones y fluctuaciones en Ca^{2+} intracelular se han observado en la región perinuclear, en la misma forma que lo describe Ehrhardt y colaboradores (1996), con la diferencia de que los pelos radiculares que mostramos presentan un claro gradiente de Ca^{2+} en la región apical.

Los cambios en los influjos de Ca^{2+} extracelular también son rápidos en tiempo y de magnitud notable después de la aplicación de los factores Nod. Aunque Allen y colaboradores (1994) han reportado cambios en las corrientes de Ca^{2+} en pelos radiculares de alfalfa en presencia de factores Nod, éstos son muy pequeños, generalmente de $6.5 \mu\text{V}$ en los pelos controles y de $-11 \mu\text{V}$ en los pelos tratados. Cabe mencionar que algunas veces éstos valores están determinados más como eflujos que influjos. En los pelos radiculares nosotros observamos de manera consistente un influjo que incrementa en magnitudes desde 13 a $33 \text{ pmoles/cm}^2/\text{seg}$ ($100 \mu\text{V}$ a $250\text{-}300 \mu\text{V}$) en los primeros 5 minutos. Estos cambios en Ca^{2+} que estamos describiendo pueden estar relacionados a la depolarización de los potenciales de membrana descritos en pelos radiculares de alfalfa (Ehrardt et al., 1992). Estas depolarizaciones generalmente se registran 2 min después de aplicar los factores Nod y alcanzan un máximo después de 10 min (Ehrardt et al., 1992). Ehrardt y colaboradores concluyen que la respuesta en Ca^{2+} que ellos observaron no es un resultado de la depolarización de la membrana. La razón de esto es que los cambios en Ca^{2+} ocurren 10 minutos después de aplicar los factores Nod y las depolarizaciones en 2 minutos. Sin embargo, los resultados reportados aquí, se observan que en los primeros 5 minutos existe una respuesta de Ca^{2+} y probablemente éste podría ser resultado de la apertura de canales dependientes de voltaje, presentes en la membrana plasmática. Sin embargo, se requerirán mediciones más detalladas mediante técnicas de *patch clamp* para ser más contundentes al respecto.

Concluyendo, podemos observar que existe una clara correlación entre nuestros datos de Ca^{2+} intracelular y extracelular, esto, es que el ion en cada compartimento responde inmediatamente en concentración después de aplicar los factores Nod y con la actividad del ion principalmente en la región apical. Sin embargo, no descartamos la posibilidad de que estos incrementos de Ca^{2+} pueden resultar en parte de su liberación de reservorios internos, por ejemplo, retículo endoplasmático, vacuola, o la región nuclear además de los influjos del medio extracelular. Si este fuera el caso, sería muy interesante encontrar ¿cuánto Ca^{2+} es

liberado de reservorios internos? y ¿cuánto está entrando del medio extracelular?. De hecho una gran parte del influjo extracelular de Ca^{2+} puede no cruzar el plasmalema, y quedarse en el espacio de la pared celular como resultado del efecto de los FNs sobre las propiedades de la pared celular. Por ejemplo, el claro remodelamiento de la pared celular, que debe ocurrir como parte de la deformación y el enroscamiento de la pared celular, podría implicar cambios en los compuestos pécticos y otros componentes de pared que pudieran en alguna forma incrementar la afinidad local por Ca^{2+} (Carpita y Gibeaut, 1993). Desafortunadamente el “vibrating probe” no puede distinguir entre la entrada del ion en el espacio de la pared celular y el movimiento del ion a través de la membrana (Holdway-Clarke et al. 1997).

La cuantificación del Ca^{2+} intracelular y extracelular nos permite en cierta forma modelar su relación, y generar una mejor comprensión del proceso regulatorio. Las mediciones del influjo extracelular, nos proporcionan valores que son dos órdenes de magnitud mayor al necesario para mantener el gradiente de calcio citosólico. Esto nos hace suponer que sólo una fracción pequeña del influjo necesita cruzar la membrana plasmática para satisfacer los requerimientos del gradiente intracelular.

¿Qué está haciendo el Ca^{2+} ?. Como lo hemos descrito anteriormente, parece probable que una fracción significativa del influjo extracelular participa en los cambios de los componentes de la pared celular implicados en la remodelación de la pared celular que antecede a la deformación y enroscamiento de los pelos radiculares. Por comparación con los tubos polínicos en donde parece que existe una estimulación del influjo de calcio debido a un incremento en los residuos pécticos ácidos (Holdway-Clarke et al., 1997), parece congruente sugerir que un proceso similar pudiera estar ocurriendo en los pelos radiculares del frijol cuando responden a los FNs.

Existen muchas evidencias ya mencionadas, que apoyan la idea de que el Ca^{2+} intracelular facilita la secreción de componentes de pared en ápices en crecimiento (Almers, 1990; Creutz, 1992; Gilroy y Jones, 1992; Llinas, et al., 1992; Zorec y Tester, 1992; Battey y Blackbourn, 1993; Balckbourn y Battey, 1993). Ahora, es interesante notar el paralelismo que existe entre el crecimiento rápido de los tubos polínicos (una célula altamente polarizada), con la presencia de un marcado incremento de Ca^{2+} en el sitio de fusión de las vesículas (Pierson et al., 1996). Aunque los pelos radiculares crecen más lentamente que los tubos polínicos, la

presencia de un gradiente de Ca^{2+} apical, parece que también es el responsable del crecimiento polarizado. El hecho de que este gradiente no se encuentra en células que no están creciendo, apoya fuertemente la conexión entre el gradiente apical y el crecimiento polarizado. Además, la aparente movilidad de los focos con alta concentración de Ca^{2+} que se observan después de 15 min de la aplicación de los FNs, puede ser la causa de la fragmentación local de los filamentos de actina. Esto puede dar lugar a la formación de los focos de actina que ya se han descrito en la sección de resultados. Aquí es importante y razonable postular un escenario en el cual, los focos de Ca^{2+} generarían los parches con depósitos de material de pared, a juzgar por la evidente deformación de la zona apical y la pérdida de polaridad.

Los niveles de Ca^{2+} intracelular elevados, podrían alterar la estructura y organización del citoesqueleto en la forma como lo hemos descrito. Estas observaciones son consistentes con la activación de proteínas de unión a actina sensibles a Ca^{2+} , tal como la gelsolina, la cual podría fragmentar los cables existentes (Janmey et al., 1995). La gelsolina normalmente tiende a ser activada a concentraciones de $4.7 \mu\text{M}$ de calcio pero acompañados con cambios en el pH la dependencia de Ca^{2+} puede ser anulada (<6.0) o incluso aumentar los requerimientos de Ca^{2+} a $\text{pH} >7.4$ (Janmey et al., 1995). Esto resulta opuesto a lo que pasa con proteínas relacionadas como severina y villina que aun a bajos pH siguen siendo regulados completamente por Ca^{2+} . En cualquier evento, la activación de cualquiera de estas proteínas daría como resultado la pérdida inmediata de los microfilamentos de actina altamente organizada, también puede contribuir a la pérdida momentánea de la polaridad y la inducción de un nuevo programa de desarrollo que lleva a la deformación de los pelos radiculares y enroscamiento, los cuales son requerimientos para la infección por la bacteria. Los microtúbulos podrían tener algún papel dentro de este escenario, tal vez movilizándolo organelos o vesículas, sin embargo el estudio de los microtúbulos a este nivel en pelos radiculares no está bien documentado.

Finalmente, es probable que los niveles elevados de Ca^{2+} modulen la expresión genética. Los cambios en la vecindad del núcleo que se muestran aquí y descritos también por Ehrhardt y colaboradores (1996) son muy semejantes. Sin embargo, debemos enfatizar que éstos cambios son posteriores a los cambios drásticos e inmediatos que se observan en el extremo del ápice del pelo radicular. Lo anterior nos hace pensar que dichos cambios probablemente sean de menor importancia o constituyen una vía secundaria para el reconocimiento de los FNs

como lo propone Felle y colaboradores (1996). Por otro lado, el incremento en calcio y fluctuación en la región apical podrían estar fuertemente relacionados con eventos de señalización específica dependientes de la amplitud y frecuencia del Ca^{2+} como se ha demostrado recientemente en células animales (Berridge, M., et al., 1997). Sin embargo, se necesitan más estudios al respecto antes de hacer más conclusiones.

A continuación, consideraré la trascendencia de los datos descritos en éste trabajo y discutiré su relación con lo que existe publicado. Tenemos que considerar que hasta ahora existen pocos estudios sobre el efecto de los FNs en los niveles de Ca^{2+} citosólico. Sin embargo, los detalles de estos estudios difieren notablemente de los que aquí reportamos. Ehrhardt y colaboradores (1996) reportan la existencia de oscilaciones de Ca^{2+} en la vecindad del núcleo en respuesta a los FNs, pero no presentan ninguna evidencia de un gradiente de Ca^{2+} apical en los pelos radiculares de alfalfa como los mostrados en este trabajo. Esto puede deberse al uso de los extremos apicales de los pelos de alfalfa para microinyectar el fura-2. A juzgar por los datos presentados por estos autores no se tiene la certeza de que las células están en crecimiento. Los resultados de Ehrhardt (1996) son desconcertantes si consideramos los datos previamente reportados por Allen y colaboradores (1994) también en alfalfa. Estos últimos describen en los pelos radiculares de alfalfa mediante “vibrating probe”, incrementos en corrientes de Ca^{2+} observados como cambios en influjos y eflujos en respuesta a los FNs. Los resultados que aquí presentamos revelan que después de los primeros minutos de aplicar los FNs, existen cambios en Ca^{2+} que se localizan en la región apical de los pelos radiculares. Por otra parte, los cambios en el área nuclear acontecen más tarde, al igual que lo reportado en alfalfa.

En conclusión, estamos proporcionando evidencias de que los pelos radiculares de frijol cuando se exponen a los factores Nod de *R. etli* responden con cambios en los niveles de Ca^{2+} intracelular e influjos de Ca^{2+} extracelular. Dada la discrepancia de los resultados anteriormente publicados, se necesitan más datos al respecto en otros sistemas para hacer conclusiones generales. Es muy importante hacer notar que los pelos radiculares de alfalfa se microinyectaron en la región apical que es la región más sensible del pelo, lo que probablemente altera la recuperación celular. Considerando lo anterior, los datos de Ca^{2+} citosólico obtenidos por Ehrhardt y colaboradores (1996), pudieran no ser los mismos para pelos radiculares realmente recuperados. Esto podría explicar la discrepancia de los resultados de Ehrhardt

(1996) que nunca observa los gradientes de Ca^{2+} apical, con los de Allen (1994) ya que Allen y colaboradores utilizaron un sistema no intrusivo. Además, como ya se describió al principio de esta discusión que las evidencias cada vez son más contundentes, sobre el papel del Ca^{2+} en mantener los ápices en crecimiento. En este sentido, consideramos que nuestros resultados tienen mayor relevancia. Los gradientes de Ca^{2+} descritos en este trabajo, han sido pocas veces visualizado por técnicas de microinyección dada la complejidad del sistema. Sin embargo, la cuantificación de Ca^{2+} citosólico proporciona información que no es posible obtener por medio de métodos no intrusivos.

Una pregunta muy importante que aun queda sin resolver consiste en determinar si durante la respuesta a los FNs existen fenómenos de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} como los descritos en animales y recientemente en células de la guarda en plantas. Los datos generados en el presente trabajo, presentan la contribución de nuevos datos que ayudaran a entender los mecanismos que le permiten a la bacteria invadir su célula huésped. Los cambios en Ca^{2+} citosólico y rearrreglo de los microfilamentos preceden a los cambios en morfología de los pelos radiculares. La conexión entre los cambios iniciales de Ca^{2+} y la subsecuente modulación del citoesqueleto que permita la formación del hilo de infección en los pelos radiculares durante la entrada de la bacteria, parece una pregunta interesante para profundizar en los mecanismos de reconocimiento planta-bacteria.

8.0 BIBLIOGRAFIA

1. **Allen, G.J., Muir, S.R., and Sanders, D.** (1995). Release of Ca^{2+} from individual plant vacuoles by both InsP_3 and cADP-ribose. *Science* **268**, 735-737.
2. **Allen, N.S., Bennet, M.N., Cox, D., Shipley, A., Ehrhardt, D., and Long S.R.** (1994). Effects of Nod factors on alfalfa root hair Ca^{2+} and H^+ currents and cytoskeleton behavior. In *advances in Molecular Genetics and Plant Microbe Interactions*, M.G. Daniels, J.A. Dawnie and A.E. Osborne, eds. (Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers), pp. 107-114.
3. **Almers, W.** (1990) Exocytosis. *Annu. Rev. Physiol.* **52**, 607-624
4. **Andersland, J.M., and Parthasarathy, M.V.** (1993). Conditions affecting depolymerization of actin in plant homogenates. *J. Cell. Sci.* **104**, 1273-1279.
5. **Asad, S., Fang, Y., Wycoff, K.L., Hirsh, A.M.** (1994) Isolation and characterization of cDNA and genomic clones of MsENOD40: transcript are detected in meristematic cells of alfalfa. *Protoplasma* **183**, 10-23.
6. **Baev, N., Endre, G., Petrovics, G., Banfalvi, Z., and Kondorosi, A.** (1991) Six nodulation genes of *nod* box locus 4 in *Rhizobium meliloti* are involved in nodulation signal production: *nodM* codes *D*-glucosamine synthetase. *Mol Gen. Genet.* **214**, 420-424.
7. **Bakhuizen, R.** (1988) The plant cytoskeleton in the *Rhizobium*-legume symbiosis. PhD thesis. Leiden University, The Netherlands.
8. **Bathey, N.H. and Blackbourn, H.D.** (1993). The control of exocytosis in plant cells. *New Phytol.* **125**, 307-338.
9. **Bauer, P., Crespi, M.D., Szecsi, J., Allison, L.A., Schultze, M., et al.** (1994). *Plant Physiol.*, **105**, 585-592.
10. **Bec-Ferté, M. P., Savagnac, A., Pueppke, S. G., and Promé, J. C.** (1993). Nod factors from *Rhizobium fredii* USDA257. In "New Horizons in Nitrogen Fixation" (R. Palacios, J. Mora, and W. E. Newton, Eds), pp. 157-158. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
11. **Berridge, M. J.** (1993) Inositol triphosphate and calcium signaling. *Nature* **361**, 315-325.
12. **Berridge, M. J.** (1997). The AM and FM of calcium signaling. *Nature* **386**, 759-760.
13. **Bhuvanewari, T.V., and Solheim, B.** (1985). Root hair deformation in the white clover/*Rhizobium trifolii* symbiosis. *Physiol. Plant.* **63**, 25-34.
14. **Bhuvanewari, T.V., Bhagwat, A.A., Bauer, W.D.** (1981). Transient susceptibility of root cells in four common legumes to nodulation by rhizobia. *Plant Physiol.* **68**, 1144-1149.
15. **Blackbourn, H.D. and Bathey, N.H.** (1993). Annexin-mediated secretory vesicle aggregation in plants. *Physiol. Plant* **87**, 528-534
16. **Bloemberg, G., Thomas-Oates, J., Lugtenberg, B.J.J. and Spaink, H.** (1994). Nodulation protein NodL of *Rhizobium leguminosarum* O-acetylates

- lipo-oligosaccharides, chitin fragments and *N*-acetylglucosamine in vitro. *Mol. Microbiol.* **11**, 793-804.
17. **Boller, T.** (1995). Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu Rev Plant Physiol & Plant Mol. Biol.* **46**, 189-214.
 18. **Bono, J.J., Riond, J., Nicolau, K., Bockovich, N.J., Estevez, V.A., Cullimore, J.V. and Ranjeva, R.** (1995). Characterization of a binding site for chemically synthesized lipo-oligosaccharidic NodRm factors in particulated fractions prepared from roots. *Plant J.* **7**, 253-260.
 19. **Bowler, C. Neuhaus, G., Yamagata, H., and Chua, N.** (1994). Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction. *Cell* **77**, 73-81.
 20. **Brewin, N.J.** (1991) Development of the legume root nodule. *Annu. Rev. Cell Biol.* **7**, 191-226.
 21. **Bush, D.S.** (1993). Regulation of cytosolic calcium in plants. *Plant Physiol.* **103**, 7-13.
 22. **Bush, D.S.** (1995). Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annu. Rev. Plant Physiol. & Plant Mol. Biol.* **46**, 95-122.
 23. **Callaham, D.A. and Torrey, J.G.** (1981). The structural basis of infection of root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium*. *Can. J. Bot.* **59**, 1647-1664.
 24. **Cárdenas, L., Domínguez, J., Quinto, C., López-Lara, I.M., Lugtenberg, B.J.J., Spaink, H.P., Rademaker, G.J., Haverkamp, J., Thomas-Oates, J.E.** (1995). Isolation, chemical structures and biological activity of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium etli*. *Plant Mol. Biol.* **29**, 453-464.
 25. **Cardenas, L., Domínguez, J., Santana, O. and Quinto, C.** (1996). The role of *nodI* and *nodJ* genes in the transport of Nod metabolites in *Rhizobium etli*. *Gene*, **173**, 183-187.
 26. **Carlson, R. W., Sanjuan, J., Bhat, U. R., Glushka, J., Spaink, H. P., Wijfjes, A. H. M., van Brussel, A. A. N., Stokkermans, T. J. W., Peters, K., and Stacey, G.** (1993). The structures and biological activities of the lipo-oligosaccharide nodulation signals produced by Type I and Type II strains of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Biol. Chem.* **268**, 18,372-18,381.
 27. **Carpita, N.C., and Gibeaut, D. M.** (1993). Structural models of primary cell walls of flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* **3**, 1-30.
 28. **Clapham, D.E.** (1995). Calcium signaling. *Cell* **80**, 259-268.
 29. **Clarkson, D.T., Brownlee, C., Ayling, S.M.** (1988). Cytoplasmic calcium measurements in intact higher plant cells: results from fluorescence ratio imaging of fura-2. *J. Cell Sci.* **91**, 71-80.
 30. **Cook, D., Dreyer, D., Bonnet, D., Howell, M., Nony, E., VandenBosch, K.** (1995). Transient induction of a peroxidase gene in *Medicago truncatula* precedes infection by *Rhizobium meliloti*. *Plant Cell* **7**, 43-55.

31. **Cren, M., Kondorosi, A., Kondorosi, E.** (1995) NodR controls expression of the *Rhizobium meliloti* nodulation genes involved in the core Nod factor synthesis. *Mol. Microbiol.* **15**, 733-747.
32. **Crespi, M.D., Jurkevith, E., Poiret, M., d'Áubenton-Carafa, Y., Petrovics, G., Kondorosi, E., Kondorosi, A.** (1994) *enod12*, a gene expressed during nodule organogenesis, codes for a non-translatable RNA involved in plant growth. *EMBO J.* **13**, 5099-5112.
33. **Creutz C.E.** (1992). The annexins and exocytosis. *Science* **258**,924-931.
34. **Demont, N., Ardourel, M., Maillet, F., Promé, D., Ferro, M., Promé, J.C. and Dénarié, J.** (1994) The *Rhizobium meliloti* regulatory *nodD3* and *syrM* genes control the synthesis of a particular class of nodulation factors *N*-acylated by (ω -1)-hydroxylated fatty acids. *EMBO J.* **13**, 2139-2149.
35. **Dénarié, J., Debelle, F., Promé, J.C.** (1996). *Rhizobium* lipochitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 503-535.
36. **Dolan, L., Duckett, C., Grierson, C., Linstead, P., Schneider, K., Lawson, E., Dean, C., Poethig, S., and Roberts, K.** (1994) Clonal relationship and cell patterning in the root epidermis of *Arabidopsis*. *Development* **120**, 2465-2474.
37. **Dolan, L., Roberts, K.** (1995) Plant development: pulled up by the roots. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **5**, 432-438.
38. **Dolan, L., Roberts, K.** (1995) The development of cell pattern in the root epidermis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* **350**, 95-99.
39. **Dolmetsch, R.E., Lewis, R.S., Goodnow, C.C., and Healy, J.** (1997). Differential activation of transcription factors induced by Ca^{2+} response amplitude and duration. *Nature* **386**, 855-858.
40. **Downie, A.** (1991). A nod of recognition. *Curr. Biol.* **1**, 382-384.
41. **Downie, A.** (1994) Signaling strategies for the nodulation of legumes by rhizobia. *Trends Microbiol.* **2**, 318-324.
42. **Edmonds BT, Murray J, Condeelis J** (1995) pH regulation of the F-actin binding properties of *Dictyostelium* elongation factor 1a. *J Biol Chem* **270**, 15222-15230
43. **Ehrhardt, D.W, Wais, R., Long, S.R.** (1996). Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Cell* **85**, 673-681.
44. **Ehrhardt, D.W., Atkinson, E.M, Long, S.R.** (1992). Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science* **256**, 998-1000.
45. **Ehrhardt, D.W., Atkinson, E.M., Faull, K.F., Freedberg, D.I., Sutherlin, D.P., Armstrong, R., and Long, S.H.** (1995) In vitro sulfotransferase activity of NodH, a nodulation protein in *Rhizobium meliloti* required for host-specific nodulation. *J. Bacteriol.* **177**, 6237-6245.
46. **Eijdens, E.W., de Haas, M., Timmerman, A.J., Van der, Schans, G.P., Kamst, E., de Nooij, J., Astaldi Ricotti, G.C., Borst, P., Baas, F.** (1995)

- Reduced topoisomerase II activity in multidrug-resistant human non-small cell lung cancer cell lines. *Br. J. Cancer* **71**, 40-47
47. **Etzler, M. E., Murphy, J.B., Stacey, G., Bradley Day, R., and Ewin, N.** (1996). A novel lectin in the roots of *Dolichos biflorus*: A candidate for a Nod factor receptor. 8th International congress on Molecular Plant-Microbe Interaction, Knoxville, TE., July 1996. S15.
 48. **Fahraeus, G** (1957) The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J Gen Microbiol* **16**: 374-81
 49. **Felle, H.H.** (1988) Auxin causes oscillations of cytosolic free calcium and pH in *Zea mays* coleoptiles. *Planta*. **174**, 495-499.
 50. **Felle, H.H., and Hepler, P.** (1997). The cytosolic Ca²⁺ concentration gradient of *Sinapsis alba* root hairs as revealed by Ca²⁺-selective microelectrode test and fura-dextran ratio imaging. *Plant Physiol.* **114**, 39-45.
 51. **Felle, H.H., Kondorosi, E., Kondorosi, A., Schultze, M.** (1995). Nod signal-induced plasma membrane potential changes in alfalfa root hairs are differentially sensitive to structural modifications of the lipochitooligosaccharide. *Plant J.* **7**, 939-947.
 52. **Felle, H.H., Kondorosi, E., Kondorosi, A., Schultze, M.** (1996). Rapid alkalinization in alfalfa root hairs in response to rhizobial lipochitooligosaccharide signals. *Plant J.* **10**, 295-301.
 53. **Fernández-López, M., D'Haese, W., Mergaert P., Verplancke, C., Promé, J.-C., Van Montagu, M., and Holsters, M.** (1996) Role of *nodI* and *nodJ* in lipo-chitooligosaccharide secretion in *Azorhizobium caulinodans* and *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **20**, 993-1000.
 54. **Firmin, J.L., Wilson, K.E., Carlson, R.W., Davies, A.E., and Downie, J.A.** (1993) Resistance to nodulation of cv Afganistan peas is overcome by *nodX* which mediates an *O*-acetylation of the *Rhizobium leguminosarum* lipooligosaccharide nodulation factor. *Mol. Microbiol.* **10**, 351-360.
 55. **Fisher, R. and Long, S.R.** (1992). *Rhizobium*-plant signal exchange. *Nature* **357**, 655-660.
 56. **Fisher, R.F., Long, S.R.** (1993) Interactions of NodD at the nod Box: NodD binds to two distinct sites on the same face of the helix and induces a bend in the DNA. *J. Mol. Biol.* **5**, 336-348.
 57. **Geelen, D., Leyman, B., Mergaert, P., Klarskov, K., Van Montagu, M., Geremia, R., and Holsters, M.** (1995) NodS is an *S*-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase that methylates chitooligosaccharides deacetylated at the non-reducing end. *Mol. Microbiol.* **17**, 387-397.
 58. **Geiger, O., Thomas-Oates, J.E., Glushka, J., Spaink, H.P., Lugtenberg, B.J.** (1994) Phospholipids of *Rhizobium* contain nodE-determined highly unsaturated fatty acid moieties. *J. Biol. Chem.* **269**, 11090-11097.

59. **Gilroy, S., and Jones, R.L.** (1992). Gibberellic acid and abscisic acid coordinately regulate cytoplasmic calcium and secretory activity in barley aleurone protoplast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 3591-3595.
60. **Gilroy, S., Bethke, P.C. and Jones, R.L.** (1993). Calcium homeostasis in plants. *Cell Sci.* **106**, 453-462.
61. **Gilroy, S., Read, N.D., and Trewavas, A.J.** (1990). Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged inositol triphosphate initiate stomatal closure. *Nature* **346**, 769-771.
62. **Haberlandt, G.** (1887). "Ueber die Beziehungen zwischen funktion und lage des zellkernes bei den pflanzen". Jena.
63. **Hasegawa, T., Takahashi, S., Hayashi, H., Hatano, S.** (1980). Fragmin: a calcium ion sensitive regulatory factor on the formation of actin filaments. *Biochemistry* **19**, 2677-2683.
64. **Heath I.B.** (1990). Tip growth in plant and fungal cells. London: Academic press.
65. **Heidstra, R., Geurts, R., Franssen, H., Spaink, H.P., van Kammen, A., Bisseling, T.** (1994). Root hair deformation activity of nodulation factors and their fate on *Viciae sativa*. *Plant Physiol.* **105**, 787-797.
66. **Heidstra, R., Yang, C.W., Yalcin, Y., Peck, S., Emons, A., van Kammen, A. and Bisseling, T.** (1997) Ethylene provides positional information on cortical cell division but is not involved in Nod factor-induced root hair tip growth in *Rhizobium*-legume interaction. *Development* **124**, 1781-1787.
67. **Hepler, P.K.** (1997). Tip growth in pollen tubes: calcium leads the way. *Trends in plant sci.* **2**, 79-80.
68. **Hepler, P.K., and Wayne, R.O.** (1985). Calcium in plant development. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **36**, 397-439.
69. **Hille, B.** (1984). Ionic channels of excitable membranes. Sinauer Assoc., Sunderland, MA, **426p**.
70. **Hirsch, A.** (1992). Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.* **122**, 211-237.
71. **Holdaway-Clarke, T.L., Feijo, J.A., Hacket, G.R., Kunkel, J.G. and Hepler, P.** (1997). Pollen tube growth and the intracellular cytosolic calcium gradient oscillate in phase while extracellular calcium influx is delayed. *The Plant Cell* **9**, 1999-2010.
72. **Horvath, B., Heidstra, R., Lados, M., Moerman, M., Spaink, H.P., Promé, J.C, van Kammen, A., Bisseling, T.** (1993). Lipooligosaccharides of *Rhizobium* induce infection-related early nodulin gene expression in pea root hairs. *Plant J.* **4**, 727-733.
73. **Izumo, M., Ridge, R.W. and Katsumi, M** (1994) Effects of plant hormones and plant hormone inhibitors on the growth and morphology of root hairs. In:

proceedings of the 29th Plant Chemical Regulation Congress, Riken, Wako, Japan.

74. **Jabbouri, S., Fellay, R., Talmont, F., Kamalaprija, P., Burger, U., Relic, B., Promé, J.C., Broughton, J.** (1995) Involvement of *NodS* in *N*-methylation and *NodU* in 6-*O*-carbamoylation of *Rhizobium* sp. NGR234 Nod factor. *J. Biol. Chem.* **270**, 22968-22973.
75. **Jaffe, L.F. and Levy, S.** (1987). Calcium gradients measured with a vibrating calcium-selective electrode. Proceedings, 9th annual conference IEEE Rng. Med. Biol. Soc. Boston, November 13-16.
76. **Jones, D.L., Shaff, J.E., Kochian, L.V.** (1995) Role of calcium and other ions in directing root hair tip growth in *Limnobium stoloniferum*. *Planta*, **197**, 672-680.
77. **Journet, E.P., Pichon, M., Dedieu, A., De Billy, F., Truchet, G., Barker, D.G.** (1994). *Rhizobium meliloti* Nod factors elicit cell specific transcription of the *ENOD12* gene in transgenic alfalfa. *Plant J.* **6**, 241-249.
78. **Kamst, E., Pilling, J., Raamsdonk, L.M., Lugtenberg, B.J., Spaink, H.P.** (1997) *Rhizobium* nodulation protein NodC is an important determinant of chitin oligosaccharide chain length in Nod factor biosynthesis. *J. Bacteriol.* **179**, 2103-2108
79. **Kieber, J.J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldmann, K.A., and Ecker, J.R.** (1993) CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell* **72**, 427-441.
80. **Kochian, L.V.** (1995). Cellular mechanisms of aluminium toxicity and resistance in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Pant Mol. Biol.* **46**, 237-260.
81. **Kohno T and Shimmen T.** (1988) Mechanism of Ca²⁺ inhibition of cytoplasmic streaming in lily pollen tubes. *J. Cell. Sci.* **91**, 501-509.
82. **Kohno, T., Shimmen, T.** (1988). Ca²⁺-induced fragmentation of actin filaments in pollen tubes. *Protoplasma* **141**, 177-179.
83. **Kühtreiber, W., and Jaffe, L.F.** (1990). Detection of extracellular calcium gradients with a calcium-specific vibrating electrode. *J. Cell. Biol.* **110**, 1565-1573.
84. **Kunkel, J.G. and Bowdan, E.** (1989). Modeling currents about vitellogenic oocytes of the cockroack, *Blattella germanica*. *Biol. Bull. Woods hole* **1762**, 96-102.
85. **Kurkdjian, A.C.** (1995). Role of the differentiation of root epidermal cells in Nod factor from *Rhizobium meliloti*-induced root-hair depolarization of *Medicago sativa*. *Plant Physiol.* **107**, 783-790.
86. **Kuroda, K.** (1990) Cytoplasmic streaming in plant cells. *Int. Rev. Cyt.* **121**, 267-307.

87. **Lamb, J.A., Allen P.G. Tuan, B.Y., and Janmey P.A.** (1993) Modulation of gelsolin function. *J. Biol. Sci.* 12, 8999-9004.
88. **Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J.C., Dénairé, J.** (1990). Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 344, 781-784.
89. **Libbenga, K.R., van Iren, F., Bogers, R.J., and Schraag-Lamers, M.F.** (1973) The role of hormones and gradients in the initiation of cortex proliferation and nodule formation in *Pisum sativum* L. *Planta* 114, 19-39.
90. **Llinás, R. Sugimori, M., Silver, R.B.** (1992). Microdomains of high calcium concentration in a presynaptic terminal. *Science* 256, 677-679.
91. **Lloyd, C.W., Pearce, K.J., Rawlins, D.J., Ridge, R.W., Shaw, P.J.** (1987) Endoplasmic microtubules connect the advancing nucleus to the tip of legume root hairs, but F-actin is involved in basipetal migration. *Cell Motil Cytoskeleton* 8, 27-36.
92. **López-Lara, I.M., van der Berg, J.D.J., Thomas Oates, J.E., Glushka, J., Lugtenberg, B.J.J., Spaink, H.P.** (1995) Structural identification of lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals of *Rhizobium loti*. *Mol. Microbiol.* 15, 627-638.
93. **Martinez, E., Laeremans, T., Poupot, R., Rogel, M.A., López, L., Garcia, F., Vanderleyden, J., Prome, J.C., Lara, F.** (1995) Nod metabolites and other compounds excreted by *Rhizobium* spp. In I. A. Tikhonovich et al, eds., *Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications* :281-286.
94. **Martinez, E., Poupot, R., Prome, J.C., Pardo, M.A., Segobia, L., Truchet, G., Denarie, J.** (1993) Chemical signaling of *Rhizobium* nodulating bean. In R. Palacios et al., eds, *New Horizons in Nitrogen Fixation.* :171-175.
95. **Mc Ainsh, S.R., Webb, A.A.R., Taylor, J.E. and Hetherington, A.M.** (1995). Stimulus-induced oscillations in guard-cell cytosolic free calcium. *Plant Cell* 7, 1207-1219.
96. **Mckay, I.A. and Djordjevic, M.A.** (1993) Production and excretion of Nod metabolites by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* are disrupted by the same enviromental factors that reduce nodulation in the field. *Appl. Env. Microbiol.* 59, 3385-3392.
97. **Mergaert, P., D'Haese, W., Geelen, D., Promé, D., Van Montagu, M., Geremia, R., Promé, J.-C., and Holsters, M.** (1995) Biosynthesis of *Azorhizobium caulinodans* Nod factors: study of the activity of the NodABC proteins by expresion of the genes in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 270, 29217-29223.
98. **Mergaert, P., van Montagu, M., Promé, J.C., Holsters, M.** (1993) Three unusual modifications, a D-arabinosyl, an *N*-methyl, and a carbamoyl group are

- present on Nod factors of *Azorhizobium caulinodans* strain ORS571. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**, 1551-1555.
99. **Miller, D.D., Lancelle, S.A., Hepler, P.K.** (1996) Actin microfilaments do not form a dense meshwork in *Lilium longiflorum* pollen tube tips. Protoplasma **195**, 123-132.
 100. **Miller, D.D., Callaham, D.A., Gross, D.J., and Hepler, P.K.** (1992). Free Ca²⁺ gradient in growing pollen tubes of *Lilium*. J. Cell Sci. **101**, 7-12.
 101. **Mylyona, P., Pawlowski, K., Bisseling, T.** (1995). Symbiotic Nitrogen Fixation. Plant Cell **7**, 869-885.
 102. **Nutman, P.S.**, (1959) Some observations on root-hair infection by nodule bacteria. J. Exp. Bot. **10**, 250-263.
 103. **Pérez, H.E., Sánchez, N., Vidali, L., Hernández, J.M., Lara, M., Sánchez, F.** (1994) Actin isoforms in non-infected roots and symbiotic nodules of *Phaseolus vulgaris* L. Planta **193**, 51-56
 104. **Phillips, D.A., Joseph, C.M., and Maxwell, C.A.** (1992). Trigonellina and stachydrine released from alfalfa seeds activate NodD2 protein in *Rhizobium meliloti*. Plant physiol. **99**, 1526-1531.
 105. **Pierson, E.S., Miller, D.D., Callaham, D.A., Shipley, A.M., Rivers, B.A., Cresti, M., and Hepler, P.K.** (1994). Pollen tube growth is coupled to the extracellular calcium ion flux and the intracellular calcium gradient: Effect of BAPTA-type buffers and hypertonic media. Plant Cell **6**, 1815-1828.
 106. **Pierson, E.S., Miller, D.D., Callaham, D.A., van Aken, J., Hackett, G., and Hepler, P.K.** (1996). Tip-localized calcium entry fluctuates during pollen tube growth. Dev. Biol. **174**, 160-173.
 107. **Poovaliah, B.W. and Reddy, A.S.N.** (1993) Crit. Rev. Plant Sci. **12**, 185-211.
 108. **Poupot, R., Martinez-Romero, E., and Promé, J. C.** (1993). Nodulation factors from *Rhizobium tropici* are sulfated or nonsulfated chitopentascaccharides containing an *N*-methyl-*N*-acylglucosaminyl terminus. *Biochemistry* **32**, 10,403-10,435.
 109. **Price, N.P.J., Relic, B., Talmont, F., Lewin, A., Promé, D., Pueppke, S.G., Maillet, F., Dénairé, J., Promé, J.C., Broughton, W.J.** (1992). Broad-host range *Rhizobium* species strain NGR234 secretes a family of carbamoylated, and fucosylated, nodulation signals that are *O*-acetylated or sulphated. Mol. Microbiol. **6**, 3575-3584.
 110. **Quinto, C., Wijfjes, A., Bloemberg, G., Blok-Tip, L., López-Lara, I., Lugtenberg, B.J.J., Thomas-Oates, J., and Spaink, H.** (1997). Bacterial nodulation protein NodZ is a chitin oligosaccharide fucosyltransferase which can also recognize related substrates of animal origin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **94**, 4336-4341.
 111. **Relic, B., Talmont, F., Kopcinska, J., Golinowski, W., Promé, J.C., Broughton, W.J.** (1993). Biological activity of *Rhizobium* sp. NGR234 Nod-

- factors on *Macropodium atropurpureum*. Mol. Plant-Microbe Interact. **6**, 764-774.
112. **Ridge RW, Rolfe BG** (1985) *Rhizobium* sp. degradation of legume root hair cell wall at the site of infection thread origin. Appl. Environ. Micro. **50**, 717-720
 113. **Ridge, R.W.** (1992). A model of legume root hair growth and *Rhizobium* infection. Symbiosis **14**, 359-373.
 114. **Rivilla, R., Sutton, J.M., and Downie, J.A.** (1995) *Rhizobium leguminosarum* NodT is related to a family of outer-membrane transport proteins that includes TolC, PrtF, CyaE and AprF. Gene **161**, 27-31.
 115. **Roche, P., Lerouge, P., Phonthus, C., and Prome, J. C.,** (1991). Structural determination of bacterial nodulation factors involved in the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis. J. Biol. Chem. **266**, 10,933-10,940.
 116. **Röhrig, H., Schmidt, J., Wieneke, U., Kondorosi, E., Barlier, I., Schell, J. and John, M.** (1994) Biosynthesis of lipooligosaccharide nodulation factors: *Rhizobium* NodA protein is involved in *N*-acylation of the chitooligosaccharide backbone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **91**, 3122-3126.
 117. **Rosenshine, I., Finlay, B.B.** (1993) Exploitation of host signal transduction pathways and cytoskeletal functions by invasive bacteria. Bioassays **15**, 17-24.
 118. **Saier, M.H. Jr., Tam, R., Reizer, A., Reizer, J.** (1994) Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. Mol. Microbiol. **11**, 841-847.
 119. **Sánchez, F., Padilla, J.E., Pérez, H.E., Lara, M.** (1991) Control of nodulin genes in root-nodule development and metabolism. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **42**: 507-528.
 120. **Sanjuan, J., Carlson, R.W., Spaink, H.P., Bhat, 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*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **89**, 8789-8793.
 121. **Schatten, G., Bestor, T., Balczon, R., Henson, J., and Schatten, H.** (1985) Intracellular pH shift leads to microtubule assembly and microtubule-mediated motility during sea urchin fertilization: correlation between intracellular pH and microtubule activity and depressed intracellular pH and microtubule disassembly. Eur. J. Cell Biol. **36**, 116-127.
 122. **Scheres, B., van de Wiel, C., Zalensky, A., Horvath, B., Spaink, H., van Eck, H., Zwartkuis, F., Wolters, A., Gloudemans, T., van Kammen, A., and Bisseling, T.** (1990) The ENOD12 gene product is involved in the infection process during the pea-*Rhizobium* interaction. Cell **60**: 281-294.
 123. **Schiefelbein, J.W., Shipley, A., Rowse, P.** (1992). Calcium influx at the tip of growing root-hair cells of *Arabidopsis thaliana*. Planta **187**, 455-459.
 124. **Schlaman, H., Okker, R., Lugtenberg, B.** (1992). Regulation of nodulation gene expression by *nodD* in Rhizobia. J. Bacteriol. **174**, 5177-5182.

125. **Schroeder, J.I. and Hagiwara, S.** (1990). Repetitive increases in cytosolic Ca^{2+} of guard cells by abscisic acid activation of nonselective Ca^{2+} permeable channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9305-9309.
126. **Schultze, M., Kondorosi, E., Ratet, P., Buiré, M., Kondorosi, A.** (1994). Cell and molecular biology of *Rhizobium*-Plant interactions. *Int. Rev. Cytol.* **156**, 1-75.
127. **Schultze, M., Quiclet-Sire, B., Kondorosi, E., Virelizier, H., Glushka, J.N., Endre, G., Géro, S.D., Kondorosi, A.** (1992). *Rhizobium meliloti* produces a family of sulphated lipo-oligosaccharides exhibiting different degrees of plant host specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 192-196.
128. **Schultze, M., Staehelin, C., Röhrig, H., John, M., Schmidt, J., Kondorosi, E., Schell, J. and Kondorosi, A.** (1995) In vitro sulfotransferase activity of *Rhizobium meliloti* NodH protein: Lipochitooligosaccharide nodulation signals are sulfated after synthesis of the core structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 2706-2709.
129. **Schwedock, J.S. and Long, S.H.** (1990). ATP sulphurylase activity of the *nodP* and *nodQ* gene products of *Rhizobium meliloti*. *Nature* **348**, 644-647.
130. **Schwedock, J.S., Liu, C., Leyh, T.S., Long, S.R.** (1994) *Rhizobium meliloti* NodP and NodQ form a multifunctional sulfate-activating complex requiring GTP for activity. *J. Bacteriol.* **176**, 7055-7064.
131. **Sethi, R.S., Reporter, M.** (1981). Calcium localization pattern in clover root hair cells associated with infection process. Studies with aureomycin. *Protoplasma* **105**, 321-325.
132. **Shimmen, T.** (1992) Mechanism of cytoplasmic streaming and amoeboid movement. In: Sugi H (Ed) *Muscle contraction and cell motility, molecular and cellular aspects.* Springer, Berling Heidelberg new York, pp 172-205.
133. **Shimmen, T., Hamatani, M., Saito, S., Yokota, E., Mimura, T., Fusetani, N., and Karakai, H.** (1995) Roles of actin filaments in cytoplasmic streaming and organization of transvacuolar strands in root hair cells of *Hydrocharis*. *Protoplasma* **185**, 188-193.
134. **Smit, G., de Koster, C.C., Schripsema, J., Spaink, H., Van Brussel, A.A., and Kijne, J.W.** (1995). Uridine, a cell division factor in pea roots. *Plant Mol. Biol.* **29**, 869-873.
135. **Smith, J.S., Sanger, R.H., Jaffe, L.F.** (1994). The vibrating Ca^{2+} electrode: A new technique for detecting plasma membrane regions of Ca^{2+} influx and efflux. *Methods Cell Biol.* **40**, 115-134.
136. **Spaink, H.P.** (1992) Rhizobial lipo-oligosaccharides: Answers and questions. *Plant Mol. Biol.* **20**, 977-986.
137. **Spaink, H.P., Bloemberg, G.V., van Brussel, A.A.N., Lugtenberg, B.J.J., van der Drift, K.M.G.M., Haverkamp, J., Thomas-Oates, J.E.** (1995) Host specificity of *Rhizobium leguminosarum* is determined by the hydrophobicity of

- highly unsaturated fatty acyl moieties of the nodulation factors. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**, 155-164.
138. **Spaink, H.P., Okker, R.J.H., Wijffelman, C.A., Pees, E., Lugtenberg, B.J.J.** (1987) Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. *Plant Mol. Biol.* **9**, 29-37.
 139. **Spaink, H.P., Sheeley, 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.
 140. **Stacey, G., Luka, S., Sanjuan, J., Banfalvi, Z., Nieuwkoop, A.J., Chun, J.Y., Forsberg, L.S., Carlson, R.** (1994) nodZ, a unique host-specific nodulation gene, is involved in the fucosylation of the lipooligosaccharide nodulation signal of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* **176**, 620-633
 141. **Stokkermans, T.J.W., Peters, N.K.** (1994). *Bradyrhizobium elkanii* lipooligosaccharide signal induces complete nodule structures on *Glycine soja* Siebold et Zucc. *Planta* **193**, 413-420.
 142. **Theriot, J.** (1995). The cell biology of infection by intracellular bacterial pathogen. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **11**, 213-239.
 143. **Truchet, G., Roche, P., Lerouge, P., Vasse, J., Camut, S., de Billy, F., Promé, J.C., Dénarié, J.** (1991). Sulphated lipooligosaccharide signals from *Rhizobium meliloti* elicit nodule organogenesis in alfalfa. *Nature* **351**, 670-673.
 144. **Tsien, R.W. and Tsien, R.Y.** (1990). Calcium channels, stores, and oscillations. *Ann. Rev. Cell. Biol.* **6**, 715-760.
 145. **Van Batenburg, F.H.D., Jonker, R. and Kijne, J.W.** (1986). *Rhizobium* induces marked root hair curling by redirection of tip growth: a computer simulation. *Physiol. Plant.* **66**, 476-480.
 146. **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 lipooligosaccharides of *Rhizobium*. *Science*. **257**, 70-72.
 147. **Van de Sande, K., Pawlowski, K., Czaja, I., Wieneke, U., Schell, J., Schmidt, J., Walden, R., Matvienko, M., Wellink, J., van Kammen, A., Franssen, H., and Bisseling, T.** (1996) Modification of phytohormone response by a peptide encoded by ENOD40 of legumes and a nonlegume. *Science* **273**: 370-373.
 148. **Van Spronsen, P.C., Bakhuizen, R., van Brussel, A.A.N., Kijne, J.W.** (1994). Cell wall degradation during infection thread formation by the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* is a two-step process. *Eur. J. Cell Biol.* **64**, 88-94.

149. **Vázquez, M., Dávalos, A., de las Peñas, A., Sanchez, F., Quinto, C.** (1991) Novel organization of the common nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* strains. *J. Bacteriol.* **173**, 1250-1258.
150. **Vázquez, M., Santana, O., and Quinto, C.** (1993) The NodI and NodJ proteins from *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* strains are similar to capsular polysaccharide secretion proteins from Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* **8**, 369-377.
151. **Vidali L, Pérez HE, Valdés VV, Noguez R, Zamudio F, Sánchez F** (1995) Purification, characterization, and cDNA cloning of profilin from *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.* **108**, 115-23
152. **Villalobos, M., Nava, N., Vázquez, M., Quinto, C.** (1994) Nucleotide sequence of the *Rhizobium etli nodS* gene. *Gene* **150**, 201-202.
153. **Waelkens, F., Voets, T., Vlassak, K., Vanderleyden, J., and van Rhijn, P.** (1995) The *nodS* gene of *Rhizobium tropici* strain CIAT899 is necessary for nodulation on *Phaseolus vulgaris* and on *Leucaena leucocephala*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**, 147-154.
154. **Ward, J.M and Schroeder J.I.** (1994). Calcium-activated K⁺ channels and calcium-induced calcium release by slow vacuolar ion channels in guard cell vacuoles implicated in the control of stomatal closure. *The Plant Cell* **6**, 669-683.
155. **Webb, A.A.R., Taylor., J.E., McAinsh, M.R., and Hetherington, A.M.** (1995). Calcium ions as intracellular second messengers in plants. *Adv. Bot. Res.*, in press.
156. **Wood, S., and Newcomb, W.** (1989) Nodule morphogenesis: the early infection of alfalfa (*Medicago sativa*) root hairs by *Rhizobium meliloti*. *Can. J. Bot.* **6**, 3108-3122.
157. **Zhang, D.H., Wadsworth, P., Hepler, P.K.** (1993). Dynamics of microfilaments are similar, but distinct from microtubules during cytokinesis in living, dividing plant cells. *Cell. Motyl. Cytoskeleton* **24**, 151-155.
158. **Zorec, R. and tester, M.** (1992). Cytoplasmic calcium stimulates exocytosis in a plant secretory cells. *Biophys J.* **63**: 864-867.

ANEXO I

NodI y NodJ en la secreción de los factores Nod

Publicación en Gene

PRESENTACION

El transporte de los FNs al medio extracelular se cree que es un proceso en los que NodI y NodJ mantienen una función muy importante. El papel de estas proteínas está apoyada por las mutantes en los genes correspondientes (*nodI* y *nodJ*) en *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Estas mutantes presentan dificultades para exportar los factores Nod (McKay y Djordjevic, 1993) y en parte también esta afectado por las condiciones ambientales como temperatura y pH. Por otro lado, otros estudios han revelado que las proteínas NodI y NodJ se localizan en la membrana citoplasmática, indicando su posible papel en el transporte de los FNs. Sin embargo, otro trabajo describe que mutantes en *nodI* y *nodJ* en *R. leguminosarum* bv. *viciae* no inhiben la capacidad de exportar estos metabolitos de nodulación (Spaink et al., 1992). Esta segunda evidencia sugiere la presencia de otras proteínas relacionadas con el transporte de los FNs. Las proteínas NodI y NodJ presentan similitudes con KpsT y KpsM de *Escherichia coli* (Vázquez et al., 1993) los cuales son miembros de un sistema de transporte de antígenos capsulares (Smith et al., 1990). Los análisis de secuencia de aminoácidos han permitido determinar que KpsT y KpsM son miembros de los transportadores del tipo ABC (ATP binding cassette) en el cual KpsT contiene el sitio de unión a ATP y KpsM el dominio membranal (Fath and Kolter, 1993).

Los mecanismos por los cuales NodI y NodJ transportan los FNs son aun desconocidos. Sin embargo, dada la similitud con KpsM y KpsT, es posible hacer algunas especulaciones por analogía con los modelos hipotetizados para el proceso de transporte de antígenos capsulares. NodI tiene las propiedades de la proteína de unión a ATP y NodJ los perfiles hidrofóbicos característicos de una proteína de membrana (Vázquez et al., 1993). En el presente trabajo, mostramos fuertes evidencias para demostrar el papel de NodI y NodJ en el transporte de los FNs en *Rhizobium etli*. Estos datos demuestran por primera vez el papel esencial de estas proteínas para la secreción de los FNs en los eventos iniciales (1-4 hrs) de la interacción simbiótica. Las mutaciones en *nodI* y *nodJ* también dan como resultado un retraso de la nodulación lo cual puede ser una consecuencia directa de la cantidad de FNs presentes en el medio. Actualmente se estudia la presencia de transportadores alternos que de igual forma podrían estar relacionados con el transporte de los FNs ya que después de 8 hrs en las mutantes se puede observar una secreción tardía.

McKay, I., and Djordjevic, M.A. (1993) Production and excretion of Nod metabolites by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* are disrupted by the same environmental factors that reduce nodulation in the field. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 3385-3392.

Spaink, H.P., Aarts, A., Stacey, G., Bloemberg, G., Lugtenberg, B.J., and Kennedy, E.P. (1992) Detection and separation of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* nod metabolites using thin-layer chromatography. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**, 72-80.

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

Smith, A.N., Boulnois, G.J., and Roberts, I.S. (1990) Molecular analysis of the *Escherichia coli* K5 *kps* locus: Identification and characterization of an inner -membrane capsular polysaccharide transport system. *Mol. Microbiol.* **4**, 1863-1869.

Fath, M.J. and Kolter, R. (1993) ABC transporters: Bacterial exporters. *Microbiol. Rev.* **57**, 995-1017.

ANEXO I
Publicación en Gene

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

Reprinted from

gene

an international journal focusing on gene
cloning and gene structure and function

Gene, 173 (1996) 183–187

© 1996 Elsevier Science B.V. All rights reserved. 0378-1119/96/\$15.00

GENE 09763

The role of the *nodI* and *nodJ* genes in the transport of Nod metabolites in *Rhizobium etli*

(Nodulation; symbiosis; naringenin; membrane transporters; secretion)

Luis Cárdenas, Jimena Domínguez, Olivia Santana and Carmen Quinto

*Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca,
Morelos CP62271, Mexico*



ELSEVIER

GENE 09763

The role of the *nodI* and *nodJ* genes in the transport of Nod metabolites in *Rhizobium etli*

(Nodulation; symbiosis; naringenin; membrane transporters; secretion)

Luis Cárdenas, Jimena Domínguez, Olivia Santana and Carmen Quinto

Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos CP62271, Mexico

Received F. Bolívar: 22 August 1995; Revised/Accepted: 19 November/5 December 1995; Received at publishers: 20 February 1996

SUMMARY

A kinetic analysis of secretion of lipo-chitin oligosaccharides (LCO) produced by *Rhizobium etli* (*Re*) wild-type (wt) strain and derivatives carrying disrupted *nodI* or *nodJ* genes was performed. LCO were detected in the growth media of the wt strain as early as 1 h after *nod* gene induction. In contrast, strains carrying *nodI* or *nodJ* mutations secreted less LCO, and accumulated LCO metabolites intracellularly after 4 h of induction. These *Re* mutants presented a delayed nodulation phenotype and a reduction in the maximum number of nodules formed in *Phaseolus vulgaris* roots.

INTRODUCTION

Rhizobia are Gram⁻ soil bacteria capable of inducing nitrogen-fixing root nodules on leguminous plants. Plant released compounds activate expression of bacterial *nod* genes, products of which are involved in the synthesis of lipo-chitin oligosaccharides (LCO), required for nodule induction (Dénarié and Cullimore, 1993). The *nodABC* genes, participate in the biosynthesis of the LCO backbone (Spaink et al., 1991; John et al., 1993; Geremia et al., 1994). Other genes taking part in the nodulation process, the *hsn* genes (for host-specific nodulation), mediate chemical modification of the LCO backbone with other

substituents (Dénarié and Cullimore, 1993). The *nodI* and *nodJ* genes have been found in several rhizobia (Evans and Downie, 1986; Göttfert et al., 1990; Geelen et al., 1993; Vázquez et al., 1993). We proposed that they are members of a polysaccharide secretion system that may be involved in the secretion of LCO (Vázquez et al., 1993). Spaink et al. (1992) found that inactivation of *nodI*, *nodJ* and *nodT* in *R. leguminosarum* (*Rl*) bv. *viciae* did not affect the amount of LCO secreted. In contrast, LCO secretion was not detected in *nodIJ* mutants from *Rl* bv. *trifolii* after overnight induction of *nod* (McKay and Djordjevic, 1993). The aim of present studies was the kinetics of *R. etli* (*Re*) LCO secretion, and the role of *nodIJ* in the secretion of LCO.

Correspondence to: Dr. C. Quinto, Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos CP 62271, México. Tel. (52-73) 114-900; Fax (52-73) 172-388; e-mail: quinto@ibt.unam.mx

EXPERIMENTAL AND DISCUSSION

(a) Production and detection of extracellular Nod factors from *Re* CE3

LCO from the growth medium were obtained and analyzed by TLC. In the presence of the inducer, naringenin, strain CE3 produced two main radiolabeled LCO (Fig. 1, lane 5). These were not detected in an uninduced culture

Abbreviations: A, absorbance (1 cm); aa, amino acid(s); bp, base pair(s); biovar, HPLC high-performance liquid chromatography; kb, kilobase(s) or 1000 bp; LCO, lipo-chitin oligosaccharide(s); *nod* or *nol*, nodulation gene(s); Nod, nodulation; nt, nucleotide(s); ORF, open reading frame; *P.*, *Phaseolus*; *R.*, *Rhizobium*; *Re*, *R. etli*; *Rl*, *R. leguminosarum*; S, sodium dodecyl sulfate; Sym, symbiotic; TLC, thin-layer chromatography; wt, wild type; [], denotes plasmid (cosmid)-carrier state.

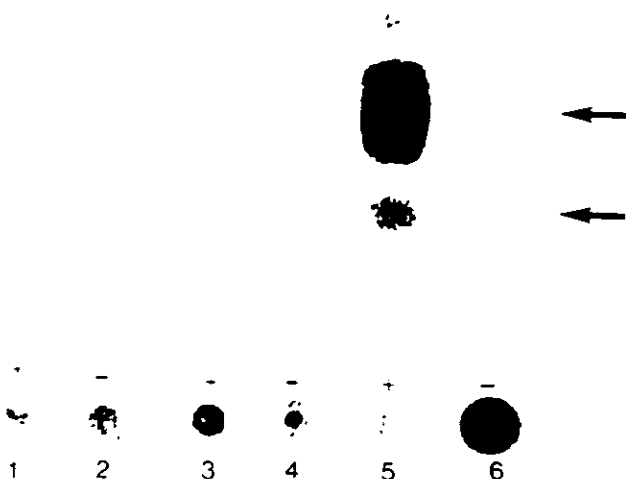


Fig. 1. TLC analysis of ^{14}C -labeled Nod factors produced by *Re* strains. Lanes: 1 and 2, UBP102 (*nodA*⁻); 3 and 4, CFN2001; 5 and 6, CE3 (wt). +, culture after growth with 2 μM naringenin, to induce LCO biosynthesis; -, uninduced culture. Arrows mark the fast-migrating (top) and the slow-migrating band (bottom). Methods: Bacteria were pre-grown overnight in liquid B⁻ medium at 30^o C to an $A_{620\text{nm}}$ of 0.2 and diluted to an $A_{620\text{nm}} = 0.02$ in 1.0 ml of B⁻ medium (Spaink et al., 1987). Subsequently, 0.2 μCi of [^{14}C]D-glucosaminehydrochloride (specific activity 50 mCi/mmol, Amersham, UK) and 2 μM naringenin were added and incubated overnight. LCO were extracted with 1.0 ml of water-saturated *n*-butanol as described (Spaink et al., 1992). The butanol was removed by evaporation and the dry pellet was resuspended in 20 μl of *n*-butanol. Extracts were analyzed by TLC as follows. A volume of 3 μl was loaded on a reverse-phase C₁₈-coated silica ODS (100% octadecyl silanization) plate (Sigma, St. Louis, MO, USA), and developed using acetonitrile-water (1:1). The distribution of radioactivity was visualized with a Molecular Dynamics Phosphorimager equipped with Image QuantTM software following exposure of the samples for 24–72 h.

Fig. 1, lane 6). No radiolabeled metabolites from the mutant UBP102 (*nodA*⁻) and the CFN-2001 strains (lacking of the symbiotic plasmid) were observed (Fig. 1, lanes 1 and 3). As shown for the wt strain CE3, when the LCO were analyzed by HPLC, two inducible broad peaks were obtained (Poupot et al., 1995; Cárdenas et al., 1995) which consist of *N*-acetylglucosamine pentasaccharides of which the non-reducing residue is *N*-methylated and *N*-acylated with *cis*-vaccenic acid (C18:1) (peak I) or stearic acid (C18:0) (peak II) and carries a carbomyl group at C4. The reducing end is substituted at the C6 position with *O*-acetylfucose. These LCO induce nodule primordia on the roots of *P. vulgaris* (Cárdenas et al., 1995).

(b) Kinetics of LCO secretion in UBP409 and UBP406 mutant strains

Approximately 2 kb downstream from the *Re nodC* gene, *nodI*-like and *nodJ*-like sequences were identified by nt sequence of two independent insertions, pRp9 (*nodI* insertion), and pRp6 (*nodJ* insertion), in cosmid

pSM991.25 which carrying the complete *nod* regulon (Vázquez et al., 1993). Based on the similarity of NodI and NodJ with capsular polysaccharide secretion proteins from other Gram⁻ bacteria, such as the KpsT-KpsM, BexA-BexB and CtrD-CtrC protein pairs from *Escherichia coli* K1 and K5 strains, *Haemophilis influenzae* and *Neisseria meningitidis*, respectively, we have been proposed that *nodIJ* genes are members of a polysaccharide secretion system (Vázquez et al., 1993). NodI, KpsT, BexA and CtrD have at least one potential ATP-binding site (Vázquez et al., 1993). NodI has been localized in the cytoplasmic membrane fraction (Schlaman et al., 1990). NodJ, KpsM, BexB and CtrC proteins are the putative hydrophobic membrane components of the ABC (for a highly conserved *ATP-binding cassette*) transporters, and they have virtually identical hydropathy profiles (Vázquez et al., 1993). In order to experimentally test our hypothesis a kinetic analysis of the LCO release was performed in CFN2001[pSM991.25], UBP406 (carrying pRp6 insertion) and UBP409 (carrying pRp9 insertion) strains (Table I). Interestingly, as early as 1 h after *nod* gene induction, LCO were detected in strain CFN2001[pSM991.25], while in strains UBP406 and UBP409 (Fig. 2A and B) they were detected only after 4 h of induction. These results show an evident difference in the kinetics of LCO secretion in UBP406 and UBP409 compared to CFN2001[pSM991.25]. It is noteworthy that in UBP406 and UBP409 mutant strains only the fast-migrating LCO was detected (Fig. 2A and B).

In order to investigate if the lower levels of LCO detected in UBP409 and UBP406 resulted from a decrease in LCO biosynthesis or its secretion, TLC analyses of the accumulated LCO metabolites within the bacterial cell were performed. As shown in Fig. 3B, we detected considerably less Nod metabolites in the cell pellet of CFN2001[pSM991.25] as compared to that of UBP409 (Fig. 3A) and UBP406 (Fig. 3C). Thus, we conclude that *nodI* and *nodJ* mutant strains have a diminished capability to secrete the Nod metabolites at early times and that they are unable to secrete the slow-migrating species.

It is possible that pRp9 and pRp6 could have a polar effect on the expression of a gene(s) located downstream from *nodJ*. About 1 kb downstream from *nodIJ* the *nodD*₁ gene is located in opposite orientation. We have determined the entire nt sequence between the stop codons of *nodJ* and *nodD*₁ genes. No significant nt similarity to any gene within the GenBank database was found. Moreover, we analyzed the secretion of LCO in strain UBP405 which carrying a pRp5 insertion located approximately 297 bp downstream from *nodJ*. No diminished secretion or production of LCO was detected in this strain (data not shown).

TABLE I
Bacterial strains and cosmids

Strains or cosmids	Relevant characteristics ^a	Source of reference
Re Strains		
CE3	Spontaneous Sm ^R derivative of wt strain CFN42; Nod ⁺ Fix ⁺	Noel et al. (1984)
CFN2001	Rif ^R derivative of CFN42 cured of p42a and p42d; Nod ⁻ Fix ⁻	Palacios et al. (1983)
UBP102	CE3 derivative with <i>nodA::MudIIPR13</i> in p42d	Vázquez et al. (1991)
UBP409	CFN2001 [pRp9]	This work
UBP406	CFN2001 [pRp6]	This work
UBP405	CFN2001 [pRp5]	This work
Cosmids		
pSM 991.25	pSUP205 with 18.5 kb from p42d cloned in <i>EcoRI</i> site; Tc ^R Cm ^S	Cevallos et al. (1989)
pRp6	pSM991.25 with <i>nodJ::MudIIPR13</i> , Tc ^R Cm ^R Km ^R	Vázquez et al. (1993)
pRp9	pSM991.25 with <i>nodI::MudIIPR13</i> , Tc ^R Cm ^R Km ^R	Vázquez et al. (1993)
pRp5	pSM 991.25 with a <i>MudIIPR13</i> insertion downstream the stop codon of <i>nodJ</i> , Tc ^R Cm ^R Km ^R	Cevallos et al. (1989)

^a Cm, chloramphenicol; Km, kanamycin; Rif, rifampicin; Sm, streptomycin; Tc, tetracycline; ^R, resistant; ^S, sensitive; ::, phage Mu insertion.

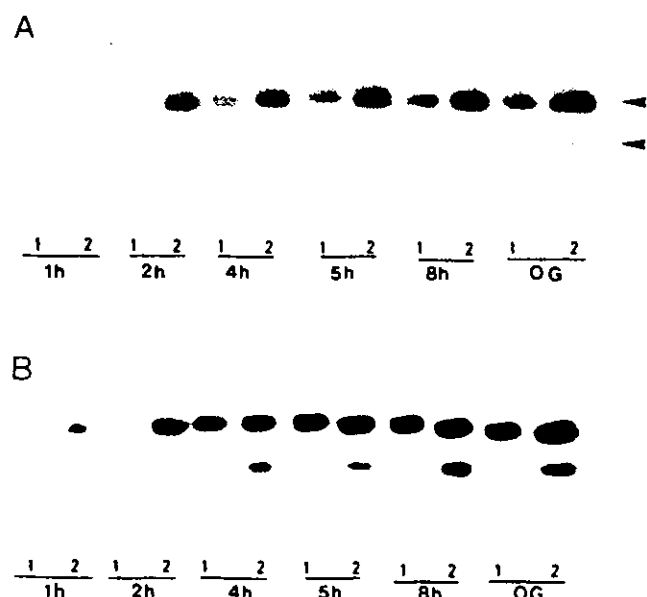


Fig. 2. Kinetic analysis by TLC of secreted ¹⁴C-radiolabeled LCO by *nodI* and *nodJ* mutants. (A) UBP409 and (B) UBP406 at different time points. CFN2001 [pSM991.25] wt control, was included as control in each case. Samples were grown in the presence of naringenin. Lanes labeled 1, extract from strains UBP409 (A) or UBP406 (B); lanes 2, extract from CFN2001 [pSM991.25] at the indicated times. OG, overgrown cultures. Arrowheads indicate the fast-migrating (top arrow) and the slow-migrating band (bottom arrow). Methods as described in legend to Fig. 1.

(c) Kinetics of nodulation in UBP409 and UBP406 mutant strains

The nodulation ability of UBP406 and UBP409 on *P. vulgaris* roots was compared to that of wt CE3 and CFN2001 [pSM991.25], at different time points. The mutant strains showed a 1 to 3 day delay in nodulation and a 47% reduction in the maximum number of nodules formed on bean roots after 25 days, as compared to strain CFN2001 [pSM991.25] (Fig. 4). No significant difference between UBP406 and UBP409 was found.

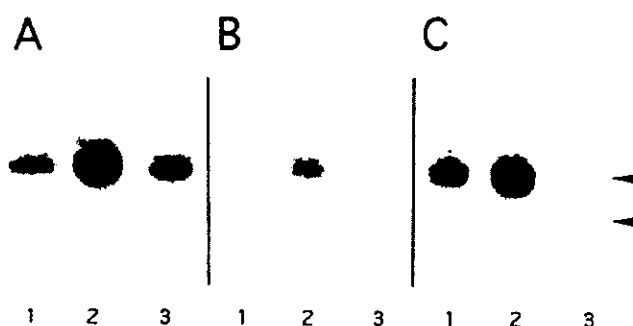


Fig. 3. TLC kinetic analysis of ¹⁴C-labeled LCO extracted from cell pellets of *Re* strains. (A) UBP409 (*nodI* insertion). (B) CFN2001-[pSM991.25]. (C) UBP406 (*nodJ* insertion). Lanes: 1, extracts obtained at 2 h; 2, at 4 h; 3, at 8 h, respectively. Arrowheads are as in Fig. 2. Methods: Cells were grown and labeled as described in legend to Fig. 1. LCO from cell pellets were resuspended in 50 mM glucose/10 mM EDTA/25 mM Tris-Cl pH 8.0 and incubated 5 min at room temperature. The suspension was treated with 0.5% SDS/0.15 M NaOH, mixed and incubated 5 min at room temperature. Na-acetate pH 8.0, was added to the lysate to a final concentration of 1.25 M and incubated at 4° C for 30 min. After centrifugation (8000 × g for 10 min) at 4° C, half volume of water-saturated *n*-butanol was added to the supernatant, mixed and the butanolic phase recovered. The butanol was removed by evaporation from each sample and processed as in legend to Fig. 1.

It has been reported that mutations in *nodIJ* genes of *Azorhizobium caulinodans*, *Rl* bv. *viciae* and *Rl* bv. *trifolii* resulted in a delay of the INI response (for increased *nod* gene induction) (Van Brussel et al., 1986), poor nodulation or no nodulation (Djordjevic et al., 1985), and reduced stem and root nodulation (Geelen et al., 1993) in the appropriate host. These data suggest that a decrease in production or secretion of bacterial compounds may cause such phenotype. A delayed nodulation phenotype was found when plants were inoculated with UBP406 and UBP409 strains, being in agreement with our hypothesis on the role of NodIJ in the LCO secretion (Fig. 2).

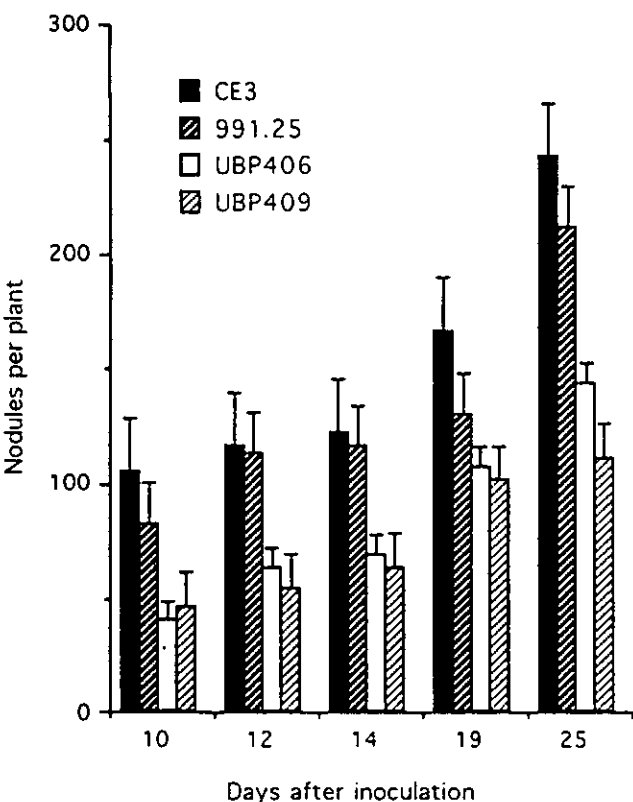


Fig. 4. Nodulation kinetics of *Re* CE3, CFN2001[pSM991.25], UBP409 and UBP406 on *P. vulgaris* plants. **Methods:** Surface-sterilized seeds of *P. vulgaris* L. cv. Negro Jamapa, were grown in 250 ml Erlenmeyer flasks with 200 ml of a nitrogen-free nutrient medium supplemented with 0.8% agar. Three or four days after germination in the dark, plantlets were inoculated with 1 ml of a saturated liquid B⁻ culture media of the appropriate *Rhizobium* strain. The plants were incubated in a growth chamber at 26°C and nodulation was scored. The average number of nodules per plant and the standard deviation at various times are presented. A minimum of ten plants were used for each condition at the indicated time points. The entire experiment was repeated at least three times.

The fact that mutations in *nodI* and *nodJ* do not completely inhibit the LCO secretion into the growth media and/or nodulation in the plant host, may be due to the presence of additional functional transport systems capable of transporting LCO, albeit at reduced levels. The presence of such system, *ndtA*, has been reported in rhizobia. It resembles *kpsT* and may be involved in the export of β -1,2-glucan (Stanfield et al., 1988). In *R. meliloti* the *molFGHI* genes have been identified and it has been recently proposed that NolGHI are cytoplasmic membrane transport proteins that function together with NolF to allow transport of substrate(s) across both inner and outer membranes (Saier et al., 1994). It is possible that both NolFGHI and NodIJ function in the export of LCO and that the presence of two transporters for the same signaling molecule would account for the fact that *nodI*⁻ and *nodJ*⁻ mutants are not completely defective

in nodulation but exhibit a delayed phenotype in nodule formation.

It will be interesting to find whether this hypothesis is correct and which additional transport systems are involved in the secretion of LCO in rhizobia.

(d) Conclusions

(1) *Re* secretes LCO as early as 1 h after *nod* genes induction. To our knowledge this is the first report showing in rhizobia that LCO are detected at this early time and suggests that these signal molecules are important in the early events of signal exchanges.

(2) There is a dramatic decrease in the secretion of the fast-migrating LCO and incapability to secrete the slow-migrating LCO in the *nodI* and *nodJ* mutants, during the first 4 h after *nod* genes induction.

(3) After a 4 h induction, secretion of LCO in UBP409 (*nodI*⁻) and UBP406 (*nodJ*⁻) mutants was detected, but at levels lower than in corresponding wt strains. Therefore, it is proposed that other transport systems could be involved in transporting the fast-migrating LCO, perhaps with the reduced affinity.

(4) The observation of a delayed nodulation phenotype and the reduction in the maximum number of nodules formed in *P. vulgaris* by the *nodI* or *nodJ* mutants suggests that *nodIJ* genes play an important role in the early stages of the symbiosis.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Drs. R. Vera, M. Villanueva, and F. Sánchez for critical reading of the manuscript. This research was supported by grants IN206794, from the DGAPA, U.N.A.M., and 3431-N from the CONACyT, México.

REFERENCES

- Cevallos, M.A., Vázquez, M., Dávalos, A., Espin, G., Sepúlveda, J. and Quinto, C.: Characterization of *Rhizobium phaseoli* Sym plasmid regions involved in nodule morphogenesis and host-range specificity. *Mol. Microbiol.* 3 (1989) 879-889.
- Cárdenas, L., Domínguez, J., Quinto, C., López-Lara, I., Lugtenberg, B.J.J., Spaink, H.P., Rademaker, G.J., Haverkamp, J. and Thomas-Oates, J.E.: Isolation, chemical structure and biological activity of the lipo-oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium etli*. *Plant Mol. Biol.* 29 (1995) 453-464.
- Dénarié J. and Cullimore, J.: Lipo-oligosaccharide nodulation factors: a new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Cell* 4 (1993) 951-954.
- Djordjevic, M.A., Schofield, P.R. and Rolfe, B.G.: Tn5 mutagenesis of *R. trifolii* host-specific nodulation genes result in mutants with altered host-range ability. *Mol. Gen. Genet.* 200 (1985) 463-471.
- Evans, I.J. and Downie, J.A.: The *nodI* product of *Rhizobium leguminos-*

- sarum* is closely related to ATP-binding bacterial transport proteins; nucleotide sequence analysis of the *nodI* and *nodJ* genes. *Gene* 43 (1986) 95–101.
- Geelen, D., Mergaert, P., Geremia, R.A., Goormahtig, S., Van Montagu, M. and Holsters, M.: Identification of *nodS* and *nodU* genes in Nod locus 1 of *Azorhizobium caulinodans*: evidence that *nodS* encodes a methyltransferase involved in Nod factor modification. *Mol. Microbiol.* 9 (1993) 145–154.
- Geremia, R.A., Mergaert, P., Geelen, D., Van Montagu, M. and Holsters, M.: The NodC protein of *Azorhizobium caulinodans* is an *N*-acetylglucosaminyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 2669–2673.
- Göttfert, M., Hitz, S. and Hennecke, H.: Identification of *nodS* and *nodU*, two inducible genes inserted between the *Bradyrhizobium japonicum* *nodYABC* and *nodIJ* genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3 (1990) 308–316.
- John, M., Röhrig, H., Schmidt, J., Wieneke, U. and Schell, J.: *Rhizobium* NodB protein involved in nodulation signal synthesis is a chitooligosaccharide deacetylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 625–629.
- McKay, I.A. and Djordjevic, M.A.: Production and excretion of Nod metabolites by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* are disrupted by the same environmental factors that reduce nodulation in the field. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (1993) 3385–3392.
- Noel, K.D., Sánchez, A., Fernández, L., Leemans, J. and Cevallos, M.A.: *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5. *J. Bacteriol.* 158 (1984) 148–155.
- Palacios, R., Quinto, C., De la Vega, H., Flores, M., Fernández, L., Hernández, M., Ballado, T. and Soberón, G.: General organization of nitrogen fixation genes in *Rhizobium phaseoli*. In: Pühler, A. (Ed.), *Molecular Genetics of Bacteria-Plant Interactions*. Springer Verlag, Berlin, 1983, pp. 164–168.
- Poupot, R., Martínez-Romero, E., Gautier, N. and Promé, J.C.: Wild type *Rhizobium etli*, a bean symbiont, produces acetyl-fucosylated, *N*-methylated, and carbamoylated nodulation factors. *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 6050–6055.
- Saier Jr., M.H., Tam, R., Reizer, A. and Reizer, J.: Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol. Microbiol.* 11 (1994) 841–847.
- Schlaman H.R.M., Okker, R.J.H. and Lugtenberg, B.J.J.: Sub-cellular localization of the *Rhizobium leguminosarum* *nodI* gene product. *J. Bacteriol.* 172 (1990) 5486–5489.
- Spaink, H.P., Okker, R.J.H., Wijffelman, C.A., Pees, E., Lugtenberg, B.J.J.: Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. *Plant Mol. Biol.* 9 (1987) 29–37.
- Spaink, H.P., Sheeley, D.M., Van Brussel, A.A.N., Glushka, J., York, W.S., Tak, T., Geiger, O., Kennedy, E.P., Reinhold, V.N. and Lugtenberg, B.J.J.: A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature* 354 (1991) 125–130.
- Spaink, H., Aarts, A., Stacey, G., Bloembergen, G., Lugtenberg, B.J. and Kennedy, E.P.: Detection and separation of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* nod metabolites using thin-layer chromatography. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5 (1992) 72–80.
- Stanfield, S.W., Ielpi, L., O'Brochta, D., Helinski, D.R. and Ditta, G.S.: The *nodA* gene product of *Rhizobium meliloti* is required for β -(1-2) glucan production and has homology to the ATP-binding export protein HylB. *J. Bacteriol.* 170 (1988) 3523–3530.
- Van Brussel, A.A.N., Recourt, K., Pees, E., Spaink, H.P., Tak, T., Wijffelman, C.A., Kijne, J.W. and Lugtenberg, B.J.J.: A biovar specific signal of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* induces increased nodulation gene-inducing activity in root exudate of *Vicia sativa* subsp. *nigra*. *J. Bacteriol.* 172 (1986) 5394–5401.
- Vázquez, M., Dávalos, A., de las Peñas, A., Sánchez, F. and Quinto, C.: Novel organization of the common nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* strains. *J. Bacteriol.* 173 (1991) 1250–1258.
- Vázquez, M., Santana, O. and Quinto, C.: The NodI and NodJ proteins from *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* strains are similar to capsular polysaccharide secretion proteins from Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* 8 (1993) 369–377.

ANEXO II
Factores Nod modificados

Figura 6, panel C, D y E (página 35)

En la página 35, figura C, muestro una cromatografía en capa fina en la que se uso glucosamina marcada con C¹⁴ como precursor radiactivo. En esta figura se observa que cuando se introduce el plásmido que lleva el *nodD* de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* en el fondo de la GRH, CE3 y CIAT899, existe un aumento en la producción de los FNs. Esto es congruente si consideramos que NodD es el activador transcripcional de los genes *nod* y por lo tanto al introducir una copia adicional aumenta los niveles de expresión de los genes *nod*. Sin embargo, cuando se introduce el *nodD* junto con *nodL* (2107) el resultado es un cambio en la movilidad de los FNs. La función de *nodL* es la de acetilar los FNs, esto nos hace proponer que la acetilación de los FNs produce un retraso en la movilidad. Para entender un poco más a fondo el cambio de movilidad, se realizó el mismo experimento usando S-adenosil metionina como precursor radiactivo para determinar si existen cambios en la metilación de los FNs. En el panel D se observa el experimento en las cepas silvestres (GRH2, CE3 Y CIAT899), los resultados nos demuestran que las tres especies son capaces de metilar a los FNs. Sin embargo, como se muestra en el panel E, cuando se introduce el plásmido 2107 podemos observar que tanto en la CE3 como en la CIAT899, la presencia del *nodD* y *nodL* inhiben la metilación de los FNs. Estos resultados nos permiten apoyar la idea de que los cambios en la movilidad de los FNs cuando se introduce a la cepa el plásmido 2107 se deben a la acetilación y la ausencia de metilación. Esto probablemente es el resultado de que tanto la CE3 como CIAT899 son incapaces de reconocer un factor Nod acetilado como sustrato para metilarse. En el caso de la cepa GRH2 es probable que aún son capaces de reconocer estos metabolitos Nod acetilados.

Los FNs acetilados y no metilados nos abren la posibilidad de poder obtener más variantes de los FNs. Estos FNs no metilados y acetilados podrán usarse para medir su actividad biológica y ver como los cambios en las sustituciones químicas repercuten sobre la especificidad de los FNs. Estas nuevas herramientas junto con nuevos genes *nod* aislados y mutados como el gen *nodZ* (responsables de la fucosilación) constituyen una buena oportunidad para el estudio y la caracterización de los FNs de *R. etli*.