



03081
9
2y.

Universidad Nacional Autónoma de México

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL
Y DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS
Y HUMANIDADES

LA INDUCCIÓN DE NODULINAS Y LA DIFEREN-
CIACION CELULAR POR LA INFECCION DE
RHIZOBIUM EN FRIJOL

T E S I S
Que para obtener el Grado de
DOCTOR EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA
p r e s e n t a
JAIME ENRIQUE PADILLA ACERO

Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno
Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética
y Biotecnología

CUERNAVACA, MOR.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1991

**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 está 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.

I N D I C E

I.	PRESENTACION.....	2
	1. Resumen/ Summary.....	3/4
II.	INTRODUCCION.....	5
	1. Sinopsis histórica.....	5
	2. La organogénesis del nódulo como un modelo de investigación en vegetales (ensayo).....	7
	3. Control of Nodulin Genes in Root-Nodule Development and Metabolism (revisión).....	10
III.	PROYECTO DE TESIS.....	32
	1. Antecedentes y Objetivos.....	32
	2. Resultados.....	33
	2.1. Datos preliminares y consideraciones metodológicas.....	33
	2.2. Nodulin Regulation in Common Bean Nodules Induced by Bacterial Mutants (artículo).....	37
IV.	DISCUSION GENERAL.....	45
	1. Procesos y factores de la nodulación.....	45
	2. Mutaciones y fenotipos simbióticos.....	45
	3. Fenotipos y expresión de nodulinas.....	49
	4. Expresión y mecanismos regulatorios.....	50
	5. Niveles y componentes de control.....	54
V.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	56
VI.	APENDICES.....	58
	1. Notas y referencias adicionales.....	58
	2. Abreviaturas.....	65
	3. Glosario.....	66
VII.	AGRADECIMIENTOS.....	67

P R E S E N T A C I O N

La tesis doctoral que se presenta enseguida, incluye un trabajo de revisión bibliográfica y de investigación experimental sobre el desarrollo y la expresión genética en nódulos de leguminosas.

En la introducción se incluyen conceptos que enmarcan los motivos y contenidos del tema de tesis. Se presenta además una revisión actualizada sobre: a) la morfogénesis y la expresión genética de la planta que son inducidas por Rhizobium y b) sobre diversos mecanismos de la regulación de nodulinas que operan durante la formación y el funcionamiento de los nódulos.

En la segunda parte se presentan y discuten los resultados del análisis de la expresión de cuatro nodulinas en nódulos de frijol formados por cepas bacterianas con alteraciones en los genes que participan en la simbiosis. Se incluyen finalmente, algunos datos e ideas complementarios, así como las conclusiones y perspectivas sobre la identificación de distintos niveles y condiciones involucrados en la regulación de la expresión de nodulinas.

El contenido principal de esta tesis ha sido publicado; la parte documental como una revisión en coautoría con Federico Sánchez, Héctor Pérez y Miguel Lara (Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42:507-528, 1991), y la parte experimental como artículo en coautoría con Juan Miranda y Federico Sánchez (Mol. Plant-Microbe Interact. Vol. 4, No. 5. 1991, en prensa).

Este trabajo fué realizado bajo la asesoría del Dr. Federico Sánchez, durante el transcurso en el que nuestra área académica pertenecía al Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno (CIFN), como Departamento de Biología Molecular de Plantas; luego como Unidad de Biología Molecular y Biotecnología Vegetal. Finalmente (al escribir esta tesis), como un nuevo departamento dentro del Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología (CIIGB). Los agradecimientos a las muchas personas que participaron en la realización de este proyecto, se encuentran al final de este escrito.

Padilla Acero, Jaime E. (1991). La inducción de nodulinas y la diferenciación celular por la infección de Rhizobium en frijol. Tesis de Doctorado en IBB. UACPyP del CCH-UNAM

RESUMEN

Las plantas leguminosas tales como alfalfa, frijol y soya forman una asociación simbiótica compleja con bacterias del suelo (Rhizobium y géneros afines). Esta asociación resulta en la fijación de nitrógeno atmosférico en amonio, una forma de nitrógeno combinado fácilmente asimilable por la planta. Este proceso se lleva a cabo en el nódulo, un órgano radicular especializado inducido por el microsimbionte a través de una interacción específica con el sistema radicular. El desarrollo del nódulo involucra la expresión específica de varios genes y la diferenciación coordinada de ambos simbioses. Las proteínas vegetales inducidas o reguladas de manera específica en el nódulo (nodulinas), se dividen en dos clases dependiendo de su cinética de expresión. Las llamadas tempranas son expresadas durante los eventos iniciales de la simbiosis (infección de los pelos radiculares y organogénesis del nódulo), mientras que las tardías aparecen alrededor del inicio y durante la fijación de nitrógeno; estas últimas están involucradas, en gran parte, con el intercambio metabólico entre la planta y la bacteria.

El conocimiento de las condiciones necesarias y los niveles de regulación asociados con estos procesos no es aún muy completo y ha sido abordado, entre otros enfoques, considerando un intercambio de señales moleculares entre la bacteria y la planta. El estudio de la expresión genética y la diferenciación que ocurren durante el desarrollo del nódulo, ha sido una estrategia común para describir algunos factores y mecanismos involucrados en el control de esta interacción. Con este propósito, se obtuvieron cepas de Rhizobium y un transcojugante de Agrobacterium que producen alteraciones en la nodulación en frijol, tales como nódulos no-infectados (vacíos), inefectivos (sin fijación de nitrógeno); o bien, que producen una detención o retrasos del desarrollo. Se analizó la expresión en nódulos inducidos por las mutantes bacterianas. Se compararon los patrones de expresión genética a través de la evaluación de los niveles relativos de ARNm de cuatro genes de nodulinas de frijol (ENOD2, uricasa-II, leghemoglobina y nodulina-30) en nódulos de distintas edades y/o formados por distintas cepas. La correlación de los patrones de expresión y los estados de diferenciación de estos nódulos, permitió identificar condiciones y discriminar niveles en la regulación de estos genes. Por ejemplo: (1) la expresión de una nodulina tardía (uricasa-II) en nódulos vacíos, sugiere condiciones regulatorias previas a la infección intracelular de bacterias; (2) diferencias relativas en la expresión de ENOD2 en nódulos vacíos e infectados que indican que la diferenciación del tejido central puede ser un segundo factor (además de la regulación por desarrollo), involucrado en la expresión de este gen; y (3) acumulación de transcritos de ENOD2 y uricasa asociada a nodulación retrasada que implican un desfase

en la diferenciación de los tipos celulares al interior del nódulo. La tesis incluye: (a) una introducción sobre los contenidos y motivos del tema de tesis; (b) una revisión del estado del arte en el campo (Sánchez et al. 1991. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42:507-528); una sección de resultados que contiene consideraciones metodológicas y una publicación (Padilla, et al. 1991. Molec. Plant-Microbe Interact. 4(5) [en prensa]) y (f) la discusión general, notas y bibliografía complementarias.

Padilla, Jaime E. (1991). **Nodulin induction and cellular differentiation in common bean nodules by Rhizobium infection.** Ph. D. Thesis (Fundamental Biomedical Research). National University of México.

SUMMARY

A complex symbiotic association of legume plants, such as beans, alfalfa and soybean, with soil bacteria (Rhizobium and related genera) is established in natural and cultivated landfields. This association results in the formation of root nodules, specialized organs capable to fix atmospheric nitrogen into ammonia, which can be readily incorporated in plant biomass. Nodule development involves the specific expression of plant and bacterial genes along with a coordinated differentiation of both symbionts. Plant proteins induced or regulated specifically in nodules (nodulins), belong to two classes depending on the time course of their expression. Early nodulins are expressed during the initial stages of symbiosis (infection of root hairs and nodule organogenesis), while the late ones appear about the onset and during nitrogen fixation; they participate mainly in the metabolic exchange between the plant and the bacteria. Conditions involved in controlling these processes are not fully understood, and has been studied, among other approaches, regarding a continuous molecular signaling between the symbionts. Hence, the correlation of events such as nodulin gene expression and nodule differentiation, define the strategy used here to describe those factors and mechanisms involved in the regulation of this interaction. In this work, the expression of four nodulin genes (ENOD2, uricase-II, leghemoglobin and nodulin-30) is analyzed in nodules elicited by bacterial mutants which block development at different stages of development. The correlation of expression patterns (mRNA levels) in either empty, arrested-, slowly developed or ineffective nodules lead us to identify several conditions and discriminate distinct levels involved in the regulation of these nodulins. Experimental results and a state-of-the-art review of the field of this thesis are included (Padilla, et al. 1991. Molec. Plant-Microbe Interact. 4(5) [in press], and Sánchez et al. 1991. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42:507-528, respectively)

RESUMEN

Las plantas leguminosas tales como alfalfa, frijol y soya forman una asociación simbiótica compleja con bacterias del suelo (Rhizobium y géneros relacionados). Esta asociación resulta en la fijación de nitrógeno atmosférico en amonio, que es fácilmente asimilable por la planta. Este proceso se lleva a cabo en el nódulo, un órgano radicular especializado inducido por el microsimbionte a través de una interacción específica con el sistema radicular. El desarrollo del nódulo involucra la expresión específica de varios genes y la diferenciación coordinada de ambos simbios. Las proteínas vegetales inducidas o reguladas de manera específica en el nódulo (nodulinas), se dividen en dos clases dependiendo de su cinética de expresión. Las llamadas tempranas son expresadas durante los eventos iniciales de la simbiosis (infección de los pelos radiculares y organogénesis del nódulo), mientras que las tardías aparecen alrededor del inicio y durante la fijación de nitrógeno; estas últimas están involucradas, en gran parte, con el intercambio metabólico entre la planta y la bacteria.

Las condiciones necesarias y los niveles de regulación asociados con estos procesos no se conocen en profundidad y han sido estudiados, entre otros enfoques, considerando un intercambio de señales moleculares entre la bacteria y la planta. El estudio de la expresión genética y la diferenciación que ocurren durante el desarrollo del nódulo, objeto de esta tesis, es una estrategia para describir sistemáticamente los factores y mecanismos involucrados en la regulación de esta interacción. Con este propósito, se obtuvieron cepas bacterianas con mutaciones que producen alteraciones en la nodulación en frijol, tales como nódulos no-infectados (vacíos), inefectivos (sin fijación de nitrógeno); o bien, que producen una detención o retrasos del desarrollo. Se evaluaron los niveles relativos de expresión de cuatro nodulinas de frijol (transcritos de ENOD2, uricase-II, leghemoglobina y nodulina-30) en los nódulos con fenotipos simbióticos anómalos. La comparación de los patrones de expresión y los estados de diferenciación en estos tipos de nódulos permitió identificar condiciones importantes y discriminar niveles en la regulación de estos genes.

La tesis incluye: (a) una introducción sobre los contenidos y motivos del tema de tesis; (b) una revisión del estado del arte en el campo (Sánchez *et al.* 1991. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42:507-528); una sección de resultados que contiene consideraciones metodológicas y una publicación (Padilla, *et al.* 1991. Molec. Plant-Microbe Interact. 4(5) [en prensa]) y (f) la discusión general, notas y bibliografía complementarias.

SUMMARY

A complex symbiotic association of legume plants, such as beans, alfalfa and soybean, with soil bacteria (Rhizobium and related genera) is established in natural and cultivated landfields. This association results in the formation of root nodules, specialized organs capable to fix atmospheric nitrogen into ammonia, which can be readily incorporated in plant biomass. Nodules are induced by a specific interaction of the procaryote with defined zones of the root system, and its development involves the specific expression of plant and bacterial genes along with a coordinated differentiation of both symbionts. Plant proteins induced or regulated specifically in nodules (nodulins), belong to two classes depending on the time course of their expression. Early nodulins are expressed during the initial stages of symbiosis (infection of root hairs and nodule organogenesis), while the late ones appear about the onset and during nitrogen fixation; they participate mainly in the metabolic exchange between the plant and the bacteria. Conditions involved in the regulation of these processes are not fully understood, and have been studied regarding a continuous molecular signaling between the symbionts. Hence, the correlation of events such as nodulin gene expression and nodule differentiation, define the present approach to describe those factors and mechanisms involved in the regulation of this interaction.

In this work, the expression of four nodulin genes (ENOD2, uricase-II, leghemoglobin and nodulin-30) is analyzed in nodules elicited by bacterial mutants which block development at different stages. The comparison of expression patterns (mRNA levels) in either empty, arrested-, slowly developed or ineffective nodules lead us to identify several conditions and discriminate distinct levels involved in the regulation of these nodulins.

Experimental results and a state-of-the-art review of the field of this thesis are included (Padilla, et al. 1991. *Molec. Plant-Microbe Interact.* 4(5) [in press], and Sánchez et al. 1991. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42:507-528, respectively)

II. INTRODUCCION

1. SINOPSIS HISTORICA

Hace poco más de cien años, el proceso de fijación biológica de nitrógeno en nódulos de leguminosas se enfocó experimentalmente y se abrió un campo de investigación muy amplio dentro de la microbiología y la nutrición vegetal. La utilidad agronómica se hizo patente y por aproximaciones más o menos empíricas, nació después la industria de inoculantes. Sin embargo, desde finales del siglo pasado, existió un interés en los aspectos fundamentales del proceso que contribuyó a establecer, entre otros conceptos, la naturaleza simbiótica del nódulo, la identidad bacteriana del endosimbionte, la fisiología básica de este órgano y la diversidad genética de los simbiosomas. El advenimiento de herramientas metodológicas más poderosas en años recientes, brindó la posibilidad de esclarecer con más precisión, la base bioquímica y genética de tales conceptos. Enseguida se reseñan brevemente algunos antecedentes y alcances de los postulados más generales en este campo.

1. La fijación es consecuencia de la simbiosis: Aunque la ocurrencia de nódulos está documentada desde el siglo XVI, a principios del siglo pasado se debatía si los nódulos eran agallas formadas por insectos (por similitud estructural), que se produjesen por micopatógenos (confusión de hifas e hilos infectivos) o bien que representaran estructuras radiculares modificadas (raíces deformadas, órganos de almacenamiento o de absorción especial). Poco tiempo después se describieron 'pequeños corpúsculos móviles' en el interior del nódulo; estos microorganismos se aislaron y denominaron Bacillus radicicola. Con el trabajo clásico de Hellrigel y Wilfarth se demostró la fijación por bacterias en el nódulo, inducido a su vez, como respuesta de la planta a la interacción (simbiótica) [Burris 1938]. Sólo organismos procariotes son capaces de reducir N_2 en vida libre o en simbiosis [Posgate, 1981], y con el auge del enfoque evolutivo sobre el origen de células eucariotas (teoría endosimbiótica) se han hecho estudios sistemáticos de diversas asociaciones simbióticas. Estas interacciones —hereditarias o cíclicas— se consideran como fenómenos metasexuales, dado que las capacidades que solo se manifiestan en la condición simbiótica, han promovido la aparición de poblaciones de organismos un tanto distintos a sus componentes o equivalentes parentales [Margulis 1976]. En este sentido, la planta nodulada se concibe como un complejo multicelular tetragenómico, y la forma endosimbiótica de rhizobia como un simbiosoma o diazoplasto.

2. Bacterias aisladas de nódulos o del suelo son capaces de

inducir nódulos en leguminosas: estos microorganismos son infectivos cuando se inoculan a la planta en un soporte estéril y en ausencia de fuente nitrogenada. La baja efectividad de algunos inoculantes dió pie para encontrar algunas reglas de compatibilidad entre planta y los rhizobia; este análisis desembocó en el reconocimiento de grupos de inoculación cruzada y la clasificación bacteriana. Las controversias en torno a este aspecto prosiguen debido al gran número de criterios involucrados en la definición de la especificidad, la competencia y de las relaciones filogenéticas de este grupo. [Martínez y cols. 1990.]

3. La asimilación de nitrógeno comienza con la formación de bacteroides: Desde 1890 se hicieron descripciones detalladas del proceso de infección, que sugería estadios tipo patogénico antes del inicio de la fijación. Al disponer de medios para medir la actividad diazotrófica (reducción de acetileno, trazamiento isotópico con ^{15}N) se generalizaron otros estudios sobre la fisiología y la influencia de condiciones ambientales, tanto en sistemas fijadores de vida libre como en simbióticos [Posgate 1981; Dilworth y Glenn 1984].

4. La FSN posee una componente genética importante: Al considerar la diversidad de parejas simbióticas y las variaciones en la respuesta a distintos tratamientos, se ha analizado, cada vez con mayor profundidad, la heredabilidad de caracteres relativos al manejo del nitrógeno derivado de la fijación [Burris 1988]. Por otro lado, el estudio de proteínas (y sus correspondientes genes) relacionadas con la simbiosis, ha sido un enfoque alternativo para conocer características propias de la planta que la hacen capaz de establecer esta simbiosis [Sánchez y cols. 1991].

Referencias

- Burris, R.H., 1988. 100 years of discoveries in biological nitrogen fixation, en: Nitrogen Fixation: Hundreds Years After. eds. H. Bothe, F.J. de Bruijn, W.E. Newton. pp.21-30. Stuttgart: Gustav Fischer.
- Dilworth M., Glenn A., 1984. How does a legume nodule work?. Trends Biochem. Sci. 9:519-23.
- Margulis, L., 1976. Genetic and evolutionary consequences of symbiosis. Exp. Parasitol. 39:277-349.
- Martínez, E., D. Romero, R. Palacios. The Rhizobium genome. Crit. Rev. Plant Sci. 9:59-93, 1990.
- Posgate, J., 1981. Fijación de nitrógeno. Barcelona:Omega. 83 pp.
- Sánchez F., J.E. Padilla, H. Pérez, M. Lara. 1991. Control of nodulin genes in root-nodule development and metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42:507-528.

2. LA ORGANOGENESIS DE NODULO COMO MODELO DE INVESTIGACION EN VEGETALES

Un modelo del desarrollo en plantas

El desarrollo en los vegetales vasculares depende esencialmente del crecimiento meristemático. Toda estructura organizada (epidermis, hojas, botones florales, floema), se forma a partir de diversos tipos de meristemas localizados. En el proceso de división del meristemo y la generación de estos tejidos, intervienen una serie de señales endógenas y ambientales que regulan el patrón de crecimiento (plano de división, expansión), de expresión genética y de especialización fisiológica. Durante el desarrollo vegetativo, un nódulo no se origina de un meristemo preexistente, y por lo mismo, su inducción y desarrollo presenta características interesantes como modelo de estudio. En los modelos simbióticos más estudiados, la ontogenia del nódulo abarca un tiempo corto (aprox. 3 semanas); es un proceso inducible y localizado, es decir, bajo condiciones experimentales, la inoculación de raíces con rhizobia promueve la generación controlada de estas estructuras en una región determinada de la raíz. Durante la nodulación, se pueden analizar varios procesos básicos del desarrollo vegetal (gradientes morfogénicos, transducción de señales, xilogénesis, etc.), y además la influencia de factores exógenos (gases, fuente nitrogenada, compuestos sintéticos). El nódulo tiene asimismo la particularidad de ser un órgano no esencial (salvo en limitación severa de nitrógeno), lo que ha permitido el aislamiento de líneas o mutantes no letales en el desarrollo de la planta, pero que tienen alguna incapacidad de establecer la simbiosis. En este sentido, se ha avanzado en el mapeo de varios loci involucrados con este proceso.

Un modelo de interacción ecológica.

Las interacciones entre plantas y microorganismos del suelo involucran mecanismos de reconocimiento que dependen del contacto celular y del intercambio de señales moleculares. Estas señales son necesarias para el acercamiento, el inicio, y más adelante, para el mantenimiento y control de la interacción^{1*}. Los sistemas simbióticos fijadores de nitrógeno exhiben estructuras con distinta complejidad, tales como cavidades foliares en las asociaciones de cianobacterias con hepáticas y helechos; vesículas en la rizocenosis de actinomicetos con varios géneros de plantas vasculares y, en el caso que nos ocupa, diversos tipos de nódulos radiculares y caulinares de rhizobia y leguminosas. Por otro lado, la existencia de una matriz común de elementos genéticos y respuestas a nivel fisiológico y de desarrollo, revela una similitud o equivalencia entre algunos procesos de la interacción patogénica (virulencia/defensa) y la simbiótica (cooperación/integración) y, desde hace algunos años se ha incrementado el interés por entender muchos mecanismos y factores

* Las notas pueden consultarse en la sección VI.1. (p.58) ←

que las regulan². Aunque aún no se tiene un panorama claro de la homología o analogía de tales mecanismos, se considera a esta simbiosis como un modelo de 'enfermedad controlada' en plantas, de tal manera que el estudio de los genes, las señales moleculares y los mecanismos de transducción involucrados, puede ayudar a entender y manipular a otros organismos fitopatógenos. Asimismo, este conocimiento brinda la posibilidad de extender la nodulación y fijación simbiótica a otras plantas.³

Un modelo de regulación genética y metabólica

La expresión génica en plantas es regulada en concordancia con un estilo 'meristemático y totipotencial' de desarrollo. Esta expresión puede ser inducible, específica de tejido o ambas; puede responder a estímulos ambientales como luz, calor, estrés hídrico o aeróbico, ciclos circadianos, herida o señales de patógenos y simbiontes. Asimismo, puede estar sujeta a una regulación asociada al desarrollo. En consecuencia, la activación transcripcional de muchos genes es mediada por varios mecanismos a distintos niveles. En la actualidad, ha habido un enorme avance en la identificación de los elementos genéticos que controlan el patrón de expresión temporal o espacial de los genes, y la interacción de varias disciplinas y técnicas ha potenciado el estudio de la regulación y el desarrollo en plantas. Como muestra de ello, se han publicado un gran número de reportes en la última década, los cuales abordan el modelo de nodulación en los siguientes rubros:

1. Biología molecular de genes de nodulinas: Identificación de proteínas inducidas o especies de ARN específicos. Clonación de genes y caracterización estructural de proteínas específicos. Asignación de funciones por comparaciones estructurales y/o correlaciones funcionales⁴.
2. Análisis fisiológico del nódulo. Mecanismos de regulación de la actividad metabólica vinculada al manejo de nitrógeno, carbono y oxígeno. Caracterización de enzimas y compartimentos particulares⁵.
3. Genética molecular de la comunicación planta-bacteria: Caracterización de mutantes bacterianas. Análisis de fenotipos ex planta y simbióticos. Caracterización química de señales bacterianas⁶.
4. Análisis inmunocitológico del desarrollo: Descripción histológica y caracterización de componentes estructurales del órgano simbiótico. Localización intercelular del sitio de síntesis de transcritos y proteínas específicos⁷.
5. Análisis citoquímico de expresión de genes recombinantes en plantas transformadas: caracterización física y funcional de regiones de control; de condiciones y/o factores que promueven la activación de genes de nodulinas, (de desarrollo, ambientales o por señales moleculares putativas⁸.
6. Análisis genético y mapeo por PLFR: caracterización y localización física de alelos silvestres o mutantes que condicionan la capacidad o respuesta simbiótica⁹.

El sistema frijol-Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli

La interacción de Rhizobium con una leguminosa depende de la compatibilidad entre la bacteria y la planta, ya que existen elementos que le confieren especificidad. Son varios los tipos de rhizobia capaces de nodular frijol; dada su diversidad en cuanto a características genéticas y bioquímicas, algunos de ellos han sido asignados recientemente una nueva especie¹⁰. El tipo común, denominado R. leguminosarum bv. phaseoli (biotipo I, cepa tipo CFN42) presenta un espectro limitado de hospedero, reiteraciones de los genes estructurales de nitrogenasa y también un arreglo peculiar de, al menos, los genes nod comunes¹¹. En esta cepa se ha descrito que varios genes, tanto en cromosoma y plásmidos, participan de manera decisiva en procesos de la nodulación y la fijación de nitrógeno¹². Para describir particularidades del sistema en estudio, es importante remarcar que los nódulos de frijol son ovales de tipo determinado, es decir, su desarrollo se basa en la presencia de un meristemo interno y transitorio. El crecimiento posterior deriva de la expansión (radial) de las células del primordio¹³ que a diferencia de nódulos indeterminados, muestra una secuencia temporal de estados de diferenciación celular. Toda vez que se interrumpa el desarrollo por bloqueos debidos a diversas mutaciones bacterianas, será posible correlacionar el patrón de expresión y la diferenciación resultante.

Dentro del contexto general de investigación de la simbiosis Rhizobium-leguminosa, el sistema de frijol aún no ha avanzado al nivel de otros; no obstante, ofrece ventajas que radican en la multitud de tipos de rhizobia capaces de inducir nódulos y también en la diversidad genética del género Phaseolus en nuestro país. Esto representa, al menos, la posibilidad de tener un marco amplio de comparación para disectar los sistemas genéticos de ambos simbiosis, en la búsqueda de genes que confieran ventajas ecológicas y agronómicas a la simbiosis. Para avanzar en este sentido se pretende seguir trabajando en diversos aspectos del modelo, tales como: (a) la naturaleza y efecto de señales bacterianas (específicas) en la organogénesis y la expresión de nodulinas; (b) la inducción y regulación de genes de frijol; (c) la función y localización de algunas nodulinas (e.g. Npv-30, PvENod17); (d) el papel de condiciones ambientales y de otras mutantes bacterianas en la fisiología de nódulos y (e) la participación del citoesqueleto y otros mecanismos de transducción de señales en el establecimiento de la simbiosis¹⁴.

Enseguida, se incluye una revisión que abunda en los aspectos más recientes (1990), de la regulación genética y metabólica de nodulinas en leguminosas.

CONTROL OF NODULIN GENES IN ROOT-NODULE DEVELOPMENT AND METABOLISM

Federico Sánchez, Jaime E. Padilla, Héctor Pérez, and Miguel Lara

Unidad de Biología Molecular y Biotecnología Vegetal, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México

KEY WORDS: Regulation of plant genes during legume-*Rhizobium* symbiosis

CONTENTS

INTRODUCTION	508
MOLECULAR SIGNALING AND RECOGNITION	508
<i>Plant Symbiotic Signaling</i>	508
<i>Rhizobial Signals</i>	508
<i>Rhizobium Elicitors, Calcium, and Plant Cytoskeleton</i>	510
INFECTION AND NODULE ORGANOGENESIS	511
<i>Infection and Root Hair (RH) Proteins</i>	511
<i>Nodulins Involved in Nodule Organogenesis</i>	512
<i>Early Nodulin Genes Induced in Nodule Infection</i>	513
EXPRESSION AND REGULATION OF LATE NODULINS	514
<i>Enzymes of Ammonia Assimilation</i>	514
<i>Enzymes of Carbon Metabolism</i>	515
<i>Synthesis of Nitrogen Transporters in Nodules</i>	516
<i>Peribacteroid Membrane (PBM) Nodulins</i>	516
<i>Enhanced Nodule Proteins</i>	517
NODULIN HOMOLOGIES AND GENE FAMILIES	518
<i>Structural Nodulins</i>	518
<i>Nodulin Gene Families in Determinate Nodules</i>	518
<i>Function and Evolution of Plant Hemoglobins</i>	519
REGULATORY ELEMENTS FOR NODULIN EXPRESSION	519
PLANT GENETICS AND NODULIN GENES	520
<i>Legume Mutants in the Nodulation Process</i>	520
CONCLUDING REMARKS	521

507

1040-2519/91/0601-0507\$02.00

INTRODUCTION

In the *Rhizobium*-legume interaction, an exchange of molecular signals regulates the expression of genes essential for infection, nodule development, and function (10, 79, 82, 84, 102, 108, 158; see Figure 1). Legume nodule formation has been divided into three major stages: "preinfection," "infection and nodule formation," and "nodule function" (Figure 1; 114, 148). Nodulins are plant proteins that accumulate specifically in nodules. Early nodulin genes are detected during the "infection and nodule formation" stage. The expression of late nodulin genes starts at about the onset of nitrogen fixation (96). Recently, "true" nodulins have been found to be expressed in parts of the plant distinct from the nodule (2, 12, 113). Nevertheless, the concept of nodulins still provides a framework, for following the *Rhizobium*-legume interaction. Indeed, the study of nodulins has helped to define the various stages of the nodulation process (114). Many nodulins have been isolated (30), and we have begun to understand their role in symbiosis. Several reviews on nodulins and nodulin genes have appeared in recent years (50, 53, 96, 142, 147). The present chapter is an overview of relevant data concerning (a) plant morphogenesis and nodulin gene expression elicited by *Rhizobium* symbiotic signals and (b) diverse mechanisms for nodulin regulation during nitrogen fixation.

MOLECULAR SIGNALING AND RECOGNITION

Plant Symbiotic Signaling

Plant-bacteria interactions begin with distant chemical signaling in the rhizosphere (35, 57, 84, 102). Substances interchanged at this stage modulate the early responses and set conditions for the initiation of symbiosis (102, 108, 109, 158). In legumes, pterocarpanes and isoflavonoids can function as phytoalexins, as signal molecules (for a review see 102, 108), and probably as endogenous regulators of polar auxin transport (63). In exudates and extracts from legume roots, flavones, isoflavones, and flavanones were identified as the inducing molecules for rhizobial chemotaxis and for the expression of (*Brady*) *Rhizobium* nodulation (*nod*) genes (36, 82, 102; Figure 1, *top*). That these substances are active at very low concentrations (10^{-7} - 10^{-8} M) and stimulate bacterial *nod* gene expression within minutes of exposure suits them to the situation in the rhizosphere. The inducer substances are exuded specifically between the meristem and the zone of emerging root hairs, the area most responsive to nodulation in soybean (10, 17, 36).

Rhizobial Signals

Bacterial signals are necessary for eliciting early plant responses and normal nodule development. The initial stages of the interaction between rhizobia and their leguminous host plants include deformation and curling of plant root

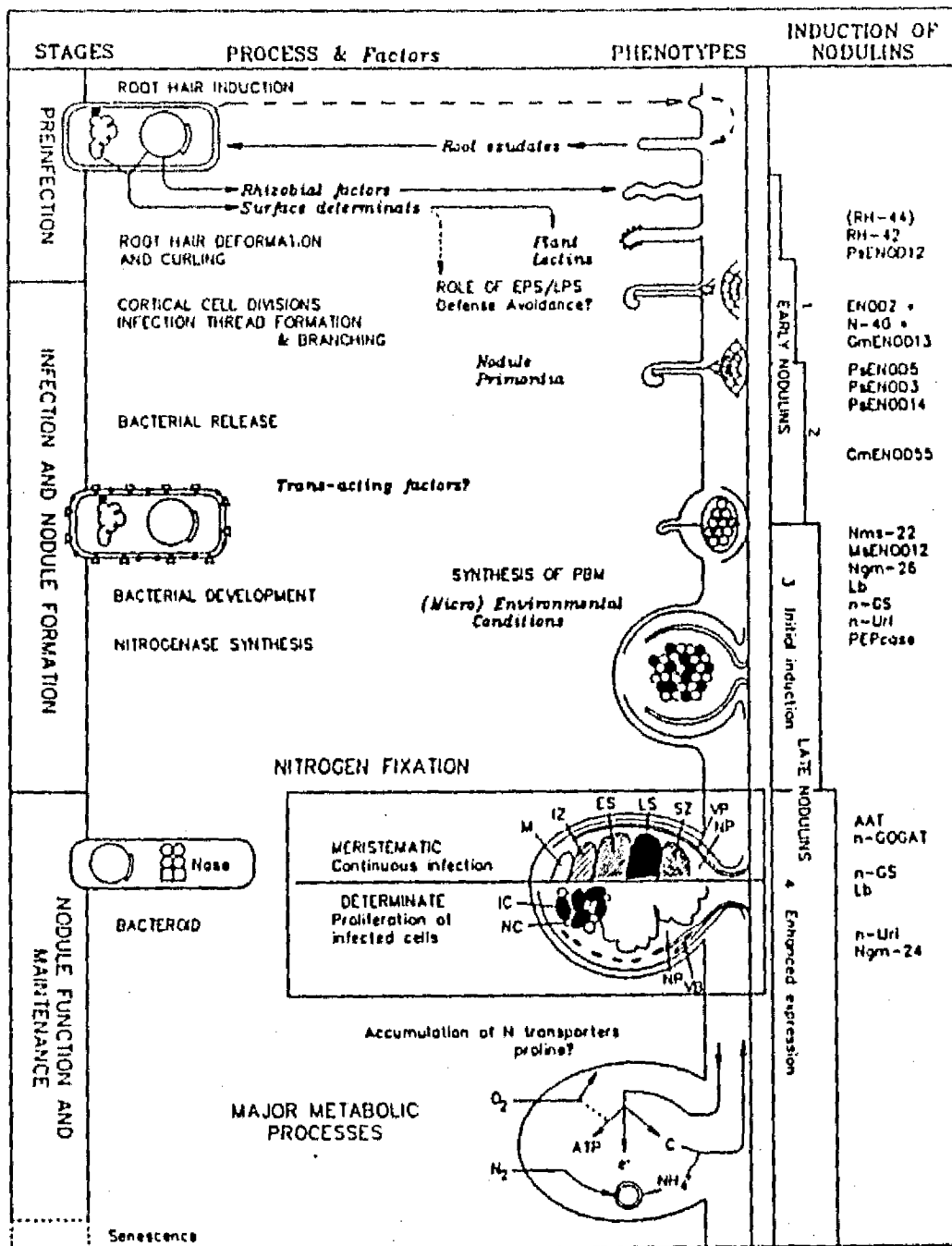


Figure 1 Schematic representation of developmental and metabolic events associated to nodulin expression. Distinct stages, processes, and factors (*left and center*) are shown in relation to nodule developmental phenotypes. The figure also depicts the sequence of expression of nodulins and nodule-enhanced activities (*right*) in an arbitrary time scale. At least four steps in nodulin induction are indicated (1-4), with representative examples of several species (* = ubiquitous nodulin type). Nodule types are represented in the middle (MERISTEMATIC: M = meristem; IZ = infection, ES = early symbiotic, LS = late symbiotic and SZ = senescing zones; VP = vascular bundle; NP = nodule parenchyma. DETERMINATE: IC = infected and NC = uninfected cell; VB = vascular bundle; NP = nodule parenchyma/inner cortex.) Major metabolic processes (*bottom*) are described as linked pathways of carbon, nitrogen, and oxygen metabolism, in which several nodulins participate.

hairs (10, 138), the initiation of cell division in the root cortex, and induction of a root-nodule meristem (38). Specific bacterial genes participate in these processes and fall into four general groups: *nodD*, common nodulation or *nodABC* genes, host range (*hsn*) genes, and genes involved in polysaccharide production. Recent reviews describe the structure, organization, and regulation of the symbiotic genes of *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Azorhizobium* (81, 86).

(*Brady*)*Rhizobium* produces heat-stable low-molecular-weight factors that cause three changes in the plant (a) root hair deformation and branching (Had), (b) thick and short roots (Tsr), and (c) root hair induction (Hai) (61, 148, 158). The *nodABC* genes are involved in producing small heat-stable compounds that cause root hair deformation that could be homologous to these factors. Histochemical data on *R. meliloti nod genes-uidA* (GUS activity) fusions assayed in alfalfa indicate that *nodABC* genes are expressed in different stages of nodule development (124). Furthermore, the NodA and NodB proteins produce compounds that stimulate mitosis in plant protoplasts (117). In addition, these genes transformed into tobacco produced abnormal growth patterns (116).

Signals that result in morphogenetic responses in the specific legume-host have been identified (61, 79). One of them, NodRm-1, was purified following a root hair deformation (Had) phenotype bioassay, positive in alfalfa (homologous host) and negative in vetch (heterologous host). The chemical nature of this factor has been determined. NodRm-1 is a sulfated beta-1,4-tetrasaccharide of D-glucosamine (M_r 1,102) in which three amino groups were acetylated and one was acylated with a C_{16} bis-unsaturated fatty acid. This factor is active at nanomolar concentrations (79). The fact that NodRm-1 is a tetrasaccharide is relevant because oligosaccharines act as plant morphogens (134); plant and microbial cell wall degradation fragments (oligosaccharides) are active in the nanomolar range as elicitors of phytoalexin production (35); and finally, saccharide-binding proteins are implicated in *Rhizobium* root attachment and host-specific recognition (27, 32, 57). A suggestion that plant elements may be modified by *Rhizobium* signals is considered in the next section.

Rhizobium Elicitors, Calcium, and Plant Cytoskeleton

Rhizobium produces soluble factors that may trigger both deformation and tip growing branches in root hairs of leguminous (61, 79, 117) and some nonleguminous plants (24). Also, the presence of spontaneous (136) as well as chemically induced nodules (60) suggests that the bacterium modulates fundamental capacities already present in plants. Recent reports suggest that *Rhizobium* could mediate redirection of apical growth in root hairs (70); a computer model predicts that hair curling would be produced by dominance of

Rhizobium-induced growth over normal tip growth (138). Pollen tubes, fungal hyphae, and root hairs grow by apical extension (119). In fungal hyphae, Ca^{2+} -calmodulin gradients play an important role in normal tip growth (33, 149), and modifications of calcium levels are related to abnormal tip-branching patterns in some fungi (33). Root hairs also show increased calcium and calmodulin concentrations (105) in the growing tip at the beginning of apical extension (58). Ca^{2+} -calmodulin levels are key regulators of growth and morphogenesis in animals and plants (85, 88). Alone or combined they modulate cytoplasmic streaming (71) and cytoskeleton organization (126). The cytoskeleton is an essential organelle of the plant cytoplasm and has a key role in cell division (80, 118), cytoplasmic streaming, and normal tip growth and elongation (68, 157). Root hairs infected by *Rhizobium* show increased or redistributed calcium levels, especially around the area of origin of the infection thread (123), and many dictyosomes and microtubules are observed near the forming thread (137). The inoculated root hairs also show many cytoplasmic strands and significantly increased cytoplasmic streaming (155). Thus cytoskeleton modifications might explain many of the morphological effects found in early stages of plant-*Rhizobium* interaction (like Hac and Had). The appealing possibility that Nod signals could trigger calcium-level modulations, which would in turn significantly alter plant cytoskeletal organization, deserves further evaluation.

INFECTION AND NODULE ORGANOGENESIS

Early nodulin genes are expressed during infection and nodule morphogenesis (50; Figure 1). Plant glycoproteins such as lectins (27, 70), although present in the preinfection stage, cannot be considered nodulins because they are not specifically expressed in the nodule.

Infection and Root Hair (RH) Proteins

The biochemical and genetic particularities of root hairs are studied because bacterial infections tend to start in these cells (10, 125). During the invasion process, through the action of localized changes in root-hair wall synthesis, a new cell wall develops around the penetration site, ahead of the invading bacteria (10, 70). Five to ten specific RH-proteins were identified as in vitro translation products (IVTP) by comparing whole-root and root hair RNA preparations (49, 107). By means of a fluorescent labeling method, a group of RH-specific proteins was detected in the outer surface of soybean root hair cells (107). In pea, two RH-proteins (RH-42 and RH-44) and a nodulin transcript were characterized. RH-42 is an acidic polypeptide detected 20 hr after inoculation with *Rhizobium* containing (at least) functional *nodABC* genes. By contrast levels of RH-44, already present in these cells, showed a

marked increase. RH-44 seems to be related to deformation of root hairs elicited by soluble rhizobial factors, and RH-42 may be associated with root hair curling produced by bacterial inoculation (49), but the functions of these proteins have not been established. The other pea gene induced upon *Rhizobium* inoculation was identified by hybridizing root hair mRNA against the PsENOD12 cDNA clone. This gene is also expressed in young nodules of pea, but only if they contain infection threads (113; see Figure 1 and the section on early nodulin genes induced in nodule infection).

Nodulins Involved in Nodule Organogenesis

From data derived from empty nodules (lacking rhizobia) it is inferred that some early nodulin genes are active only in association with nodule organogenesis. Two-dimensional polyacrylamide gel analysis (2D-PAGE) of IVTP from nodule mRNA of pea (53), soybean (51), vetch (93), and alfalfa (34, 98) showed two to five early nodulins in each case. A correlation has been found between nodule meristem induction and the presence of the early soybean nodulins Ngm-38, Ngm-41, and probably Ngm-44 (51). The first early nodulin gene to be characterized was isolated from soybean. This gene, called *ENOD2* encodes for a protein with a putative N-terminal signal peptide followed by a sequence containing repeating proline-rich pentapeptide motifs (46); it is expressed in the inner cortex (nodule parenchyma) of determined and meristematic nodules (140, 141). Homologous *ENOD2* genes or transcripts have been reported in such other legume species as pea (141), alfalfa (34), vetch (93), *Sesbania* (128), common bean (111), and lupine (77). This finding suggests that this protein has a conserved role in legume nodules. In soybean, alfalfa, and common bean this early nodulin is expressed in empty nodules that contain neither infection threads nor intracellular bacteria (34, 46, 101). Such nodules are elicited on legume roots by different *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* mutants affected in surface polysaccharides (81), and by *Agrobacterium* strains carrying *nod* genes (52). This gene is also expressed in spontaneous nodules (136) and in "pseudonodules" induced by inhibitors of polar auxin transport such as 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA) or N-(1-naphthyl)-phthalamic acid (NPA) (60). Expression of the *ENOD2* gene in these empty nodules indicates a role in nodule morphogenesis rather than a function in the infection process. Evidence that the nodule parenchyma of soybean nodules is a physical barrier limiting oxygen diffusion to central nodule tissue (25) and the putative cell wall location of *ENOD2* led to the proposal that this protein might help to create particular properties of the cortical cell layer (141). Other nodulins associated with nodule organogenesis are soybean *GmENOD13* (47) and a group of related products: Nps-40' from pea (52, 53), Nvs-40 from vetch (53, 93), and Nms-30 from alfalfa (34, 39).

Early Nodulin Genes Induced in Nodule Infection

Early nodulins have been characterized in soybean and pea (47, 113, 114). Pea nodules (meristematic type; see Figure 1) contain cells at different stages of development: the youngest cells adjacent to the apical meristem and the oldest cells at the basal root attachment point. This organization makes it possible to compare the expression patterns of nodulin genes in different cell types during nodule development. By using in situ hybridization, Scheres et al (114) localized *PsENOD12*, *PsENOD5*, *PsENOD3*, and *PsENOD14* transcripts in sections of nodules from plants of different ages. Leghemoglobin (Lb) transcript detection was used as a marker for the expression of late nodulin genes, and the *nifH* gene as a marker for expression of bacterial nitrogenase genes. *PsENOD12* mRNA is present adjacent to the meristem in the invasion zone. *PsENOD5* transcript reaches a maximum in the early symbiotic zone, where the first plant cells that contain bacteria are present. *PsENOD3* and *PsENOD14* messengers reach their maximum concentration in the youngest layers of the late symbiotic zone. In older cells of this zone when *PsENOD3* and *PsENOD14* mRNA are decreasing, Lb transcript is at its maximum and the nitrogenase mRNA can first be detected in the bacteroid. In conclusion *PsENOD5*, *PsENOD3*, and *PsENOD14* mRNAs are only present in the cells containing rhizobia, while *PsENOD12* mRNA is present in all the cells of the invasion zone. Particularly *PsENOD3* and *PsENOD14* mRNA concentrations mark the stage at which the infected cell is fully differentiated into a functional nodule cell.

Two *PsENOD12* transcripts, encoded by different genes (14), have been detected both during nodule infection and in stems and flowers (113). During the infection process they are observed in the root hairs, the nodule invasion zone, and in the root cortex. In addition, analysis of the deduced protein sequence suggests that this nodulin is a cell wall component. These observations have led to the proposal that *PsENOD12* may have a role both in the "preparation" of the cells for infection thread growth and in thread formation itself.

Although the amino acid sequence of the *PsENOD12* protein resembles those of other hydroxyproline-rich glycoproteins that accumulate in plant tissue after wounding or with pathogenic interactions, *PsENOD12* mRNA is not accumulated in fungus-inoculated plants (113). Both common and host-specific *nod* genes of *Rhizobium* are essential for eliciting *PsENOD12* mRNA expression in root hairs of peas, either inoculated or treated with a supernatant of a flavonoid-induced *R. leguminosarium* bv. *viciae* culture (113). Furthermore, addition of the purified NodRm-2-factor (79) to roots produces root hair deformation, cortical cell division, and *PsENOD12* and *PsENOD5* message accumulation (14). An exciting open question is whether the bacterial

factors produce these effects directly or are mediated by a second signal(s) elicited in the plant.

EXPRESSION AND REGULATION OF LATE NODULINS

Late nodulins comprise the best-known nodule-specific proteins, which are induced shortly before nitrogen fixation (96, 147). They include enzymes involved in nitrogen assimilation, in carbon metabolism, and in amide and ureide biogenesis (40, 120, 144). Proteins present in the peribacteroid membrane (PBM) (45, 147) and the leghemoglobins (Lbs) (discussed below) (3, 154) also belong to this group. Several enzymes involved in these metabolic processes have been identified as nodulins; others are common to several plants organs but show enhanced activity in nodules.

Enzymes of Ammonia Assimilation

Levels of plant glutamine synthetase (GS) and glutamate synthase (GOGAT) activity increase along with nitrogenase activity during nodule formation. Both enzymes are responsible for assimilating the ammonia derived from the N_2 reduction in the bacteroid (6, 92).

GLUTAMINE SYNTHETASE In legume plants, multiple isoenzymic GS forms result from the presence of different polypeptides. This GS subunit heterogeneity is associated with the expression of a multigene family (39, 42, 59, 133). Different GS polypeptides have been characterized (56, 74, 121, 133). In root nodules two types can be distinguished: those that are expressed as nodule-specific proteins (GS-n) and those whose expression is significantly increased in symbiosis (42). In both cases, GS genes are specifically expressed or enhanced before nitrogenase is active (39, 59, 100, 121). Results derived from *Lotus corniculatus* plants transformed with a common bean GS-n gene (*gln-γ*) fused to a *uidA* reporter gene showed that the β -glucuronidase activity is detected after nodule emergence and only in infected cells (43). Previously, it had been demonstrated that nodule-specific GS genes are expressed in Fix^- nodules containing intracellular bacteria (100, 121). However, in nodules where cells were not infected or were unable to maintain peribacteroid membrane (PBM), GS expression was not detected (39, 122). In addition, experiments with nodules from plants growing in an atmosphere where N_2 ($N_2:O_2$) was substituted by argon ($Ar:O_2$) showed lower activity and an early decline in the expression of GS (22). In conclusion, the internalization of *Rhizobium* might generate developmental and/or metabolic conditions for the specific or enhanced expression of plant GS.

On the other hand, further increase in GS levels coincides with the onset of nitrogenase activity. In soybean, ammonia provided externally to roots in-

duces the expression of GS (59). Furthermore, a soybean GS promoter fused to *uidA* was also activated by ammonia in transformed *L. corniculatus* roots (G. H. Miao et al, submitted for publication). In contrast in common bean, ammonia externally added failed to induce GS genes in roots and nodules (23). Recent studies showed that in nodulated root systems of common bean grown in an AR:O₂ atmosphere, the activity of the nodule GS- γ isoenzyme was reduced (85%) along with that of nitrogenase, although the GS- β isoenzyme was unaffected (22). In common bean plants, grown in an enriched CO₂ atmosphere (1000 ppm), nitrogenase activity increased two- to three-fold; a significant reduction of the GS- γ , but not of the GS- β polypeptide, was also observed (99). Taking these results together, it seems that both high and low nitrogenase activities can be correlated with a reduction of GS- γ . These data suggest that the carbon/nitrogen balance within the nodule, and not ammonia availability per se, may be the main modulating factor of GS expression.

GLUTAMATE SYNTHASE (GOGAT) In legume nodules, as in other plant tissues, two types of GOGAT have been purified and characterized. One of these enzymes is ferredoxin dependent (Fd-GOGAT), whereas the other utilizes NADH as reductant (1, 21, 130). Root nodules of common bean express two *NADH-GOGAT* isoenzymes, in contrast with alfalfa nodules where only one *NADH-GOGAT* is found. The alfalfa enzyme and the *NADH-GOGAT II* of common bean are not detected in roots or leaves from either legume (1, 21). These two enzymes are initially expressed independently of nitrogenase induction. However, in nonfixing nodules of alfalfa the activity of *NADH-GOGAT* is less than 15% of the activity in effective nodules. This result shows that symbiotically fixed nitrogen is essential for the maximal induction of nodule GOGAT activity (21, 40).

Enzymes of Carbon Metabolism

Carbon flux to the nodule is necessary to sustain nodule and bacterial respiration, to enable synthesis of ATP and reductants for nitrogenase activity, and to provide a carbon skeleton source for nitrogen assimilation and transport (6, 144). Two enzymes involved in these processes are discussed here.

PHOSPHOENOLPYRUVATE (PEP) CARBOXYLASE Nodule PEP carboxylase has been purified from soybean, lupine, and alfalfa (103, 145). Analysis of PEP carboxylase isozymes by native-PAGE identified one activity band in roots and two bands in nodules of alfalfa, pea, and soybean. In common bean, two bands were observed in roots and three in nodules. Thus the additional PEP carboxylase bands observed could be regarded as nodule-specific components (31). Alfalfa ineffective nodules express only 4% of the nodule PEP carboxylase activity found in effective nodules (40).

SUCROSE SYNTHASE (SS) SS has been purified and characterized from soybean nodules (94). A nodule-specific cDNA clone encoding the SS subunit has been isolated. Partial DNA sequence analysis showed 73% homology at the amino acid level with one of the maize sucrose synthase genes (*Sh*) (132). Incubation of purified SS from soybean nodules with free heme promotes an inactivation of the enzyme through dissociation into monomers, suggesting that the availability of free heme may regulate the activity of SS and the flow of carbon to nodule and bacteroid metabolism (132).

Synthesis of Nitrogen Transporters in Nodules

Nodulated legumes transport preferentially either amides or ureides to the shoot (6). Various plant enzymes that participate in the synthetic pathways of these compounds have been described (120). Only two examples are considered here.

ASPARTATE AMINOTRANSFERASE (AAT) In legumes, AAT has been characterized from nodules of various plants (55, 106). Multiple nodule AAT isoenzymes located in different cell compartments have been described. One of these isoenzymes is regarded as nodule specific in alfalfa (55) and nodule enhanced in lupine (106). A considerable increase in AAT activity and polypeptide concentration occurred early (7–10 days) in both effective and ineffective alfalfa nodules (40). However, this activity declines earlier in Fix⁻ nodules (55).

URICASE A nodule-specific uricase (uricase II) has been identified and characterized from soybean and common bean nodules (97, 110). Immunogold-labeling analysis in soybean nodules showed that the uricase II enzyme is localized in peroxisomes of uninfected cells of the central tissue (97). Initial expression of uricase II transcript in soybean and common bean nodules is not dependent on active nitrogen fixation (75, 110). Incubation of soybean callus tissue and root cultures at varying oxygen levels demonstrated that low oxygen concentration (4–5%) induces uricase II activity and synthesis (75). Recently, it was found that uricase-II mRNA is expressed (about 10%) in empty nodules and accumulated in delayed nodulation in common bean (101). This result, together with data on Ngm-26 of soybean (95; see the section on PBM nodulins), suggests that there are distinct types of late nodulin genes, regulated by particular developmental and environmental conditions.

Peribacteroid Membrane (PBM) Nodulins

PBMs enclose the endosymbiont in the host cells of legume nodules. After endocytosis, the PBMs increase concomitantly with bacterial multiplication

and differentiation, creating the interface between the two organisms and playing a major role in the control of metabolite exchange (26). In addition, it has been suggested that the PBM has a decisive role in preventing the phytoalexin production response by the host cell (139, 153). PBMs are derived originally from the plasmalemma, but their chemical composition suggests that the ER and the dictyosome also contribute to PBM biogenesis (16, 91, 146).

Nodulins associated with the PBM have been characterized in soybean (45). At least three nodulins (Ngm-24, Ngm-26, and Ngm-23) have been convincingly located in association with this membrane. Ngm-24 appears to be located in the inner surface of the PBM facing the peribacteroidal space; this orientation makes unlikely its function as a transmembrane transport protein (69). Analysis of the structure of Ngm-26 indicates that it is an integral protein facing both the cytoplasmic and peribacteroidal compartments, probably functioning in the exchange of metabolites between the plant and *Rhizobium* (44). Homology of Ngm-26 with other intrinsic membrane proteins (e.g. glycerol facilitator from *E. coli* and tonoplast intrinsic protein (TIP) from protein bodies of seeds) supports such a role in exchange (8, 66). This nodulin was recently shown to be phosphorylated by a Ca^{2+} -dependent protein kinase (150). We note with interest that Ca^{2+} -dependent protein kinase activities have been found in PBMs (73, 153). A third nodulin, Ngm-23, has also been assigned to the PBM. The function of this protein is not known, though its genetic regulation has interesting features, mentioned below (87; see the section on regulatory elements for nodulin expression).

PBM nodulin genes are differentially expressed, as evidenced by *Bradyrhizobium* mutants that uncouple peribacteroid membrane formation and PBM nodulin gene expression (90). In particular, *B. japonicum* mutant T8-1, defective in the endocytosis process, induces nodules almost completely devoid of intracellular bacteria where the PBM is not formed. In these nodules, the gene encoding Ngm-24 was expressed at very low levels; the gene encoding Ngm-26, on the other hand, was expressed at wild-type levels (44, 95).

Using monoclonal antibodies, Brewin et al (16, 146) have analyzed the molecular composition of bacteroid and PBM of pea. They have identified glycoproteins and glycolipids present in the infection-thread matrix, on the luminal surface of the PBM, in the ER, and in dictyosomes.

Enhanced Nodule Proteins

Nodule-stimulated proteins were also reported in a number of legume species. Not considered "true" nodulins, they include polypeptides of a wide range of M_r , whose expression is prominently or transiently augmented in nodules of pea (53), soybean (51, 72, 78), common bean (18), alfalfa (39, 83), cowpea

(135), and *Sesbania* (29). Although these proteins have not been characterized, the possibility that they play a role in the nodulation process deserves further attention.

NODULIN HOMOLOGIES AND GENE FAMILIES

Structural Nodulins

That many early nodulin genes encode cell wall structural proteins is inferred from the comparison of their derived amino acid sequence with the primary structure of several cell wall (hydroxy)proline-rich glycoproteins (HGRPs) (7, 20, 47, 141). In soybean and pea, *ENOD2* amino acid sequences contain alternated repeats of Pro-Pro-His-Glu-Lys and Pro-Pro-Glu-Tyr-Gln (46, 47, 141). This structure suggests that the amino acid composition of these pentapeptides could be the main requirement for the function of the *ENOD2* protein (N-75). Proteins of this type differ from the extensins, which are formed by (Hyp)₄-Ser pentapeptide repeats (20). The early nodulin *ENOD2* is a developmental gene marker, which permits us to distinguish nodule-like structures from tumors or secondary roots (60, 136). Other early nodulin gene products that may be involved in nodule morphogenesis are *GmENOD13* from soybean (47) and *Nms-30* (34) from alfalfa. *GmENOD13* is homologous to *ENOD2* at the C-terminal part. Other early nodulins described in pea are *PsENOD5*, *PsENOD3*, and *PsENOD14* (114). The amino acid composition of *PsENOD5* resembles that of the arabinogalactan proteins (AGPs) (114). The central tissue and the cortex of soybean nodules contain high levels of AGP (19). *PsENOD3* and *PsENOD14* are 60% homologous and encode for ≈6-kD products. The arrangement of the four cysteines found in these nodulins suggests that they can bind a metal ion (114). This feature is common to other gene families (see below), though there is no significant homology between them (114). The presence of a putative signal peptide at the N-terminus of these proteins is in agreement with the idea that all have an extracellular location.

Nodulin Gene Families in Determinate Nodules

In soybean a well-characterized late nodulin gene family has been reported whose function is not understood (62, 112, 122). It consists of six or seven members with extensive stretches of sequence similarity within the coding and flanking regions. Examples of these genes include *GmN-20*, *GmN-22*, (112), *GmN-23* (87), *GmN-26b*, *GmN-27* (62), and *GmN-44* (or *E27*) (122). This nodulin gene family shows some interesting features: (a) Along with the *Lbs*, these are the most abundantly transcribed genes in soybean nodules; (b) the gene products have two domains that are arranged in paired Cys-X₇-Cys

motifs, resembling zinc-finger sequences (13, 112); (c) all products also exhibit a conserved region that encodes for a putative signal peptide. In spite of their similarities, these proteins are associated with different cellular compartments.

In common bean, abundant nodule-specific transcripts that encode for a group of 30-kD products (Npv-30) have been reported (18). Sequence analysis of two cDNAs and a genomic clone revealed high homology with the former nodulin gene family from soybean (F. Campos, in preparation). The Npv-30 protein also contains two motifs resembling zinc fingers and a putative signal peptide contained in the N-terminal domain. The above data indicate that these nodulin families might have a common function, most likely as metal ion carriers in infected cells (112). In soybean, this ion transport would flow from the cytoplasm (Ngm-27 contribution) to the PBM (Ngm-23) and into the peribacteroidal space (Ngm-44) (112).

Immunological approaches to nodulin classification have identified closer relationships between legumes with similar nodule morphology and physiology (determinate vs meristematic type; see Figure 1) than between species related by conventional taxonomical criteria (127).

Function and Evolution of Plant Hemoglobins

Leghemoglobins (Lbs), the most abundant nodulins, function as oxygen carriers, facilitating O₂ diffusion to bacteroids (3, 154). Lbs are products of a multigene family whose expression is strongly activated prior to nitrogen fixation. In soybean, four Lbs are induced at slightly different points during nodule formation, suggesting a developmental control of these genes (65). Different Lb products seem to be associated with distinct oxygen affinities that may be required for nodule function (3, 28). Nonlegumes also contain hemoglobin-like proteins in their symbiotic structures (4), and hemoglobin could function as an oxygen-sensing mechanism in growing root tips (2). Finally, the widespread existence of hemoglobin genes in organisms of all kingdoms has led to the proposal of a common evolutionary origin of these genes (5).

REGULATORY ELEMENTS FOR NODULIN EXPRESSION

Regulated plant genes are activated by either developmental or environmental stimuli (11). Nodulin genes appear to be induced directly or indirectly by plant and bacterial signals in a cell- or organ-specific manner. Study of the regulation of nodulin gene expression requires a close examination of the promoter and 5' upstream flanking sequences. Such study has been enabled by use of *Lotus corniculatus* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*

(104). Recently *Medicago truncatula* has been developed as another species for studying the molecular genetics of symbiosis (9). Experimental strategies have been reviewed by de Bruijn et al (28). Studies of transgenic plants containing chimeric genes have included soybeans *Lbs* (64, 65) and *GmN-23* (67); *Sesbania rostrata* *Lbs* (131) and *SrENOD2* (28); common bean *gln-γ* and *gln-β* (43) and *Parasponia* hemoglobin (15). Sequences present in the 5' upstream region of some late nodulins have been characterized. Some of these regions share consensus motifs and various functional elements conferring enhanced organ-specificity or reduced activation of gene expression (28, 65, 67, 131). Furthermore, in common bean-*gln-γ* (43a) the soybean *GmN-23* and *lbc3* 5' regions, A-T rich DNA elements with the ability to bind *trans*-acting factors have been found. These factors are present in nodule extracts but also in roots (43a, 64) and leaves (64). Biochemical analysis and DNA binding studies of some of these factors indicate functional relationships with regulatory nuclear proteins (human HMG I) (64), suggesting that chromatin structure may be an important controlling mechanism for organ-specific expression. It has also been reported that one of these nodulin genes (*ENOD2* from *S. rostrata*) can be regulated by hormones and environmental conditions (cytokinins, anaerobiosis) (28), and it has been demonstrated that *lb* regulatory sequences are functional between legumes (67) and nonlegumes (15). Recently, a DNA-binding factor of bacterial origin that could regulate nodulin gene expression has been reported (152).

PLANT GENETICS AND NODULIN GENES

Legume Mutants in the Nodulation Process

Classical genetic studies have described a number of loci in legumes that control *Rhizobium* root hair infection, nodule formation, and nitrogen fixation (reviewed in 76, 109, 143). At least 45 mutations in 8 different species conditioning 5 major phenotypes have been identified (143): (a) non-nodulation, (b) ineffective (producing tumor-like nodules), (c) ineffective (producing early senescence), (d) supernodulation/nitrate tolerant nodulation (Nts); additionally, (e) nodulation in the absence of *Rhizobium* (Nar) has been reported (136). In alfalfa, non-nodulating and ineffective plant mutants have been characterized (40, 143). In peas, at least 17 genes affecting nodule formation or encoding nodule-specific proteins have been located on the chromosome linkage map (151). Almost 50% of the nodulation-impaired mutants mapped near the *lb* cluster on chromosome 1 (151). Of particular interest is *sym-13*, which produces a nonfixing nodule and maps near the loci encoding nodule-enhanced GS (151). The *sym-5* locus is a mutational hot-spot, represented by seven independently derived mutant lines with decreased nodulation. The recessive *sym-5* mutants have a temperature-sensitive phe-

notype. An altered polypeptide in *sym-5* mutants may be related to this phenotype (43).

Recently, the presence of symbiosis-specific polypeptides (mycorrhizins) has been reported in the vesicular-arbuscular mycorrhiza-soybean interaction (156). Remarkably, nodulation-impaired pea mutants are also defective in mycorrhizal infection (*Myc*⁻) (37, 151). The fact that the same loci control simultaneously both symbioses in this legume suggests common blockages at early stages of the interactions (48). In soybean, at least eight mutations affecting nodulation and nitrogen fixation have been reported (54, 143). Several supernodulating and nitrate-tolerant (*nts*) soybean mutants have been isolated (54). Non-nodulating mutants (single recessive mutations) have also been reported. These mutations condition nodulation with all *B. japonicum* strains and are root-controlled traits. It has been argued that pseudoinfections may precede and potentiate actual infection sites. Normal nitrogen-fixing nodules were obtained occasionally at high bacterial titers, suggesting that this mutant may have a higher response threshold to a bacterial signal (109). The possibility was explored that flavonoids exuded by the mutant plants were responsible for the non-nodulating phenotype, but no significant differences in *nod* gene inducibility between wild-type and mutant plants were found (129).

One clue to identifying some of the factors producing non-nodulating plants may be found in a recent report on root hair development in *Arabidopsis thaliana*. This work identifies single recessive mutations affecting proper initiation and normal elongation of root hairs; it suggests that some of these genes may be required for the synthesis both of structural elements such as the root hair cytoskeleton and of some calcium regulators. Furthermore, the abnormal root hair phenotypes observed with these mutants are similar to the root hair deformations induced by *Rhizobium* in compatible hosts (115).

CONCLUDING REMARKS

The information accumulated so far indicates that with a few initial signals *Rhizobium* can induce morphological and metabolic events in both leguminous and nonleguminous plants. Indeed the field is moving rapidly, and the chemical nature of some *Rhizobium* signals has been determined. These molecules are involved in plant organogenesis and early nodulin gene expression. The study of the symbiotic process is also uncovering essential and novel aspects of plant development and metabolism. The identification and analysis of additional plant mutations affecting the symbiotic process could provide new and unexpected insights into the plant genes involved in this process. Some of these mutant genes may also participate in other plant-microbe interactions, as exemplified in the mycorrhiza-legume associa-

tion, where Nod^- plant mutants are infected by neither *Rhizobium* nor mycorrhiza. Finally, studies of the metabolic aspects of nodulation have been limited to the description of the main biochemical events involved, but further progress requires that we understand the molecular factors that activate and regulate nodulation. Particularly, an integrative view of the carbon and nitrogen flows in symbiosis is needed.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank our colleagues for providing us with reprints and preprints during the preparation of this manuscript. The research work of this group was partially supported by grant NAS (BNF-MX-87-77), H.P. was supported by Centro de Investigacion sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Publica. We thank particularly Carmen, Dalia, Lourdes, and Micheline for their help and patience.

Literature Cited

1. Anderson, M. P., Vance, C. P., Heichel, G. H., Miller, S. S. 1989. Purification and characterization of NADH-glutamate synthase from alfalfa root nodules. *Plant Physiol.* 90:351-58
2. Appleby, C. A., Bogusz, D., Dennis, E. S., Peacock, W. J. 1988. A role for haemoglobin in all plant roots? *Plant Cell Environ.* 11:359-67
3. Appleby, C. A. 1984. Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35:443-78
4. Appleby, C. A., Bogusz, D., Dennis, E. S., Fleming, A. I., Landsmann, J. 1988. The vertical evolution of plant hemoglobin genes. In *Nitrogen Fixation: Hundred Years After*, ed. H. Bothe, F. J. de Bruijn, W. E. Newton, pp. 623-28. Stuttgart: Gustav Fischer
5. Appleby, C. A., Dennis, E. S., Peacock, W. J. 1990. A primaeval origin for plant and animal haemoglobins? *Aust. J. Syst. Bot.* 3:81-90
6. Atkins, C. A. 1987. Metabolism and translocation of fixed nitrogen in the nodulated legume. *Plant Soil* 100:157-69
7. Averyhart-Fullard, V., Datta, K., Marcus, A. 1988. A hydroxyproline-rich protein in the cell wall. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:1083-85
8. Baker, M. E., Sauer, M. H. 1990. A common ancestor for bovine lens fiber major intrinsic protein, soybean nodulin-26 protein and *E. coli* glycerol facilitator. *Cell* 60:185-86
9. Barker, D. G., Bianchi, S., Blondon, F., Datte, Y., Duc, G., et al. 1990. *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Mol. Biol. Rep.* 8:40-49
10. Bauer, W. D. 1981. Infection of legumes by rhizobia. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 32:407-49
11. Benfey, P. N., Chua, N. H. 1989. Regulated genes in transgenic plants. *Science* 244:174-81
12. Bennett, M. J., Lightfoot, D. A., Cullimore, J. V. 1989. cDNA sequence and differential expression of the gene encoding the glutamine synthetase polypeptide of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Mol. Biol.* 12:553-65
13. Berg, J. M. 1990. Zinc finger domains: hypothesis and current knowledge. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 19:405-21
14. Bisseling, T., Franssen, H., Govers, F., Horvath, B., Moerman, M., et al. 1990. Early nodulin gene expression during the pea-*Rhizobium* symbiosis. In *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, ed. H. Hennecke, D. P. S. Verma, 1:300-3. Dordrecht: Kluwer Academic
15. Bogusz, D., Llewellyn, D. J., Craig, S., Dennis, E. S., Appleby, C. A., et al. 1990. Non-legume hemoglobin genes retain organ-specific expression in heterologous transgenic plants. *Plant Cell* 2:633-41
16. Brewin, N. J., Kannenberg, E. L., Perotto, S., Wood, E. A. 1990. Surface interactions of plant and bacterial mem-

- branes in the *Rhizobium*-legume symbiosis. See Ref. 14, pp. 325-30
17. Calvert, H. E., Pence, M. K., Pierce, M., Malik, N. S. A., Bauer, W. D. 1984. Anatomical analysis of the development and distribution of *Rhizobium* infections in soybean roots. *Can. J. Bot.* 62:2375-84
 18. Campos, F., Padilla, J., Vázquez, M., Ortega, J. L., Enriquez, C., Sánchez, F. 1987. Expression of nodule-specific genes in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Mol. Biol.* 9:521-32
 19. Cassab, G. I. 1986. Arabinogalactan proteins during the development of soybean root nodules. *Planta* 168:441-46
 20. Cassab, G. I., Varner, J. 1988. Cell wall proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39:351-53
 21. Chen, F. L., Cullimore, J. V. 1988. Two isoenzymes of NADH-dependent glutamate synthase in root nodules of *Phaseolus vulgaris* L.: purification, properties and activity changes during nodule development. *Plant Physiol.* 88:1411-17
 22. Chen, F., Bennett, M. J., Cullimore, J. V. 1990. Effect of the nitrogen supply on the activities of isoenzymes of NADH-dependent glutamate synthase and glutamine synthase in root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. *J. Exp. Bot.* 41:1215-22
 23. Cock, J. M., Mould, R. M., Bennett, M. J., Cullimore, J. V. 1990. Expression of glutamine synthetase genes in roots and nodules of *Phaseolus vulgaris* following changes in the ammonium supply and infection with various *Rhizobium* mutants. *Plant Mol. Biol.* 14:549-60
 24. Cocking, E. C. 1990. Nodulation of non-legumes by *Rhizobium*. See Ref. 61, pp. 813-23
 25. Dakora, F. D., Atkins, C. A. 1989. Diffusion of oxygen in relation to structure and function of legume root nodules. *Aust. J. Plant Physiol.* 16:131-40
 26. Day, D. A., Price, D., Udvardi, M. K. 1989. Membrane interface of the *Bradyrhizobium japonicum*-*Glycine max* symbiosis: peribacteroid units from soybean nodules. *Aust. J. Plant Physiol.* 16:69-84
 27. Dazzo, F. B., Truchet, G. L. 1983. Interaction of lectins and their saccharide receptors in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *J. Membr. Biol.* 73:1-16
 28. de Bruijn, F. J., Szabados, L., Schell, J. 1990. Chimeric genes and transgenic plants to study the regulation of genes involved in symbiotic plant-microbe interactions (nodulin genes). *Dev. Genet.* 11:182-96
 29. de Lajudie, P., Huguet, T. 1988. Plant gene expression during effective and ineffective nodule development of the tropical stem-nodulated legume *Sesbania rostrata*. *Plant Mol. Biol.* 10:537-48
 30. Delauney, A. J., Verma, D. P. S. 1988. Cloned nodulin genes for symbiotic nitrogen fixation. *Plant Mol. Biol. Rep.* 6:279-85
 31. Deroche, M.-E., Currayol, E. 1989. Some properties of legume nodule phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol. Biochem.* 27:379-86
 32. Díaz, C. L., Melchers, L. S., Hooykaas, P. J. J., Lugtenberg, B. J. J., Kijne, J. W. 1989. Root lectin as determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Nature* 338:579-81
 33. Dicker, J. W., Turian, G. 1990. Calcium deficiencies and apical hyperbranching in wild-type and the "frost" and "spray" morphological mutants of *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* 136:1413-20
 34. Dickstein, R., Bisseling, T., Reinhold, V. N., Ausubel, F. M. 1988. Expression of nodule-specific genes in alfalfa root nodules blocked at an early stage of nodule development. *Genes Dev.* 2:677-87
 35. Dixon, R. A., Lamb, C. J. 1990. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41:339-67
 36. Djordjevic, M. A., Gabriel, D. W., Rolfe, B. G. 1987. *Rhizobium*—the refined parasite of legumes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 25:145-68
 37. Duc, G., Trouvelot, A., Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S. 1989. First report on non-mycorrhizal plant mutants (Myc) obtained in pea (*Pisum sativum* L.) and fababean (*Vicia faba* L.). *Plant Sci.* 60:215-22
 38. Dudley, M. E., Jacobs, T. W., Long, S. R. 1987. Microscopic studies of cell divisions induced in alfalfa roots by *Rhizobium meliloti*. *Planta* 171:289-301
 39. Dunn, K., Dickstein, R., Feinbaum, R., Burnett, B. K., Peterman, T. K., et al. 1988. Developmental regulation of nodule-specific genes in alfalfa root nodules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1:66-74
 40. Egli, M. A., Griffith, S. M., Miller, S. S., Anderson, M. P., Vance, C. P. 1989. Nitrogen assimilating enzyme activities and enzyme protein during de-

- velopment and senescence at effective and plant gene controlled ineffective alfalfa nodules. *Plant Physiol.* 91:898-904
41. Fearn, J. C., LaRue, T. A. 1990. An altered constitutive peptide in *sym* 5 mutants of *Pisum sativum* L. *Plant Mol. Biol.* 14:207-16
 42. Forde, B. G., Cullimore, J. V. 1989. The molecular biology of glutamine synthetase in higher plants. In *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*, ed. B. J. Mifflin, 6:247-96. Oxford: Clarendon
 43. Forde, B. G., Day, H. M., Turton, J. F., Wen-jun, S., Cullimore, J. V., et al. 1989. Two glutamine synthetase genes from *Phaseolus vulgaris* L. display contrasting developmental and spatial patterns of expression in transgenic *Lotus corniculatus* plants. *Plant Cell.* 1:391-401
 - 43a. Forde, B. G., Freeman, J., Oliver, J. E., Pineda, M. 1990. Nuclear factors interact with conserved A/T-rich elements upstream of a nodule-enhanced glutamine synthetase gene from french bean. *Plant Cell* 2:925-39
 44. Fortin, M. G., Morrison, N. A., Verma, D. P. S. 1987. Nodulin-26, a peribacteroid membrane nodulin is expressed independently of the development of the peribacteroid compartment. *Nucleic Acids Res.* 15:813-24
 45. Fortin, M. G., Zelechowska, M., Verma, D. P. S. 1985. Specific targeting of the membrane nodulins to the bacteroid enclosing compartment in soybean nodules. *EMBO J.* 4:3041-46
 46. Franssen, H. J., Nap, J. P., Gloude-mans, T., Stiekema, W., Van Dam, H., et al. 1987. Characterization of complementary DNA for nodulin-75 of soybean: a gene product involved in early stage of root nodule development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:4495-99
 47. Franssen, H. J., Scheres, B., van der Wiel, C., Bisseling, T. 1988. Characterization of soybean (hydroxy)-proline-rich nodulins. In *Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions 1988*, ed. R. Palacios, D. P. S. Verma, pp. 321-26. St. Paul, MN. APS Press
 48. Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S., Guillemin, J. P., Trouvelot, A., Duc, G. 1990. Genetic and cellular analysis of resistance to VA mycorrhizal fungi in pea plants. See Ref. 14, pp. 336-42
 49. Gloude-mans, T., Bhuvanewari, T. V., Moerman, M., Van Brussel, T., Van Kammen, A., et al. 1989. Involvement of *Rhizobium leguminosarum* nodulation genes in gene expression in pea root hairs. *Plant Mol. Biol.* 12:157-67
 50. Gloude-mans, T., Bisseling, T. 1989. Plant gene expression in early stages *Rhizobium-legume* symbiosis. *Plant Sci.* 65:1-14
 51. Gloude-mans, T., De Vries, S. C., Bus-sink, H. J., Malik, N. S. A., Franssen, H. J., et al. 1987. Nodulin gene expression during soybean (*Glycine max*) nodule development. *Plant Mol. Biol.* 8:395-403
 52. Govers, F., Gloude-mans, T., Moerman, M., Van Kammen, A., Bisseling, T. 1986. *Rhizobium* nod genes are involved in inducing an early nodulin gene. *Nature* 323:5645-66
 53. Govers, F., Nap, J. P., Van Kammen, A., Bisseling, T. 1987. Nodulins in the developing root nodule. *Plant Physiol. Biochem.* 25:309-22
 54. Gresshoff, P. M., Mathews, A., Krotz-ky, A., Olsson, J. E., Carroll, B. J. 1988. Supernodulation and nonnodulation mutants of soybean. See Ref. 47, pp. 364-69
 55. Griffith, S. M., Vance, C. P. 1989. Aspartate aminotransferase in alfalfa root nodules: purification and partial characterization. *Plant Physiol.* 90:1622-29
 56. Groat, R. G., Schrader, L. E. 1982. Isolation and immunochemical characterization of plant glutamine synthetase in alfalfa (*Medicago sativa* L.) nodules. *Plant Physiol.* 70:1759-61
 57. Halverston, L. J., Stacey, G. 1986. Signal exchange in plant-microbe interactions. *Microbiol. Rev.* 50:193-225
 58. Hauber, I., Herth, W., Reiss, H.-D. 1984. Calmodulin in tip-growing plant cells, visualized by fluorescing calmodulin-binding phenothiazines. *Planta* 162:33-39
 59. Hirel, B., Bouet, C., King, B., Layzell, D., Jacobs, F., et al. 1987. Glutamine synthetase genes are regulated by ammonia provided externally or by symbiotic nitrogen fixation. *EMBO J.* 6:1167-71
 60. Hirsch, A. M., Bhuvanewari, T. V., Torrey, J. G., Bisseling, T. 1989. Early nodulin genes are induced in alfalfa root outgrowths elicited by auxin transport inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1244-48
 61. Hollingsworth, R. I., Squartini, A., Philip-Hollingsworth, S., Dazzo, F. B. 1990. Had and noi signals from *Rhizobium trifolii*. In *Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives*, ed. P. M. Gresshoff, L. E. Roth, G. Stacey, W. E. Newton, p. 260. New York: Chapman & Hall
 62. Jacobs, F. A., Zhang, M., Fortin, M.

- G., Verma, D. P. S. 1987. Several nodulins of soybean share structural domains but differ in their subcellular locations. *Nucleic Acids Res.* 15:1271-80
63. Jacobs, M., Rubery, P. H. 1988. Naturally occurring auxin transport regulators. *Science* 241:346-49
64. Jacobsen, K., Laursen, N. B., Ostergaard, J. E., Marcker, A., Poulsen, C., et al. 1990. HMG1-like proteins from leaf and nodule nuclei interact with different A-T motifs in soybean nodulin promoters. *Plant Cell* 2:85-94
65. Jensen, E. Ø., Stougaard, J., Jørgensen, J. E., Sandal, N., de Bruijn, F. J., et al. 1988. Regulation of nodule-specific plant genes. See Ref. 4, pp. 605-9
66. Johnson, K. D., Hofte, H., Chrispeels, M. J. 1990. An intrinsic tonoplast protein of protein storage vacuoles in seeds is structurally related to a bacterial solute transporter (GlpF). *Plant Cell* 2:525-32
67. Jørgensen, J.-E., Stougaard, J., Marcker, A., Marcker, K. A. 1988. Root nodule specific gene regulation: analysis of the soybean nodulin N-23 gene promoter in heterologous symbiotic systems. *Nucleic Acids Res.* 16:39-50
68. Kachar, B., Reese, T. 1988. The mechanism of cytoplasmic streaming in characean algal cells: sliding of endoplasmic reticulum along actin filaments. *J. Cell Biol.* 106:1545-52
69. Katinakis, P., Verma, D. P. S. 1985. Nodulin-24 of soybean codes for a peptide of the peribacteroid membrane and was generated by tandem duplication of a sequence resembling an insertion element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:4157-61
70. Kijne, J. W., Diaz, C. L., de Pater, B. S., Smit, G., Bakhuizen, R., et al. 1990. Surface interactions between *Rhizobium* and legume root hairs. See Ref. 61. In press
71. Kohno, T., Shimmen, T. 1988. Accelerated sliding of pollen tube organelles along *Characeae* actin bundles regulated by Ca^{2+} . *J. Cell Biol.* 106:1539-43
72. Kouchi, H., Tsukamoto, M., Tajima, S. 1989. Differential expression of nodule-specific (nodulin) genes in the infected, uninfected and cortical cells of soybean (*Glycine max*) root nodules. *Plant Physiol.* 135:608-17
73. Krishnan, H. B., Pueppke, S. G. 1989. In vitro phosphorylation of soluble proteins from soybean, *Glycine max*, root nodules: inhibition of protein kinase activity by zinc. *Symbiosis* 7:127-38
74. Lara, M., Porta, H., Padilla, J., Folch, J., Sánchez, F. 1984. Heterogeneity of glutamine synthetase polypeptides in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* 76:1019-23
75. Larsen, K., Jochimsen, B. U. 1986. Expression of nodule-specific uricase in soybean callus tissue is regulated by oxygen. *EMBO J.* 5:15-19
76. LaRue, T. A., Kneen, B. E., Gardside, E. 1985. Plant mutants in symbiotic nitrogen fixation. In *Analysis of Plant Genes Involved in the Legume-Rhizobium Symbiosis*, ed. R. Marcelin, pp. 39-48. Paris: OECD Publications
77. Legocki, A. B., Boron, L., Szczygłowski, K. 1990. Yellow lupin genes coding for the nodule-specific form of glutamine synthetase and (hydroxy)proline-rich protein. Presented 8th Int. Congr. Nit. Fix., Knoxville, Abstr. G-24
78. Legocki, R. P., Verma, D. P. S. 1980. Identification of "nodule-specific" host proteins (nodulins) involved in the development of *Rhizobium*-legume symbiosis. *Cell* 20:153-63
79. Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., et al. 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 344:781-84
80. Lloyd, C. W. 1989. The plant cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1:30-35
81. Long, S. R. 1989. *Rhizobium* genetics. *Annu. Rev. Genet.* 23:483-506
82. Long, S. R. 1989. *Rhizobium*-legume nodulation: life together in the underground. *Cell* 56:203-14
83. Lullien, V., Barker, D. G., de Lajudie, P., Huguet, T. 1987. Plant gene expression in effective and ineffective root nodules of alfalfa (*Medicago sativa*). *Plant Mol. Biol.* 9:469-78
84. Lynn, D. G., Chang, M. 1990. Phenolic signals in cohabitation: implications for plant development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41:497-526
85. Marné, D. 1989. The role of calcium and calmodulin in signal transduction. In *Second Messengers in Plant Growth and Development*, ed. W. F. Boss, D. J. Morré, pp. 57-80. New York: Alan R. Liss
86. Martínez, E., Romero, D., Palacios, R. 1990. The *Rhizobium* genome. *Crit. Rev. Plant. Sci.* 9:59-93
87. Mauro, V. P., Nguyen, T., Katinakis, P., Verma, D. P. S. 1985. Primary structure of the soybean nodulin-23 gene and potential regulatory elements in the 5'-flanking regions of nodulin and leghemoglobin genes. *Nucleic Acids Res.* 13:239-49
88. Means, A. R., Chafouleas, J. G. 1982. Regulation by and of calmodulin in

- mammalian cells. *Cold Spring Harbor Symp.* 46:903-8
89. Mellor, R. B. 1989. Bacteroids in the *Rhizobium*-legume symbiosis inhabit a plant internal lytic compartment: implications for other microbial endosymbioses. *J. Exp. Bot.* 40:831-39
 90. Mellor, R. B., Garbers, C., Werner, D. 1989. Peribacteroid membrane nodulin gene induction by *Bradyrhizobium japonicum* mutants. *Plant Mol. Biol.* 12:307-16
 91. Mellor, R. B., Werner, D. 1987. Peribacteroid membrane biogenesis in mature legume root nodules. *Symbiosis* 3:75-100
 92. Mifflin, B. J., Lea, P. J. 1980. Ammonia assimilation. In *The Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise*, ed. B. J. Mifflin, 5:169-202. New York: Academic
 93. Moerman, M., Nap, J. P., Govers, F., Schilperoot, R., Van Kammen, A., et al. 1987. *Rhizobium* nod genes are involved in the induction of two early nodulin genes in *Vicia sativa* root nodules. *Plant Mol. Biol.* 9:171-79
 94. Morell, M., Copeland, L. 1985. Sucrose synthase of soybean nodules. *Plant Physiol.* 78:149-54
 95. Morrison, N., Verma, D. P. S. 1987. A block in the endocytosis of *Rhizobium* allows cellular differentiation in nodules but affects the expression of some peribacteroid membrane nodulins. *Plant Mol. Biol.* 9:185-96
 96. Nap, J. P., Bisseling, T. 1990. Nodulin function and nodulin gene regulation in root nodule development. In *The Molecular Biology of Symbiotic Nitrogen Fixation*, ed. P. M. Gresshoff, pp. 181-229. Boca Raton, FL: CRC Press
 97. Nguyen, T., Zelechowska, M. G., Foster, V., Bergmann, H., Verma, D. P. S. 1985. Primary structure of the soybean nodulin-35 gene encoding nodule specific uricase II localized in peroxisomes of uninfected cells of soybean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:5040-44
 98. Norris, J. H., Macol, L. A., Hirsch, A. M. 1988. Nodulin gene expression in effective alfalfa nodules and in nodules arrested at three different stages of development. *Plant Physiol.* 88:321-28
 99. Ortega, J. L., Blanco, L., Lara, M. 1990. Effect of high CO₂ concentration in nitrogen and carbon metabolism of the *Phaseolus vulgaris* root-nodules. Presented at 5th Int. Symp. Mol. Genet. Plant-Microbe Interact., Interlaken. Abstr. p. 154
 100. Padilla, J. E., Campos, F., Conde, V., Lara, M., Sánchez, F. 1987. Nodule-specific glutamine synthetase is expressed before the onset of nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Mol. Biol.* 9:65-74
 101. Padilla, J. E., Sánchez, F. 1990. Nodulin expression and organogenesis in mutant-induced nodules of common bean, (*Phaseolus vulgaris* L.). Presented at 5th Int. Symp. Mol. Genet. Plant-Microbe Interact., Interlaken. Abstr. p. 136
 102. Peters, N. K., Verma, D. P. S. 1990. Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3:4-8
 103. Peterson, J. B., Evans, H. J. 1979. Phosphoenolpyruvate carboxylase from soybean nodule cytosol. Evidence for isozymes and kinetics of the most active component. *Biochim. Biophys. Acta* 567:445-52
 104. Petit, A., Stougaard, J., Kühle, A., Marcker, K. A., Tempe, J. 1987. Transformation and regeneration of the legume *Lotus corniculatus*: a system for molecular studies of symbiotic nitrogen fixation. *Mol. Gen. Genet.* 207:245-50
 105. Reiss, H. D., Herth, W. 1979. Calcium gradients in tip growing plant cells visualized by chlorotetracycline fluorescence. *Planta* 146:615-21
 106. Reynolds, P. H. S., Boland, M. J., Farnden, K. J. F. 1981. Enzymes of nitrogen metabolism in legume nodules: partial purification and properties of the aspartate aminotransferases from lupin nodules. *Arch. Biochem. Biophys.* 209: 524-33
 107. Röhm, M., Werner, D. 1987. Isolation of root hairs from seedlings of *Pisum sativum*. Identification of root hair specific proteins by in situ labelling. *Physiol. Plant.* 69:129-36
 108. Rolfe, B. G. 1988. Flavones and isoflavones as inducing substances of legume nodulation. *Biofactors* 1:3-10
 109. Rolfe, B. G., Gresshoff, P. M. 1988. Genetic analysis of legume nodule initiation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39:297-319
 110. Sánchez, F., Campos, F., Padilla, J., Bonneville, J.-M., Enriquez, C., et al. 1987. Purification, cDNA cloning, and developmental expression of the nodule-specific uricase from *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* 1987:1143-47
 111. Sánchez, F., Quinto, C., Vázquez, M., De las Peñas, A., Cevallos, M. A., et al. 1988. The symbiotic association between *Phaseolus vulgaris* and *Rhizobium phaseoli*. See Ref. 47, pp. 370-75
 112. Sandal, N. N., Bojzen, K., Marcker,

- K. A. 1987. A small family of nodule specific genes from soybean. *Nucleic Acids Res.* 15:1507-19
113. Scheres, B., van de Wiel, C., Zalenski, A., Horvath, B., Spaink, H., et al. 1990. The ENOD12 product is involved in the infection process during the pea-*Rhizobium* interaction. *Cell* 60:281-94
 114. Scheres, B., van Engelen, F., van der Knaap, E., van de Wiel, C., van Kammen, A., et al. 1990. Sequential induction of nodulin gene expression in the developing pea nodule. *Plant Cell* 2:687-700
 115. Schiefelbein, J. W., Somerville, C. 1990. Genetic control of root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 2:235-43
 116. Schmidt, J., John, M., Wieneke, U., Stacey, G., Schell, J. 1990. Studies on the function of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. See Ref. 14, pp. 150-55
 117. Schmidt, J., Wingender, R., John, M., Wieneke, U., Schell, J. 1988. *Rhizobium meliloti nodA* and *nodB* genes involved in generating compounds that stimulate mitosis of plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:8578-82
 118. Schmit, A.-C., Lambert, A.-M. 1990. Microinjected fluorescent phalloidin *in vivo* reveals the F-actin dynamics and assembly in higher plant mitotic cells. *Plant Cell* 2:129-38
 119. Schnepf, E. 1986. Cellular polarity. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37:23-47
 120. Schubert, K. R. 1986. Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport and metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37:539-74
 121. Sengupta-Gopalan, C., Pitas, J. W. 1986. Expression of nodule-specific glutamine synthetase genes during nodule development in soybeans. *Plant Mol. Biol.* 7:189-99
 122. Sengupta-Gopalan, C., Pitas, J. W., Thompson, D. V., Hoffman, L. M. 1986. Expression of host genes during root nodule development in soybeans. *Mol. Gen. Genet.* 203:410-20
 123. Sethi, R. S., Reporter, M. 1981. Calcium localization pattern in clover root hair cells associated with infection processes: studies with auromycin. *Protoplasma* 105:321-25
 124. Sharma, S., Signer, E. R. 1990. Temporal and spatial regulation of the symbiotic genes of *Rhizobium meliloti* in plant revealed by transposon Tn5-*gusA*. *Genes Dev.* 2:344-56
 125. Sprent, J. I. 1989. Which steps are essential for the formation of functional legume nodules? *New Phytol.* 11:129-53
 126. Staiger, C. J., Schliwa, M. 1987. Actin localization and function in higher plants. *Protoplasma* 141:1-12
 127. Stegink, S. J., Vaughn, K. C. 1990. Immunotaxonomy of nodule-specific proteins. *Cytobios* 61:7-20
 128. Strittmatter, G., Chia, T.-F., Trinh, T. H., Katagiri, F., Kuhlemeier, C., Chua, N. H. 1989. Characterization of nodule-specific cDNA clones from *Sesbania rostrata* and expression of the corresponding genes during initial stages of stem nodules and root nodules formation. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2:122-27
 129. Sutherland, T. D., Bassam, B. J., Schuller, L. J., Gresshoff, P. M. 1990. Early nodulation signals of the wild type and symbiotic mutants of soybean (*Glycine max*). *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3:122-28
 130. Suzuki, A., Vidal, J., Nguyen, J., Gadal, P. 1984. Occurrence of ferredoxin-dependent glutamate synthase in plant cell fraction of soybean root nodule (*Glycine max*). *FEBS Lett.* 173:204-8
 131. Szabados, L., Ratet, P., Grunenberg, B., de Bruijn, F. J. 1990. Functional analysis of the *Sesbania rostrata* leghemoglobin *glb3* gene 5' upstream region in transgenic *Lotus corniculatus* and *Nicotiana tabacum* plants. *Plant Cell* 2:973-86
 132. Thummler, F., Verma, D. P. S. 1987. Nodulin-100 of soybean is the subunit of sucrose synthase regulated by the availability of free heme in nodules. *J. Biol. Chem.* 262:14730-36
 133. Tingey, S. V., Walker, E. L., Coruzzi, G. M. 1987. Glutamine synthetase genes of pea encode distinct polypeptides which are differentially expressed in leaves, roots and nodules. *EMBO J.* 6:1-9
 134. Tran Thanh Van, K., Toubart, P., Cousson, A., Darvill, A. G., Gollin, D. J., et al. 1985. Manipulation of the morphogenetic pathway of tobacco explants by oligosaccharins. *Nature* 314: 615-17
 135. Trese, A. T., Pueppke, S. G. 1990. Modulation of host gene expression during initiation and early growth of nodules in cowpea, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Plant Physiol.* 92:946-53
 136. Truchet, G., Barker, D. G., Camut, S., de Billy, F., Vasse, J., Huguet, T. 1989. Allia nodulation in the absence of *Rhizobium*. *Mol. Gen. Genet.* 219: 65-68

137. Turgeon, G., Bauer, W. D. 1982. Electron microscopy of infection thread formation in soybean. *Plant Physiol.* 69:156
138. van Batenburg, F. H. D., Jonker, R., Kijne, J. W. 1986. *Rhizobium* induces marked root hair curling by redirection of tip growth: a computer simulation. *Physiol. Plant.* 66:476-80
139. van de Wiel, C., Nap, J. P., van Lammeren, A., Bisseling, T. 1988. Histological evidence that a defense of the host plant interferes with nodulin gene expression in *Vicia sativa* root nodules induced by an *Agrobacterium* transconjugant. *J. Plant Physiol.* 132:446-52
140. van de Wiel, C., Norris, J. I. I., Bochenek, B., Dickstein, R., Bisseling, T., et al. 1990. Nodulin gene expression and ENOD2 localization in effective, nitrogen-fixing and ineffective, bacteria-free nodules of alfalfa. *Plant Cell* 2:1009-17
141. van de Wiel, C., Scheres, B., Franssen, H., van Lierop M.-J., van Lammeren, A., et al. 1990. The early nodulin transcript ENOD2 is located in the nodule parenchyma (inner cortex) of pea and soybean root nodules. *EMBO J.* 9:1-7
142. Van Kammen, A. 1984. Suggested nomenclature for plant genes involved in nodulation and symbiosis. *Plant Mol. Biol. Rep.* 2:43-45
143. Vance, C. P., Egli, M. A., Griffith, S. M., Miller, S. S. 1988. Plant regulated aspects of nodulation and N₂ fixation. *Plant Cell Environ.* 11:413-27
144. Vance, C. P., Griffith, S. M. 1988. The molecular biology of N metabolism. In *Advanced Plant Physiology and Molecular Biology*, ed. D. H. Turpin, D. T. Dennis. Essex: Longman Scientific
145. Vance, C. P., Stude, S. 1984. Alfalfa root nodule carbon dioxide fixation. II. Partial purification and characterization of root nodule phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* 75:261-64
146. VandenBosch, K. A., Bradley, D. J., Knox, J. P., Perotto, S., Butcher, G. W., Brewin, N. J. 1989. Common components of the infection thread matrix and the intercellular space identified by immunocytochemical analysis of pea nodules and uninfected roots. *EMBO J.* 8:335-42
147. Verma, D. P. S., Delauney, A. J. 1988. Root nodule symbiosis: nodulins and nodulin genes. In *Temporal and Spatial Regulation of Plant Genes*, ed. D. P. S. Verma, R. Goldberg. pp. 169-99. Berlin: Springer-Verlag
148. Vincent, J. M. 1980. Factors controlling the *Rhizobium* symbiosis. In *Nitrogen Fixation*, ed. W. E. Newton, W. H. Orme-Johnson, 2:103-22. Baltimore: University Park Press
149. Wacker, I., Schnepf, E. 1990. Effects of nifedipine, verapamil, and diltiazem on tip growth in *Funaria hygrometrica*. *Planta* 180:492-501
150. Weaver, C. D., Stacey, G., Roberts, D. M. 1990. Phosphorylation of nodulin-26 by a Ca-dependent protein kinase. See Ref. 61, p. 774
151. Weeden, N. F., Kneen, B. E., LaRue, T. A. 1990. Map position of *sym* genes involved in nodulation and nitrogen fixation in *Pisum sativum*. See Ref. 61, p. 323
152. Welters, P., Felix, G., Schell, J., de Bruijn, F. J. 1990. Specific interactions of rhizobial proteins (*trans*-acting factors) with distinct DNA sequences in the promoter region of *Sesbania rostrata* leghemoglobin (*lb*) genes. See Ref. 61, p. 775
153. Werner, D., Bassarab, S., Humbeck, C., Kape, R., Kinnback, A., et al. 1988. Nodule proteins and compartments. See Ref. 4, pp. 507-15
154. Wittenberg, J. B., Wittenberg, B. A. 1990. Mechanisms of cytoplasmic hemoglobin and myoglobin function. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 19:217-41
155. Wood, S. M., Newcomb, W. 1989. Nodule morphogenesis: the early infection of alfalfa (*Medicago sativa*) root hairs by *Rhizobium meliloti*. *Can. J. Bot.* 67:3108-22
156. Wyss, P., Mellor, R. B., Wiemken, A. 1990. Vesicular-arbuscular mycorrhizas of wild-type soybean and nonmodulating mutants with *Glomus mosseae* contain symbiosis-specific polypeptides (mycorrhizins), immunologically cross-reactive with nodulins. *Planta* 182:22-26
157. Yokohama, K., Kaji, H., Nishimura, K., Miyaji, M. 1990. The role of microfilaments and microtubules in apical growth and dimorphism of *Candida albicans*. *J. Gen. Microb.* 136:1067-75
158. Zaat, S. A. J., Van Brussel, A. A. N., Tak, T., Pees, E., Lugtenberg, B. J. J. 1987. Flavonoids induce *Rhizobium leguminosarum* to produce *nodABC* gene-related factors that cause thick, short roots and root hair responses on common vetch. *J. Bacteriol.* 169:3388-91

III. PROYECTO DE TESIS

1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

La finalidad de la línea de investigación en la que trabajamos, ha comprendido la identificación de los genes, productos génicos y señales moleculares que participan de manera relevante en la simbiosis Rhizobium-frijol. En particular, nuestro grupo se ha avocado a la determinación de las funciones y/o los mecanismos de regulación de algunas nodulinas, abordando varias estrategias experimentales. En este sentido, los principales resultados que establecieron los antecedentes de esta tesis, son:

- La purificación de las nodulinas más abundantes en frijol, aislamiento de clonas de cDNA y determinación de su cinética de expresión: (GS- γ , uricasa-II, Lb y Npv-30)¹⁵.
- La identificación y caracterización de varios genes de R. phaseoli necesarios para la inducción, desarrollo y función del nódulo¹⁶.
- Al finalizar el proyecto de maestría se concluyó, concretamente, que la regulación de GS- γ podía depender de al menos dos condiciones: una asociada con la infección bacteriana de las células de nódulo (inducción inicial), y otra relacionada a la actividad de la nitrogenasa (actividad incrementada)¹⁷. En ese momento propusimos además, el uso de varias nodulinas como indicadores fenotípicos ('marcadores'), y de un mayor número de mutantes de R. phaseoli para discriminar los efectos del desarrollo y del metabolismo en la regulación de estas nodulinas abundantes¹⁸.
- El reconocimiento de un patrón temporal en la expresión de nodulinas en leguminosas: nodulinas tempranas y tardías. Las primeras se inducen, como se indicó antes, al tiempo de la organogénesis del nódulo y con dependencia de los genes nod bacterianos, i.e. ENOD2; el resto aparecen después de la infección, antes de la fijación de nitrógeno, i.e. Lb. Varios reportes relacionados dieron relevancia al uso de mutantes bacterianas que inducían bloqueos del desarrollo, pero se requería una estrategia para discriminar efectos múltiples y parciales¹⁹.
- Nuestro análisis preliminar de nódulos de frijol inducidos por mutantes simbióticas, anticipó tres conclusiones: a) Que las nodulinas tardías como GS- γ y Lb, estaban ausentes en nódulos vacíos y se detectan en nódulos inefectivos a concentraciones variables; b) que la 'región génica mínima' que confiere nodulación en R. l. bv. phaseoli es capaz de inducir nódulos donde muchas nodulinas inducidas por una cepa silvestre se

expresan en niveles similares y, c) que la inducción de la nodulina-30 parecía ser afectada de un modo particular en nódulos con desarrollo alterado²⁰.

En ese momento se planteaba el paradigma de la infección de Rhizobium como determinante de la inducción de nodulinas. No obstante, los patrones de expresión temporal, con mutantes simbióticas y bajo condiciones ambientales modificadas sugerían varios niveles y mecanismos de regulación en nódulos. Para este proyecto nos restringimos al efecto del genotipo de R. leg. bv. phaseoli en la expresión de marcadores 'indicativos' de la nodulación de frijol, estableciendo la siguiente hipótesis:

Si existen varios genes bacterianos involucrados en pasos sucesivos del desarrollo del nódulo (v.gr. inducción del meristemo, infección intracelular, fijación de N₂), entonces, mutantes en tales genes deben condicionar la expresión de nodulinas 'indicativas' de una forma diferencial, dado que se alterarán una o varias condiciones de regulación.

Considerando que en frijol no existía un estudio que abarcara la regulación simultánea de varias nodulinas, y que contábamos con la experiencia de otros grupos de investigación en la genética del R. leguminosarum bv. phaseoli, nos propusimos el siguiente objetivo:

Determinar las condiciones y discriminar efectos múltiples del desarrollo en la inducción de nodulinas 'indicativas' de nódulos determinados como los de frijol. La estrategia elegida requirió de los siguientes pasos:

- a. Obtener o seleccionar un grupo de cepas conteniendo distintas mutaciones que alteren el proceso de la nodulación, en el mismo o en varios estados del desarrollo, y también de una batería de sondas moleculares.
- b. Establecer un método para determinar el patrón de expresión y comparar la abundancia relativa de nodulinas indicativas, en varios estados del desarrollo de estos nódulos.
- c. Correlacionar los perfiles de expresión de nodulinas con el estado de diferenciación, para identificar algunos eventos y/o condiciones asociadas con la regulación de estos genes.

2. RESULTADOS

En esta sección se hace referencia a los datos obtenidos durante el proyecto; también se hace un énfasis en aspectos metodológicos que permite justificar simultáneamente, las ventajas de los procedimientos utilizados. Además, se sugieren innovaciones que puedan facilitar trabajos posteriores.

2.1. DATOS PRELIMINARES Y CONSIDERACIONES METODOLOGICAS

2.1.2 Cepas bacterianas

La integración del conjunto de cepas ensayadas, atendió finalmente a tres criterios: (a) la disponibilidad de mutantes y construcciones suficientemente caracterizadas (genotipo y fenotipos); (b) la utilización de cepas genéticamente relacionadas y, (c) la facilidad de obtener material y muestras biológicas con relativa rapidez y rendimiento. En función de esto, se utilizaron rhizobia derivados del fondo genético de la cepa CFN42 ó CE3, y receptores conteniendo regiones del plásmido simbiótico correspondiente (pCFN42d; Tabla 1 del manuscrito anexo), evitando las comparaciones previas con nódulos formados por otras cepas que nodulan frijol (i.e. CIAT899, CFN400 [=Cly80])²¹. Tres mutantes bacterianas que forman nódulos vacíos fueron ensayadas para corroborar datos obtenidos con una sola de ellas. Por otro lado, la obtención rápida y suficiente de RNA y proteína de nódulos con nuestros protocolos, requirió de una estrategia para seleccionar derivados de algunas cepas que no formaran nódulos 'viscosos'. Para ello fué utilizada la cepa CE330 (derivado de CE3 deficiente en exopolisacáridos; Exo⁻) como tipo silvestre; se obtuvo además, una cepa sin plásmido simbiótico en este fondo para transferirle otros plásmidos con construcciones particulares y generar cepas Exo⁻ equivalentes a otras ya descritas. Varias transconjugantes de *Agrobacterium* que contienen plásmidos simbióticos de *Rhizobium* que son capaces de nodular y fijar deficientemente en frijol, ya habían sido reportadas²². Sin embargo, el papel de estas cepas en la inducción de nodulinas, había sido analizado de manera preliminar²³.

2.1.2 Sondas moleculares

Los probadores utilizados para detectar la presencia y nivel de productos génicos de nodulinas, correspondieron a varios tipos de antisueros, clonas de ADNc y oligonucleótidos sintéticos que mostraron una eficacia variable.

A). Antisueros. En una primera aproximación se caracterizó el patrón de expresión de nódulos con desarrollo alterado, a través de inmunodetección de perfiles de proteína con antisueros específicos dirigidos contra, (a) algunas nodulinas purificadas (GS, uricasa II, Lb), o (b), contra fracciones protéicas del nódulo. En particular, uno de ellos (α -PvNOD) fué derivado a partir de un antisuero anti-nódulo (fracción soluble) titulado con proteínas de raíces sin infectar, utilizando dos protocolos distintos. El análisis de los resultados mostró, en el caso (a), baja sensibilidad. Para el caso (b) la inmunodetección de nodulinas totales no permitió distinguir con certeza, bandas únicas o enriquecidas; mas aún, después de 4-5 pasos de titulación, no fué posible eliminar por completo el fondo detectado en la fracción de raíz. Por esta razón, este antisuero no fué empleado para inmunoprecipitar los productos de traducción *in vitro* (PTV). El enfoque inmunológico, con ciertas modificaciones, puede ser todavía de utilidad (ver más adelante).

B). ADNc de nodulinas indicativas. Estas sondas se obtuvieron en nuestro laboratorio —salvo una de ellas, a partir de un banco de ADNc de nódulos maduros de frijol²⁴. La hibridación 'en punto' (dot-blot) produjo resultados cualitativos importantes²⁵, pero en ellos se dificultaba la discriminación precisa de diferencias relativas en los niveles de ARNm. Posteriormente, para este trabajo se verificó la identidad, tamaño y perfil de hibridación de las sondas contra filtros patrón, a fin de optimizar las condiciones para un análisis de expresión más cuantitativo. Nuestra intención original incluía el análisis de la expresión de glutamina sintetasa de nódulos. Los resultados obtenidos con una clona de GS de frijol²⁶ no fueron muy claros, puesto que esta secuencia hibrida con los ARNm de todas los monómeros de GS; se utilizó también un oligonucleótido sintético con una secuencia de la región 3' del gene *glu-r* (que codifica el monómero GS-gama típico de nódulos). Las condiciones del marcaje radioactivo, hibridación y lavados fueron optimizadas, pero los resultados no fueron del todo reproducibles. En el transcurso de estos experimentos, se publicó un reporte con datos sobre la expresión de este gen en nódulos de frijol bajo diversas condiciones²⁷. Aunque ya disponíamos de otro oligonucleótido correspondiente a una región 5' específica, decidimos no repetir este análisis.

C). Control interno de ARN. Para la determinación precisa de los niveles de mensajero, decidimos utilizar controles internos de concentración de ARN. Se requerían por tanto, detectores para aquellos genes cuya expresión fuera constitutiva o poco variable. El primer ensayo se efectuó con una sonda de ubiquitina de maíz²⁸ que hibridó con tres transcritos por lo menos. Enseguida, probamos un inserto del gene de la histona H3²⁹; este hibridó difusamente con la zona de transcritos de bajo peso molecular. Además, algunos filtros mostraron una variación aparente de la expresión de ambos genes dependiendo del tipo o edad del tejido. Se decidió finalmente, utilizar un probador con el gene del ARN ribosomal 5S de maíz³⁰, con el que se detectó una banda sencilla y cuya señal intensa y clara, es proporcional a la intensidad relativa de los otros ARN ribosomales teñidos.

2.1.3 Análisis del desarrollo

A). Sistema de crecimiento y ensayo de nodulación. Algunos de los problemas con el manejo experimental de macetas con plantas noduladas de frijol —a nivel invernadero o cámara de crecimiento, son generalmente: (a) contaminación de inoculantes entre múltiples tratamientos; (b) limitación y variaciones intrínsecas del crecimiento de las plantas y (c) una cantidad considerable de tiempo y espacio requeridos para la manipulación continua de las macetas. En consecuencia, decidimos establecer un sistema alternativo y adecuado para el control de estas variables. Después de probar distintas versiones, se optó por utilizar "macetas desechables" hechas con empaques de leche tipo Tetra-Brick, cultivando 2 plantas por maceta, durante el ciclo primavera-verano en invernadero. En este sistema encontramos los niveles más bajos de contaminación de controles, facilidad en el

manejo de distintos tratamientos (preparación y mantenimiento) y, considerando los distintos fenotipos simbióticos, una producción reproducible y suficiente de material biológico (aprox. 0.1-1.5 gr. nódulos/planta).

B). Análisis morfológico. La observación detallada de raíces noduladas y nódulos, es un paso importante para reconocer los fenotipos simbióticos más conspicuos. Nuestro interés fue confirmar o identificar detalles ultraestructurales asociados con bloqueos del desarrollo. Esta última etapa (microscopía electrónica), se postergó por razones técnicas y la observación de nódulos completos y secciones frescas, se hizo bajo el microscopio estereoscópico. Nuestro análisis permitió distinguir, sin lugar a dudas, diferencias particulares en los nódulos formados por mutantes³¹; asimismo sirvió como base para decidir el momento del desarrollo para hacer un análisis de la expresión genética.

2.1.4. Análisis de expresión

A). Perfiles de expresión de proteína y PTV. Como se mencionó antes, el análisis de estos componentes no ha sido totalmente abordado. En la actualidad, el uso de técnicas inmunológicas más sensibles y sistemas de electroforesis miniaturizados, hace posible verificar los cambios de expresión de las nodulinas, considerando otro nivel de regulación.

B). Purificación de ARN mensajero. Nuestro protocolo es el resultado de modificaciones menores a otros ya reportados³². Por la naturaleza y cantidad del material biológico, este método fue práctico para raíces, meristemos y nódulos; además los extractos de guanidina pueden ser congelados para utilizarse como material de inicio y con rendimientos razonables (aprox. 75µg ARN/gr. tejido). Finalmente, el almacenamiento de muestras diluidas de ARN en 70% etanol a -20° C, permite disponer con rapidez y seguridad del mismo material para experimentos subsecuentes.

C). Análisis del nivel de ARN. La evaluación de los niveles relativos de mensajero requirió de técnicas de cuantificación y normalización efectivas. Con la idea de minimizar las variaciones en la carga de ARN en los carriles del gel y la baja confiabilidad de un-solo-punto- por-muestra, se evaluó la concentración de los transcritos por hibridación de diluciones seriales de ARN (slot-blot). Posteriormente los autorradiogramas se sometieron a densitometría en doble dimensión; los datos numéricos se linearizaron para después normalizarlos con los valores de la señal correspondiente del transcrito ribosomal 5S. Los datos resultantes permitieron hacer una comparación relativa y gráfica entre niveles de ARN de nodulinas en nódulos formados por distintas cepas y a diferentes tiempos del desarrollo.

Junto con los detalles y referencias específicos sobre las técnicas anteriores, se presentan a continuación los resultados y conclusiones del proyecto experimental de la tesis.

TYPESETTING SPECIFICATION: Editor:map
 Wang Doc: 03251; Epics File: M320
 Operator: sk; Date: 06-20-91

MS IDENTIFICATION: #320
 Author: Padilla
 ELECTRONIC PROCESSING

PROOF

© 1991 The American Phytopathological Society

This article is in the public domain and not copyrightable. It may be freely reprinted with customary crediting of the source. The American Phytopathological Society, 1991.

Address correspondence to Jaime E. Padilla.
 Present address of Jaime E. Padilla and Federico Sánchez: Department of Plant Molecular Biology, Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología-UNAM, Ap. Postal 510-3, Cuernavaca, Mor. 62271 México.

MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS
 Vol. 4, No. 5, pp. 000-000, 1991

Common Nodulin Regulation in ~~Colon~~ Bean Nodules Induced by Bacterial Mutants

Jaime E. Padilla, Juan Miranda, and Federico Sánchez

Biología Molecular de plantas, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México.
 Received 13 February 1991. Accepted 24 April 1991.

Nodulin expression was evaluated in nodules of common bean (*Phaseolus vulgaris*) induced by *Rhizobium phaseoli* mutants and an *Agrobacterium* transconjugant. Either noninfected, slow-developed, or ineffective nodules, or nodules arrested after bacterial release were formed. The expression levels of ENOD2, uricase-II, leghemoglobin (Lb), and nodulin-30 (Npv-30) transcripts were compared in nodules induced by wild type and mutant strains at initial (12 d) and terminal (21 d) developmental stages. Uricase-II mRNA was detected in "empty" nodules produced by three different mutants, suggesting an additional regulation of this nodulin during the early stages of nodulation. Accumulation of ENOD2 and uricase-II transcripts were observed in slow-developed but not in arrested nodules. Npv-30 and Lb mRNAs were only found in nodules containing infected cells; however, their relative levels differ depending on the nodule-inducing mutant. Ineffective strains produced nodules with similar initial development and nodulin gene expression, but decreased amounts of late nodulin transcripts at the terminal stage. Correlations that suggest conditions for the initial and coordinated regulation of nodulin expression in determinate-type nodules are discussed.

Additional keywords: nitrogen fixation, nodule development, nodulin genes, *Rhizobium*-legume symbiosis.

Rhizobium-legume interactions result in the formation of nitrogen-fixing nodules. The nodulation process is regarded as a suitable model to study plant development, and has been analyzed in terms of differential gene expression (Nap and Bisseling 1990), morphogenesis (Sprent 1989; Scheres *et al.* 1990), and metabolic compartmentalization (Dilworth and Glenn 1984; Kouchi *et al.* 1988). The exchange of molecular signals between the bacteria and the host-plant are decisive for nodule organogenesis and gene regulation (Long 1989; Bisseling *et al.* 1990; Sánchez *et al.* 1991).

Recent reviews describe the differential expression of nodulin genes during nodule development (Verma and Delauney 1988; Nap and Bisseling 1990; Sánchez *et al.* 1991). Nodulins can be classified as early and late, based on the temporal course of their expression. Some nodulins can be used as phenotypic markers because they are involved in organogenesis and/or physiological specialization of nitrogen-fixing nodules (Scheres *et al.* 1990; Sánchez *et al.* 1991). We have studied several of these "indicative" nodulins in common bean nodules (Padilla *et al.* 1987; Campos *et al.* 1987; Sánchez *et al.* 1987; Sánchez *et al.* 1991). They include: ENOD2, which encodes for a hydroxyproline-rich protein associated with nodule induction (Franssen *et al.* 1987) and is expressed in nodule parenchyma, a region of the nodule recognized as a diffusion barrier to oxygen (van de Wiel *et al.* 1990; Layzell *et al.* 1990); leghemoglobins, which are oxygen-binding proteins with a role in regulating O₂ diffusion for bacterial respiration and nitrogenase protection, and are found in the cytosol of infected plant cells (Appleby 1984); uricase-II (nodule-specific urate oxidase), which is preferentially localized in the peroxisomes of uninfected nodule cells of ureide-producing tropical legumes (Bergman *et al.* 1983; Nguyen *et al.* 1985); nodulin-30 (Npv-30), which includes a gene family that encodes transcripts abundantly expressed in effective nodules of *Phaseolus vulgaris* L. (Campos *et al.* 1987) and has common features to a nodulin gene family previously described in soybeans (F. Campos, C. Carsolio, M. Rocha-Sosa, and F. Sánchez, in preparation; Verma and Delauney 1988; Sánchez *et al.* 1991); and glutamine synthetases (GS), which participate in ammonia assimilation. Data concerning the regulation of the GS gene family in common bean nodules have been recently published (Cock *et al.* 1990).

The use of bacterial mutants that impair symbiosis has contributed to understanding the role of various bacterial genes in nodule development and plant-gene expression (Govers *et al.* 1986; Morrison and Verma 1987; Sánchez *et al.* 1991). Mutations that affect nodulation and nitrogen fixation of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* Jordan, were obtained by insertional mutagenesis linked to purine auxotrophy (Noel *et al.* 1988), lipopolysaccharide synthesis (Noel *et al.* 1986), and respiratory phenotypes (Soberón *et al.* 1990; M. Soberón, G. R. Aguilar, J. E. Padilla, and F. Sánchez, unpublished). Alternative strategies for the analysis of common bean-*R. l.* bv. *phaseoli* interactions, included genetic complementation of pSym-cured strains for nodulation (Cevallos *et al.* 1989), site-directed mutagenesis of *nifHDK* operons, (Romero *et al.* 1988), and *Agrobacterium* pSym transconjugants (Martínez *et al.* 1987; Brom *et al.* 1988).

This paper reports an analysis of nodulin gene expression in common bean nodules induced by mutant strains. Quantitative data on transcript levels of four indicative nodulins at two nodulation stages are presented. Results show diverse and unexpected patterns of nodulin expression. We discuss some conditions that might participate in the regulation of these nodulin genes.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, and media. Strains and plasmids used in this work are listed in Table 1. Yeast extract-mannitol (YM) medium was described elsewhere (Diebold and Noel 1989). Antibiotics were used at the following concentrations (in $\mu\text{g ml}^{-1}$): rifampycin (Rif), 50; tetracycline (Tc), 5; kanamycin (Km), 30; spectinomycin (Sp), 100; chloramphenicol (Cm), 15; nalidixic acid (Nal), 10; and streptomycin (Str), 100.

Strain construction and DNA manipulations. Strain CE330 was used as wild type. It forms nonmucoid colonies (Exo⁻) on agar plates, and nodulates effectively (Diebold and Noel 1989). Mutation Exo⁻ was introduced into strain CFN2001 (a pSym-cured CFN42; Palacios *et al.* 1983) by pJB3-mediated conjugal transfer as described (Noel *et al.* 1984). The resulting strain (JP032) was used as a plasmid receptor to obtain strains JP32C and JP32F (Table 1). Nodules formed by these Exo⁻ strains allowed a more efficient nodule RNA isolation. DNA was transferred to a pTi-cured *Agrobacterium tumefaciens* strain (Brom *et al.* 1988) to look for nodulin expression induced by transconjugants. Matings for plasmid transfer and marker selection were done as described by Cevallos *et al.* (1989).

Plant growth and inoculation. *P. vulgaris* cv. negro Jamapa seeds (ProNaSe, México) were surface-sterilized in commercial bleach and germinated on moist sterile filter paper. A pair of 3-day-old seedlings were transferred to sterile "Tetra-Brick" milk packings (9 × 6 × 18 cm) and inoculated with saturated bacterial suspensions grown in YM medium. Plants were grown hydroponically under greenhouse conditions as reported earlier (Padilla *et al.* 1987).

Table 1. Bacterial strains, plasmids, and cDNA probes used in this study

Strain	Origin/genotype, characteristics, or insert	Relevant Phenotypes*	Reference
<i>Rhizobium phaseoli</i>			
CE3	CFN42 <i>str-1</i>	Exo ⁺ Nal ^r Sm ^r Nod ⁺ Fix ⁺	Noel <i>et al.</i> 1984
CE330	CE3 <i>exo330::TnJ</i>	Exo ⁻ Sir ^r Km ^r Nod ⁺ Fix ⁺	Diebold & Noel 1989
CFN2001	CFN42 cured of p42a p42d(Sym)	Rif ^r Nal ^r Nod ⁻	Palacios <i>et al.</i> 1983
JP032	CFN2001 <i>exo330::TnJ</i>	Rif ^r Km ^r Nod ⁻	This study
JP32C	JP032(pNC206::pSM991.25)	Exo ⁻ Rif ^r Tc ^r	This study
JP32F	JP032(p42f.2210)	Exo ⁻ Rif ^r Sp ^r	This study
CE106	CE3 <i>pur106::TnJ</i>	Sir ^r Km ^r Pur ⁻	Noel <i>et al.</i> 1984
CE109	CE3 <i>lps109::TnJ</i>	Sir ^r Km ^r Lps ⁻	Noel <i>et al.</i> 1984
CE110	CE3 <i>pur110::TnJ</i>	Sir ^r Km ^r Pur ⁻	Noel <i>et al.</i> 1984
CFN031	CE3 with a TnJ insertion	TMPD ⁺ Sir ^r Km ^r Cyt o ⁻	Soberón <i>et al.</i> 1990
CFN4202	CE3 with Mu-dI insertion	TMPD ⁻ Sir ^r Km ^r Cyt c ⁻	M. Soberón (Cuernavaca)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>			
AT42D	GM19023(pCFN42d)	Rif ^r Km ^r	Brom <i>et al.</i> 1988
AC991	GM19023(pNC206::pSM991.25)	Rif ^r Tc ^r	This study
Plasmids			
pCFN42d	pSym::TnJ <i>mob</i>		Brom <i>et al.</i> 1988
p42d.2210	pCFN42d <i>nifHa::Sp nifDb::Km</i>		Romero <i>et al.</i> 1988
pSM991.25	18.5 Kb from pSym containing <i>nod</i> regions I & II		Cevallos <i>et al.</i> 1989
pNC206	IncPI Cb ^r Km ^r		Vázquez <i>et al.</i> 1991 A. Pühler (Bielefeld)
cDNA Probes			
pGmENOD2	ENOD2 (Ngm-75) from soybean		Franassen <i>et al.</i> 1987
pNF-Lb01	Leghemoglobin (Lb) from common bean		Campos <i>et al.</i> 1987
pNF-N30-1	Member of Npv-30 family from common bean		Campos <i>et al.</i> 1987
pNF-UR07	Urease-II from common bean		Sánchez <i>et al.</i> 1987
pZm5Sr	5S rRNA from maize		V. Walbot (Stanford)

*Pur = purine; Lps = lipopolysaccharide; TMPD = N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine; Cyt = cytochrome.

Analysis of nodulation and nodule harvest. Nodulation was scored at varying times after inoculation. Nodule size, color, and proportion of infected zone were examined and compared to data from original references (Table 1). Sample nodules were checked for recovery of the appropriate strain as reported (Martínez *et al.* 1987). Two stages of development (12 and 21 days after inoculation) were selected to estimate relative levels of nodulin expression. Nodules were harvested and stored as described (Padilla *et al.* 1987).

RNA extraction. Total RNA was extracted from 10-day-old roots, 0.5-cm long root meristems, or nodules by grinding the respective tissue in liquid N₂. A guanidine-HCl/phenol procedure as described by Logeman *et al.* (1987) was used with minor modifications. After purification, total RNA was quantitated spectrophotometrically, diluted to 0.1 µg ml⁻¹ in 70% (v/v) ethanol and stored at -20° C until used.

cDNA probes and northern analysis. Nodulin cDNA clones used to probe nodule RNAs are described in Table 1. Northern blots were prepared by electrophoresis of 5 µg of RNA in 1.5% agarose gels containing 2.2 M formaldehyde as described (Campos *et al.* 1987). Gels were blotted onto nylon membranes (Hybond-N+, Amersham Corp., Arlington Heights, IL) by alkaline transfer as indicated by the supplier. To estimate nodulin transcript levels, up to 4 µg of RNA were denatured in formaldehyde and formamide at 55° C for 5 min and adjusted to 10× SSC (1× = 0.15 sodium chloride, 0.015 M sodium citrate, pH 7.0). Eight serial dilutions (ranging between 4 and 10⁻² µg of RNA) were applied by vacuum aspiration with a Slot-blot apparatus (Mani-Fold II, Schleicher and Schuell, Keene, NH). Purified inserts of cDNA clones were ³²P-labeled by Multi-Prime Extension (Du Pont, Wilmington,

DE), separated from free label, on which at least 0.5 × 10⁶ disintegrations per minute per slot were applied. Membranes were hybridized in the presence of 50% (v/v) formamide, in a rotating oven at 42° C (Bachofer, ~~location????~~) after hybridization they were subjected to high-stringency washings (0.1× SSC, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 65° C for 20 min, twice). Wet filters were exposed to X-ray film (Kodak) at -70° C with intensifying screens. Conditions of the manufacturer were followed for reprobing of filters.

Determination of relative level of nodulin transcripts. Two or three probes were assayed in the same filter series to exclude differences between them. Whole-root and root meristem RNA were used as negative controls. All lanes and slots were finally reprobed with a maize ribosomal cDNA clone, and the corresponding hybridization signals were used as internal standards. The intensity of spots in autoradiograms was quantitated with a Zenith 6R1 ID/2D Model Soft Laser scanning densitometer (Biomed Instruments, Inc., ~~location????~~). Two-dimensional images were integrated and, by linear regression analysis of the spot intensity vs. RNA dilution, the slope value was calculated for each eight-slot sample within the linear range. These values were normalized with their corresponding 5S rRNA levels for comparisons. Repetitions were averaged and relative increments/decrements of nodulin mRNA levels with respect to 21-day-old wild type nodules were plotted.

RESULTS AND DISCUSSION

In this report, we have used *Rhizobium* symbiotic mutants and *Agrobacterium* transconjugants to correlate distinct blockages of nodule development and the expression of indicative nodulin genes. This correlation is important to reveal particular conditions that regulate plant gene expression in *P. vulgaris* nodules, as has been defined in other systems (Fuller *et al.* 1984; Dickstein *et al.* 1988; Nap and Bisseling 1990).

Developmental expression of indicative nodulins. The size of these four nodulin transcripts in wild type common bean nodules is presented in Figure 1A. A single hybridization band (lane EN2) homologous to the soybean probe was observed, regardless of nodule age and inducing strain. The relative levels of all these mRNAs at 8-, 12-, 21-, and 30-day-old nodules were estimated by a slot-blot hybridization analysis of RNA dilutions (see Materials and Methods; Fig 1B). Maximal accumulation of all indicative nodulin mRNAs was observed at 30 days, except for the early nodulin ENOD2 (12 days). Moreover, the relative level at 8 days compared to maximum was, for ENOD2, 27%; uricase-II, 3.8%; Lb, 0.14%; and Npv-30, 0.015%. Thus, the kinetics of induction in wild type nodules indicates a distinctive temporal pattern for each nodulin.

Bacterial mutants and symbiotic phenotypes of nodules. All strains tested here were derived from the chromosomal background or pSym regions from *R. l. bv. phaseoli* strain CE3 (Noel *et al.* 84; Table 1). Symbiotic phenotypes of nodules formed by these strains were classified in four groups as presented in Table 2.

An *A. tumefaciens* strain carrying cloned *R. l. bv. phaseoli* nodule-inducing genes (Cevallos *et al.* 1989; Vazquez *et al.* 1991) failed to produce even pseudonodules. This result differs with respect to other *Rhizobium* spp. nod regions in this background in that they can induce empty nodules and early nodulins on their legume hosts (Covers *et al.* 1986; Dickstein *et al.* 1988; Nap and Bisseling 1990) In contrast, this same strain containing the entire pSym from CE3, does induce nodules with a low level of nitrogen fixation (Table 2; Brom *et al.* 1988). This suggests that other regions from pSym of *R. l. bv. phaseoli* strain CE3 are important to induce nodulation by *Agrobacterium*.

Group I includes noninfected (empty) nodules produced by three different strains (Table 1). These mutations have been shown to block bacterial invasion (Noel *et al.* 1986; Vandenbosch *et al.* 1985; M. Soberón, G. R. Aguilar, J. E. Padilla, and F. Sánchez, unpublished) and, as reported in other systems (Covers *et al.* 1986; Dickstein *et al.* 1988; Bisseling *et al.* 1990), transcription of ENOD2 is activated in connection to nodule organogenesis. Unexpectedly, uricase-II, considered as a late nodulin gene, was expressed in all these cases (see below), whereas Lb and Npv-30 mRNAs were undetectable (Fig. 2B).

Group II includes those phenotypes associated with limited infection or bacterial development (Table 2). The respiratory mutant CFN031 formed small and green nodules, containing few bacteroids (Soberón *et al.* 1990). The deficiency of cytochrome *c* in this strain was proposed to restrain the intracellular proliferation of bacteria, causing an interrupted development and premature senescence (Soberón *et al.* 1990). A purine auxotroph (CE106) of *R. l. bv. phaseoli* was reported as a noninfective mutant (Noel *et al.* 1984; Vandenbosch *et al.* 1985). In our hands, this strain produced small nodules with a "leaky" and delayed infection phenotype. The correct genetic markers were present in bacteria recovered from nodules (CE106N), but the appearance of revertants was not ruled out. Nodule development in plants inoculated with the transconjugant AT42D was noticeably delayed. Twelve-day-old nodules

were white and small; however, at 21 days various pink nodules showing low nitrogenase activity were present (Brom *et al.* 1988).

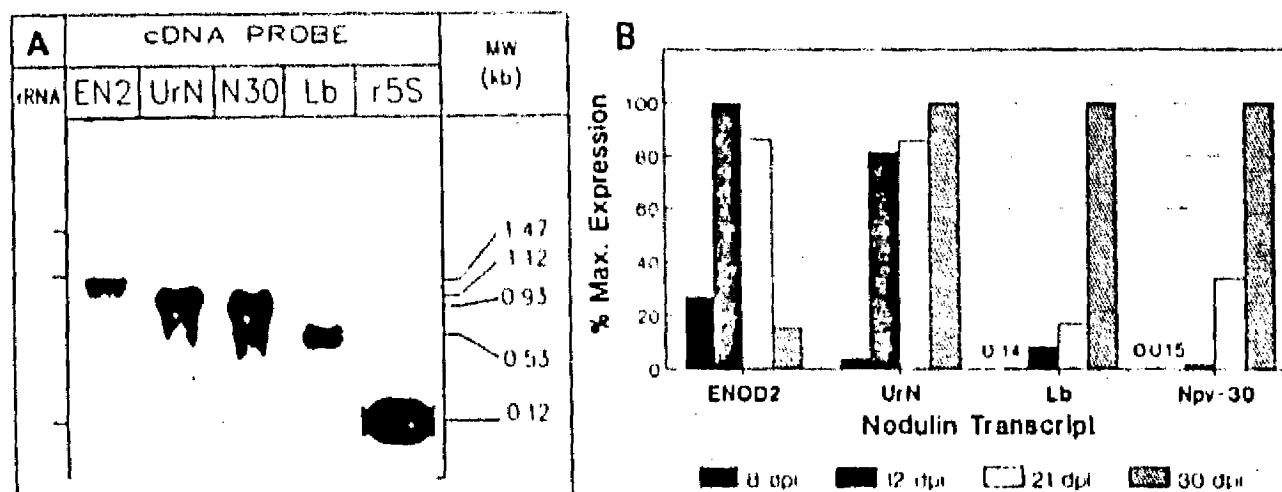


Fig. 1. Expression of four indicative nodulins from common bean nodules. A, Northern blot of 21-day-old wild type nodule RNA hybridized against the following cDNA probes (Table 1) ENOD2 (EN2), uricase-II (UrN), nodulin-30 (N30), leghemoglobin (Lb), and 5S ribosomal DNA (r5S). Position of rRNAs bands at left, estimated MW of nodulin transcripts at right. B, Developmental expression of four indicative nodulins. Relative levels were quantitated after scanning densitometry of autoradiograms from slot-blot hybridization of serial RNA dilutions (see Materials and Methods; Fig. 2B).

Table 2. Symbiotic phenotypes of mutant-induced nodules

Group	Aspect of nodules (days)	Strain	Symbiotic phenotype
0	No-nodulation	AC991	Nod ⁻
I	Empty nodules		
	Uninfected, white and small nodules (21)	CE109	Nod ⁺ Inf [±]
	Uninfected, white and small nodules (21)	CE110	Nod ⁺ Inf ⁻
II	Uninfected, white and small nodules (21)	CFN4202	Nod ⁺ Inf ⁻
	Arrested or slow development		
	Poorly infected, small and green nodules (15-25)	CFN031	Inf ⁺ Bad ⁻
	Small, white to light pink nodules (21)	CE106N [*]	Inf ⁺ Bad [±]
III	Delayed nodulation (8-18), pink nodules (21)	AT42D	Bad ⁺ Fix [±]
	Ineffective nodules		
	Half-sized (18), green and pink nodules (21)	JP32C	Bad [±] Fix ⁻
Control	Developed (18), large, pink nodules (21)	JP32F	Bad ⁺ Fix ⁻
	Developed (18), large, dark pink nodules (21)	CE330	Fix ⁺

* Designation used in this work (see text).

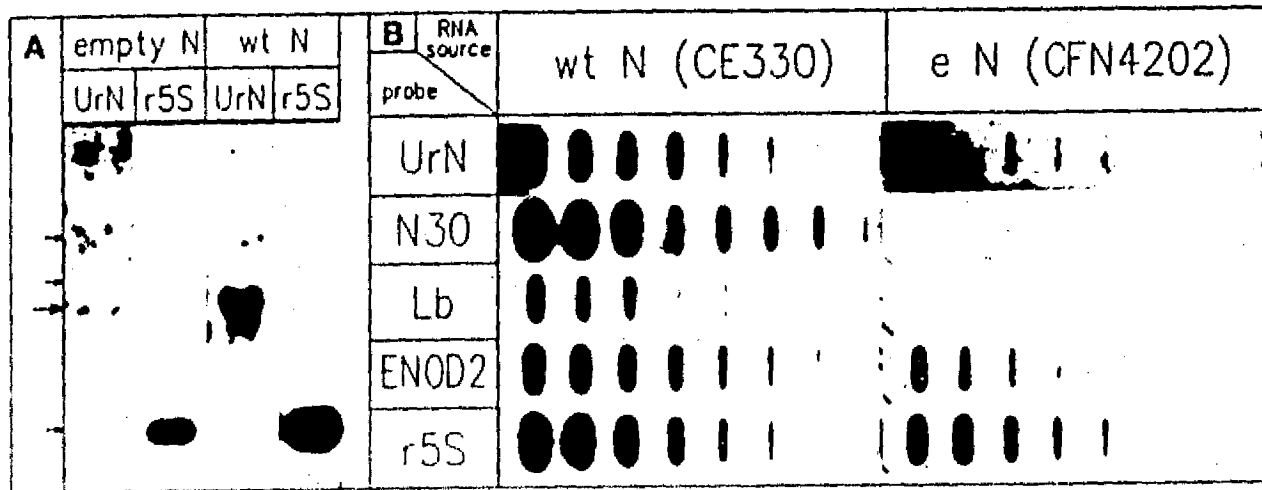


Fig. 2. Expression of uricase-II in noninfected nodules of *Phaseolus vulgaris*. Total RNA from empty nodules (eN) and wild type nodules (wtN) was separated by electrophoresis in denaturing conditions (A), or serial dilutions blotted by vacuum aspiration (B). Membranes were hybridized with the indicated ³²P-labeled probe and washed at high stringency. Arrows at left of A indicate position of ribosomal and uricase-II RNA bands; legends as in Figure 1.

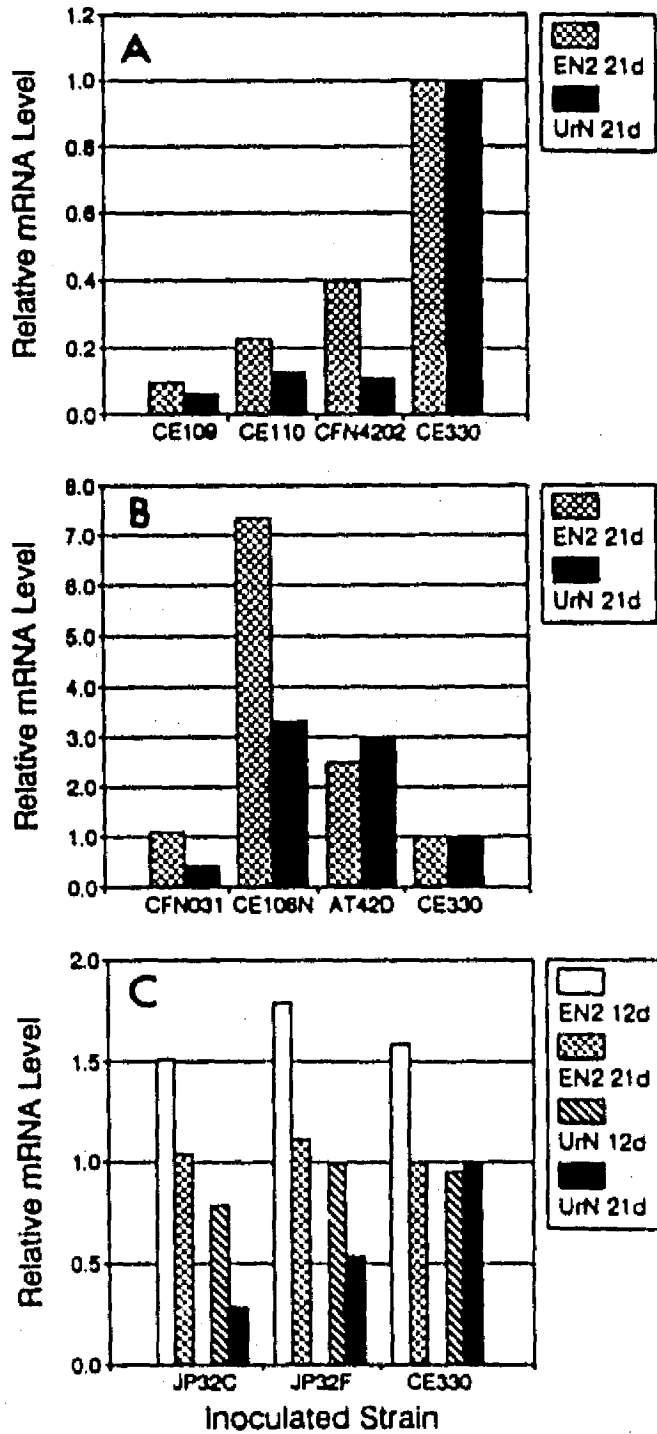


Fig. 3. Relative levels of ENOD2 (EN2) and uricase-II (UrN) mRNAs in mutant-induced nodules. A, Empty (group I); B, arrested or slow-developed (group II); and C, ineffective (group III) nodules. Nodulin mRNA levels were quantitated by densitometry of slot-blot hybridizations of RNA dilutions and were plotted with respect to the 21-day-old wild type (CE330) level.

In group III nodules, nitrogenase expression is blocked (Cevallos *et al.* 1989; Romero *et al.* 1988). At the initial stage, strains JP32C and JP32F induced normally developed nodules, but after 21 days, external differences with respect to wild type nodules were observed (Table 2).

Nodulin gene regulation in blocked nodulation. The expression of indicative nodulin genes in mutant-induced nodules were compared to those of wild type nodules at initial (12 days) and/or terminal (21 days) stages of development. Relative transcript levels are shown in Figures 3 and 4.

ENOD2 transcripts were found in empty nodules (Fig. 2B), but as judged by densitometry, they represent 10-40% of those from wild type nodules (Fig. 3A). This lower expression may reflect the incipient development of nodule parenchyma. The presence of uricase-II transcripts in empty nodules (Fig. 2B) was reproducibly detected. The band observed in northern blots showed the same size of uricase-II mRNA from wild type nodules (Fig. 2A; Sánchez *et al.* 1987). Previous studies on soybean nodules, postulated that uricase-II is expressed only in uninfected cells that differentiate after bacterial release and peroxisome biogenesis (Nguyen *et al.* 1985; Van den Bosch and Newcomb 1986). The absence or reduction of uricase-II antigen in soybean nodules lacking or containing few intracellular bacteria has supported this idea (Stanley *et al.* 1986; Morrison and Verma 1987). On the other hand, uricase-II was immunodetected in cells of the vascular parenchyma of effective nodules (Vaughan and Stegink 1987) and, additionally, marginal uricase-II activity was found in isolated cortex cells (Kohuchi *et al.* 1988). Thus, the observed basal expression (~10%) of uricase-II gene may be influenced by an initial differentiation of uninfected-type cells in nodule parenchyma, or by vascularization in the central zone, as observed in *P. vulgaris* empty nodules (Vandenbosch *et al.* 1985; Noel *et al.* 1986). Concerning regulatory conditions, it has been proposed that also the transport of uric acid from infected to uninfected cells is responsible for uricase-II synthesis (Nguyen *et al.* 1985). Because expression of this nodulin in common bean nodules occurs before nitrogen fixation and *de novo* ureide production (Sánchez *et al.* 1987), maybe other factors act as regulators of uricase-II transcription. Moreover, Larsen and Jochimsen (1987) showed that low levels of uricase-II synthesis were found in soybean callus tissue and sterile root cultures subjected to low O₂ levels, although no further evidence of oxygen control of uricase-II is available (Lyzell *et al.* 1990). *In situ* localization of uricase-II transcripts in empty nodules could further identify additional regulatory conditions.

Npy-10 mRNA was only observed in nodules from groups II and III (Fig. 4), indicating that the initial induction of this transcript requires the release of bacteria, similar to Lb and other late nodulins (Fuller *et al.* 1984; Verma *et al.* 1988; Nap and Bisseling 1990).

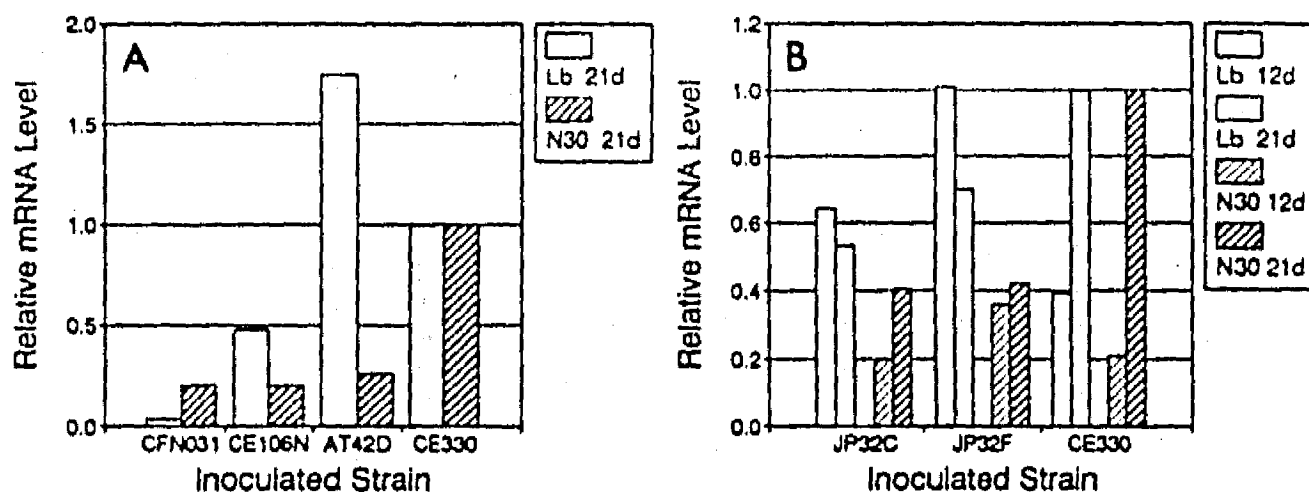


Fig. 4. Relative levels of leghemoglobin (Lb) and nodulin-30 (N30) mRNAs in mutant-induced nodules. A, arrested or slow-developed (group II), and B, ineffective (group III) nodules. Nodulin mRNA levels were quantitated by densitometry of slot-blot hybridization of RNA dilutions, and were plotted with respect to the 21-day-old wild type (CE330) level.

In group II nodules, three patterns of nodulin expression were found (Figs. 3B and 4A). 1) In CFN031-induced nodules, the terminal ENOD2 mRNA accumulation was unaffected by the arrest of development. However, the blockage of bacterial proliferation may parallel limited expression and degradation of late nodulin mRNAs in the central tissue. 2) In the nodules formed by "leaky" infection phenotype of CE106N, ENOD2, and uricase-II, transcripts were accumulated more than three times of the corresponding wild type levels, while Lb was present at 50% and Npv-30 at 20%; these were similar to the initial level found in CE330 nodules (not shown). 3) In nodules induced by AT42D, an accumulation of ENOD2, uricase-II, and also of Lb mRNA (2.5, 2.9, and 1.7 times, respectively) were detected. Npv-30 mRNA was accumulated at a very slow rate being almost undetectable at 12 days (less than 0.5%; data not shown). Thus, in slowly developed nodules, uncoupled accumulation of the early and late indicative nodulins suggests changes in dosage of cell types, and also that Npv-30 and Lb gene expression rely on different regulatory conditions (Fig. 4A).

In group III nodules, the temporal ENOD2 profile resembles that of the effective nodules (Fig. 3C). The other nodulins were expressed at similar or higher levels at 12 days, suggesting that blockages in initial nodule differentiation have not occurred. Further into 21 days, transcript levels decreased (uricase-II, Lb) or increased somewhat (Npv-30), but in all cases below the corresponding wild type amounts (Figs. 3C and 4B). It is likely that the subsequent accumulation of late nodulins, requires conditions derived from an active nitrogen fixation status (Fuller *et al.* 1984; Sánchez *et al.* 1991). This behavior is similar to the one observed for nodule GS from common bean (Cock *et al.* 1990).

We conclude from these results that the expression of uricase-II in empty nodules from *P. vulgaris* suggests the existence of regulatory conditions prior to bacterial release. Blockages in nodule development show that at least two events (nodule induction and bacterial release) are decisive for the initial induction of these nodulins. Nevertheless, the coordinated and accurate regulation may demand other steps involving multiple signals as revealed by data derived from arrested, slow-developed, and ineffective nodules. The effects of blocked development on nodulin transcript accumulation, in determinate nodules, could be explained in part by the characteristic mode of growth and differentiation of infected cells (Sprent 1989; Nap and Bisseling 1990). Morphological studies of nodulin expression in developing and mutant nodules are in progress.

of A

ACKNOWLEDGMENTS

We thank S. Moreno, F. Campos, L. Covarrubias, and R. M. Uribe for technical advice; Drs. M. Rocha-Sosa, M. A. Cevallos, A. Covarrubias, A. Alagu, and D. Romero for helpful discussions; and Dr. E. Calva for reviewing the manuscript. This work was partially supported by grants IN-208489 from DGAPA-UNAM; CII-0105-MEX from the EEC, and BNF-MX-6-8777 from the US NAS-BOSTID. J. Padilla and J. Miranda were supported by CONACyT fellowships.

LITERATURE CITED

- Appleby, C. A. 1984. Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35:443-478.
- Bergmann, H., Preddie, E., and Verma, D. P. S. 1983. Nodulin-35: A subunit of specific uricase (uricase II) induced and localized in the uninfected cells of soybean nodules. *EMBO J.* 12:2333-2339.
- Bisseling, T., Franssen, H., Govers, F., Horvath, B., Moerman, M., Scheres, B., van de Wiel, C., and Wei-Cai, Y. 1990. Early nodulins in pea and soybean nodule development. Pages 300-303 in: *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. Vol. 1. H. Hennecke and D. P. S. Verma, eds. Kluwer Academic. Dordrecht, Netherlands.
- Bron, S., Martínez, E., Dávila, G., and Palacios, R. 1988. Narrow- and broad-host-range symbiotic plasmids of *Rhizobium* spp. strains that nodulate *Phaseolus vulgaris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1280-1283.
- Campos, F., Padilla, J., Vázquez, M., Ortega, J. L., Enriquez, C., and Sánchez, F. 1987. Expression of nodule-specific genes in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Mol. Biol.* 9:521-532.
- Cevallos, M. A., Vázquez, M., Dávalos, A., Espin, G., Sepúlveda, J., and Quinto, C. 1989. Characterization of *Rhizobium phaseoli* Sym plasmid regions involved in nodule morphogenesis and host-range specificity. *Mol. Microbiol.* 3:879-889.
- Cock, J. M., Mould, R. M., Bennett, M. J., and Cullimore, J. V. 1990. Expression of glutamine synthetase genes in roots and nodules of *Phaseolus vulgaris* following changes in the ammonium supply and infection with various *Rhizobium* mutants. *Plant Mol. Biol.* 14:549-566.
- Dickstein, R., Bisseling, T., Reinhold, V. N., and Ausubel, F. M. 1988. Expression of nodule-specific genes in alfalfa root nodules blocked at an early stages of development. *Genes & Dev.* 2:677-687.
- Diebold, R., and Noel, K. D. 1989. *Rhizobium leguminosarum* exopolysaccharide mutants: Biochemical and genetic analysis and symbiotic behavior on three hosts. *J. Bacteriol.* 171:4821-4830.
- Dilworth, M., and Glenn, A. 1984. How does a legume nodule work? *TIBS* 9:519-532.
- Franssen, H. J., Nap, J. P., Gloudemans, T., Stiekema, W., Van Dam, H., Govers, F., ~~Moerman, M.~~, van Kammen, A., and Bisseling, T. 1987. Characterization of a cDNA for nodulin-75 of soybean: A gene product involved in early stages of nodule development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:4495-4499.
- Fuller, F., and Verma, D. P. S. 1984. Appearance and accumulation of nodulin mRNAs and their relationships to the effectiveness of root nodules. *Plant Mol. Biol.* 3:21-28.
- Govers, F., Moerman, M., Downie, J. A., Hooykaas, P., Franssen, H. J., ~~Moerman, M.~~, van Kammen, A., and Bisseling, T. 1986. *Rhizobium nod* genes are involved in inducing an early nodulin gene. *Nature*. (London) 323:564-566.
- Kouchi, H., Fukai, K., Katagiri, H., Minamisawa, K., and Tajima, S. 1988. Isolation and enzymological characterization of infected and uninfected cell protoplasts from root nodules of *Glycine max*. *Physiol. Plant.* 73:327-334.
- Larsen, K., and Jochimsen, B. U. 1986. Expression of nodule-specific uricase in soybean callus tissue is regulated by oxygen. *EMBO J.* 5:15-19.
- Logemann, J., Schell, J., and Willmitzer, L. 1987. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal. Biochem.* 163:16-20.
- Long, S. R. 1989. *Rhizobium*-legume nodulation: Life together in the underground. *Cell* 56:203-214.
- Lyrell, D. B., Hunt, S., Moloney, A. H. M., Fernando, S. M., and Díaz del Castillo, L. 1990. Physiological, metabolic and developmental implications of O₂ regulation in legume nodules. Pages 21-32 in: *Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives*. P. M. Gresshoff, L. E. Roth, G. Stacey, and W. E. Newton, eds. Chapman and Hall, New York.
- Martínez, E., Palacios, R., and Sánchez, F. 1987. Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. *J. Bacteriol.* 164:2828-2834.
- Morrison, N., and Verma, D. P. S. 1987. A block in the endocytosis of *Rhizobium* allows cellular differentiation in nodules but affects the expression of some peribacteroid membrane nodulins. *Plant Mol. Biol.* 9:185-196.
- Nap, J.-P., and Bisseling, T. 1990. Developmental biology of a plant-prokaryote symbiosis: The legume root-nodule. *Science* 250:948-954.
- Nguyen, T., Zelechowska, M., Foster, V., Bergmann, H., and Verma, D. P. S. 1985. Primary structure of the soybean nodulin-35 gene encoding uricase II localized in the peroxisomes of uninfected cells of nodules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:5040-5044.
- Noel, K. D., Diebold, R. J., Cava, J. R., and Brink, B. A. 1988. Rhizobial purine and pyrimidine auxotrophs: Nutrient supplementation, genetic analysis, and the symbiotic requirement for the novo purine biosynthesis. *Arch. Microbiol.* 149:499-506.
- Noel, K. D., Sánchez, A., Fernández, L., Leemans, J., and Cevallos, M. A. 1984. *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon TnJ insertions. *J. Bacteriol.* 158:148-155.
- Noel, K. D., Vandenbosch, K. A., and Kulpaca, B. 1986. Mutations in *Rhizobium phaseoli* that lead to arrested development of infection threads. *J. Bacteriol.* 168:1392-1401.
- Padilla, J. E., Campos, F., Conde, V., Lara, M., and Sánchez, F. 1987. Nodule-specific glutamine synthetase is expressed before the onset of nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Mol. Biol.* 9:65-74.
- Palacios, R., Quinto, C., de la Vega, H., Flores, M., Fernández, L., Hernández, M., Ballado, T., and Soberón, G. 1983. General organization of nitrogen fixation genes in *Rhizobium phaseoli*. Pages 164-168 in: *Molecular Genetics of Bacteria-Plant Interactions*. A. Puhler, ed. Springer-Verlag, Berlin.
- Romero, D., Singleton, P. W., Segovia, I., Moretti, E., Bohlool, B. B., Palacios, R., and Dávila, G. 1988. Effect of naturally occurring *nif* reiterations on symbiotic effectiveness in *Rhizobium phaseoli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:848-850.
- Sánchez, F., Campos, F., Padilla, J., Bonneville, J.-M., Enriquez, C., and Caput, D. 1987. Purification, cDNA cloning, and developmental expression of the nodule-specific uricase from *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* 84:1143-1147.
- Sánchez, F., Padilla, J. E., Pérez, H., and Lara, M. 1991. Control of nodulin genes in root-nodule development and metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 42:507-528.
- Scheres, B., van Engelen, F., van der Knaap, E., van de Wiel, C., van Kammen, A., and Bisseling, T. 1990. Sequential induction of nodulin gene expression in the developing pea nodule. *Plant Cell* 2:687-700.
- Soberón, M., Membrillo-Hernández, J., Aguilar, G. R., and Sánchez, F. 1990. Isolation of *Rhizobium phaseoli* TnJ-induced mutant with altered expression of cytochrome terminal oxidases *o* and *aa₃*. *J. Bacteriol.* 172:1676-1680.
- Sprent, J. L. 1989. Which steps are essential for the formation of functional legume nodules? *New Phytol.* 111:129-153.
- Stanley, J., Longtin, D., Madrzak, C., Verma, D. P. S. 1986. Genetic locus in *Rhizobium japonicum* (fredii) affecting soybean nodule differentiation. *J. Bacteriol.* 166:628-634.
- ~~Vandenbosch, K. A., and Newcomb, E. H. 1986. Immunogold localization of nodule-specific uricase in developing soybean root nodules. *Planta* 167:425-436.~~
- Vandenbosch, K. A., Noel, K. D., Kaneko, Y., and Newcomb, E. H. 1985. Nodule initiation elicited by noninfective mutants of *Rhizobium phaseoli*. *J. Bacteriol.* 162:950-959.
- van de Wiel, Scheres, B., Franssen, H., van Lierop, M.-J., van Lammeren, A., van Kammen, A., and Bisseling, T. 1990. The early nodulin transcript ENOD2 is located in the nodule parenchyma (inner cortex) of pea and soybean nodules. *EMBO J.* 9:1-7.
- Vaughn, K. C., and Stegink, S. J. 1987. Peroxisomes of soybean, *Glycine max*, root nodule vascular parenchyma cells contain a "nodule-specific" urate oxidase. *Physiol. Plant* 71:251-256.
- Vázquez, M., Dávalos, A., de las Peñas, A., Sánchez, F., and Quinto, C. 1991. A novel organization of the common nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* strains. *J. Bacteriol.* 173:1250-1258.
- Verma, D. P. S., Delauney, A. J. 1988. Root nodule symbiosis: Nodulins and nodulin genes. Pages 169-199 in: *Temporal and Spatial Regulation of Plant Genes*. D. P. S. Verma and R. Goldberg, eds. Springer-Verlag, Berlin.

IV. DISCUSION GENERAL

En esta sección se hace una revisión global del tema de tesis y de los datos publicados, en el contexto del área de investigación. Considerando la diversidad de sistemas simbióticos y enfoques experimentales, se han planteado varias hipótesis particulares que requieren un análisis sistemático dentro de este campo. Los siguientes incisos tienen esta intención³³.

1. PROCESOS Y FACTORES DE LA NODULACION.

El desarrollo del nódulo implica primeramente, la determinación gradual de un tipo de meristemo, que resulta en una serie de cambios en el patrón de división y crecimiento de las células corticales (morfogénesis); una expresión genética diferencial y una especialización fisiológica particular³⁴. El modelo más sencillo para plantear estos cambios, es una cadena de eventos secuenciales cuya causalidad está conectada linealmente. En el caso del nódulo, se debe considerar que la interacción de dos organismos implica una acción recíproca y múltiple de varias condiciones en su desarrollo³⁵.

La disección del proceso, ha requerido de estrategias para interrumpir o desacoplar algunos eventos a fin de saber cuáles de ellos son dependientes; o alternativamente, qué procesos son endógenos y cuáles inducibles. De paso, se puede postular la necesidad de factores comunes o particulares para la ocurrencia de cada evento³⁶. Estas estrategias distinguen por supuesto dos niveles: control genético y ambiental. En este sentido y considerando la contribución de la planta, se han descrito líneas y mutantes vegetales incapaces de iniciar o de formar nódulos efectivos en varias especies. Los genotipos analizados muestran distintos bloqueos del desarrollo, desde las etapas tempranas (reconocimiento), hasta el aspecto funcional (fijación deficiente), o también anomalías en la regulación (supernodulantes)³⁷. En frijol, existen ejemplos de genotipos similares, pero aún no han sido suficientemente caracterizados para entender el papel de los alelos respectivos en la capacidad simbiótica³⁸. Por el otro lado, la correlación entre la presencia y función de varios genes bacterianos sobre la expresión y diferenciación del nódulo, ha permitido tener una aproximación más precisa de las condiciones que inducen procesos (fenotipos) bien determinados.

2. MUTACIONES Y FENOTIPO SIMBIOTICO: inducción o modulación de procesos del desarrollo vegetal por la bacteria.

En nuestro sistema hemos adoptado la definición de fenotipos simbióticos que permiten seguir el desarrollo, considerando la aparición de determinadas estructuras y funciones celulares. A partir de la nomenclatura actual³⁹, se discuten aquellos que se refieren a la organogénesis (Nod, Noi), la infección (Inf, Bar),

el desarrollo del nódulo (Bad, Ndv) y finalmente, la aparición de actividad de nitrogenasa (Fix).

2.1. ORGANOGÉNESIS DEL NÓDULO.

Tal y como se entiende en la actualidad, este proceso implica la formación de un meristemo, previa rediferenciación de una parte del córtex radicular. Se ha demostrado que ciertos factores bacterianos —oligosacáridos específicos y difusibles, producidos o modificados por acción de genes *nod*—, son capaces de inducir la organogénesis, independientemente de que por otras causas las bacterias sean incapaces de invadir la planta⁴⁰. No obstante, la presencia de pseudoinfecciones en raíces de alfalfa y soya, sugiere que este primer proceso puede ser iniciado de manera endógena en la planta y que la infección y penetración bacterianas, parecen potenciar el desarrollo de este foco de división celular⁴¹. El hecho de que las pseudoinfecciones se localizan en lugares determinados respecto del haz vascular (adyacentes a polos del xilema), indica además una posible relación con gradientes morfogénéticos (información posicional); más aún, su aparición y desarrollo están controlados por mecanismos similares a los que limitan el número de nódulos por planta⁴². De manera definitiva, el reporte de nodulación espontánea, implica un programa endógeno para la inducción de estas estructuras⁴³. Podemos considerar por tanto, que la inducción del nódulo está muy relacionada con procesos del desarrollo radicular⁴⁴. Ahora bien, una característica que distingue la organogénesis de nódulos de por ejemplo, raíces secundarias, es el efecto inhibitorio del ión nitrato en el primer caso. Esto ha permitido discriminar la especificidad de algunos factores capaces de generar 'noduloides'⁴⁵. Dos factores específicos de nodulación aislados de *Rhizobium* (NodRm-1 y NodRm-2) son capaces de promover la organogénesis y la expresión de nodulinas tempranas en alfalfa y chícharo, respectivamente⁴⁶. Otros compuestos como el TIBA, NPA y dos tipos de flavonoides son también efectivos en alfalfa, pero, inducen estructuras equivalentes insensibles a la inhibición por nitrato, lo que sugiere que en ambos procesos no operan mecanismos idénticos⁴⁷.

La influencia de fitorreguladores en la inducción de nódulos, se ha sustentado dado que algunos genes bacterianos implicados en su síntesis pueden complementar funcionalmente a otros 'genes simbióticos' en la inducción de divisiones corticales⁴⁸. Se ha postulado que estos factores inductores, alteran el balance local de fitohormonas y/o actúan directamente como señales, promoviendo cambios en el patrón de desarrollo⁴⁹. Tres de las mutantes utilizadas aquí, fueron incapaces de infectar, aunque seguramente producen tales compuestos. Estas cepas permiten analizar, en consecuencia, la diferenciación y expresión génica de nódulos 'vacíos' de tipo determinado⁵⁰. Considerando un enfoque alternativo, no conocemos estudios sobre ocurrencia de pseudoinfecciones o nódulos espontáneos en frijol, pero se ha sugerido que en las variedades comerciales, los efectos de la domesticación y manipulación genética podrían

actuar como una contra-selección de características consideradas como 'silvestres' en otros cultivares⁵¹.

2.2. INFECCION.

El grupo de procesos y condiciones que conducen a la penetración y el alojamiento de bacterias en las células nodulares es muy extenso para discutirse aquí. No obstante, conviene puntualizar aspectos acerca de los efectos de algunas mutantes bacterianas sobre el desarrollo de esta etapa. Estos efectos —considerando la información disponible, pueden ser divididos en tres grupos: (a) bloqueos por activación y/o sensibilidad al mecanismo de defensa, (b) bloqueos por insuficiencias metabólicas y (c) otros bloqueos causados por alteraciones en señales moleculares esenciales para la simbiosis.

Para abordar el primer caso, partimos de la hipótesis de que Rhizobium, —un parásito refinado— es capaz de evadir los mecanismos de defensa de la planta, ya sea a través de neutralizarlos activamente, o bien por medio de determinantes de superficie que (enmascarando a otros), evitan la acción del sistema referido. Algunos autores sugieren la participación de polisacáridos superficiales y sus derivados⁵². Se ha reportado que en nódulos inducidos por cepas inefectivas y agrobacterias nodulantes, se incrementan los niveles de fitoalexinas⁵³ o alternativamente, de las enzimas involucradas en su síntesis⁵⁴, por lo que es importante discriminar estos efectos sobre el desarrollo y expresión. Es importante mencionar además, que la membrana peribacteroidal (PBM), representa posiblemente un modo especial de mantener a la bacteria aislada 'dentro' de la planta, evadiendo la defensa. Si alguna mutación influye sobre el mecanismo de síntesis/ensamblaje de los componentes de esta barrera, seguramente determinará otra causa de interrupción del proceso. Como las transconjugantes de Agrobacterium con el pSim completo de cepas silvestres de R. phaseoli inducen nódulos con fijación deficiente, suponemos que la incapacidad de la cepa AC991 para nodular frijol radica probablemente, en un fragmento del plásmido simbiótico correspondiente, que podría contener algunos genes relacionados con determinantes de superficie u otras señales específicas⁵⁵.

El segundo efecto sobre el desarrollo del nódulo — insuficiencia metabólica, se refiere a la incapacidad de ciertas mutantes para infectar con la rapidez o el nivel normales, dado que el defecto genético respectivo propicia que algún nutriente o factor sea limitante para el crecimiento. Este puede ser el caso de la cepa CFN031, la que por alteraciones en la actividad del citocromo c, es incapaz de proliferar dentro de las células del nódulo, dando como consecuencia la restricción o detención de pasos subsecuentes de la nodulación. Esta mutante permite entonces discriminar el efecto de un bloqueo del desarrollo posterior a la infección intracelular.

El comportamiento de la mutante CE106 nos fué especialmente

útil: aunque fué aislada como mutante $Nod^+ Inf^-$ auxótrofa de purinas, esta cepa mostró un fenotipo de infección 'de escape' (leaky) reproducible en nuestro sistema. La posibilidad de complemtación por metabolitos de la raíz o de reversión, aún no es clara⁵⁶; de cualquier modo, nos dió la oportunidad de analizar el efecto de una infección lenta o escasa sobre la coordinación de los eventos de diferenciación y expresión de nodulinas. El caso de la cepa AT42D merece mención especial, dado que no obstante ser capaz de completar todos los pasos hasta la fijación simbiótica de nitrógeno, su cinética de nodulación es muy lenta. El tercer tipo de bloqueos corresponden a genotipos/fenotipos poco caracterizados o pleiotrópicos y no serán discutidos aquí.

2.3. DESARROLLO POSTERIOR DEL NODULO E INICIO DE LA FIJACION DE NITROGENO.

La diferenciación del tejido central en células infectadas y otras no invadidas por bacterias, define claramente dos compartimentos donde se establecen —claramente en nódulos determinados⁵⁷, procesos metabólicos complementarios de la fijación de nitrógeno. Además, el inicio de la fijación de nitrógeno ocurre mientras en varias células prosigue el crecimiento y por tanto, aquel proceso debe afectar la maduración total de la zona central. En el interin el meristemo ha desaparecido y otras capas celulares fueron diferenciándose. Entre otros, los haces vasculares periféricos, una capa cortical (al exterior e interior de la endodermis) que rodea a la zona central, y estructuras lenticulares en la parte exterior, establecen grosso modo los tejidos característicos en este órgano.

Para establecer una enfoque morfofisiológico de esta etapa del desarrollo, habrá que decir que la diferenciación se relaciona con un cambio radical en el manejo de varios nutrimentos: (a) el nódulo será la entrada preferencial de nitrógeno y donde tendrá que ser asimilado en diversos tipos de compuestos de exportación (ureidos en este caso); (b) el fotosintato será utilizado, en un primer momento para el crecimiento del nódulo y luego, en la etapa de madurez, para suministrar energía, electrones y esqueletos necesarios para la fijación y asimilación de nitrógeno en condiciones microaerofilicas. El oxígeno entretanto, estará accesible en concentraciones muy bajas, tanto por efecto de una barrera cortical de difusión, como por la unión con hemoproteínas solubles (Lb's) en el citosol de las células infectadas. Bajo estas condiciones al interior del nódulo, las bacterias se han diferenciado en un estado endosimbiótico, activando varios sistemas génicos que les permiten sintetizar nitrogenasa, incorporar y oxidar principalmente ácidos orgánicos, inhibir una parte importante de la asimilación de amonio, y respirar utilizando vías alternas del transporte de electrones. Si alguna mutación impide la síntesis de la nitrogenasa⁵⁸, la mayoría de los flujos metabólicos serán suspendidos o alterados, pero podremos distinguir que parte y nivel de los componentes que los hacen posibles, habían sido establecidos con anterioridad.

3. FENOTIPO Y EXPRESION DE NODULINAS: correlaciones causales

3.1. EXPRESION TEMPRANA.

Además de las características distintivas mencionadas, la inducción de nódulos se asocia a la expresión de la nodulina ENOD2 en todos los sistemas simbióticos estudiados⁵⁹. Otro grupo de nodulinas equivalentes (como PTV) también se induce en algunos sistemas, pero su regulación es un poco más heterogénea (i.e. Nps-40' en chícharo, Nvs-40 en veza y Nms-30 en alfalfa)⁶⁰. En frijol no se han identificado productos similares, pero existen varios candidatos entre los PTV descritos⁶¹. Todavía no es claro si en otros sistemas la organogénesis está asociada con la expresión de nodulinas homólogas a PsenOD5 y PsenOD12 de chícharo, pero en tal caso serían, junto con las clonas anteriores, buenos marcadores para ensayar varios tipos de señales bacterianas⁶². Tomando en cuenta lo anterior, la expresión de ENOD2 en nódulos vacíos de frijol era predecible. Sin embargo, en trabajos similares al presente se reporta su expresión, pero no su nivel relativo⁶³; en nuestro caso (y con las tres mutantes) el nivel oscila alrededor del 30%. Ya que ENOD2 se expresa en asociación con la formación de la capa cortical interna, hemos concluido que si el desarrollo de este tejido es incipiente, la expresión de ENOD2 será limitada. Esto sugiere que existe un segundo nivel de regulación mediado por la infección o el desarrollo del tejido central, tal y como ocurre con otra nodulina (Nms-22) expresada en el parénquima de nódulos de alfalfa⁶⁴. En una sección posterior se discuten datos e ideas sobre los factores regulatorios de ENOD2.

La expresión basal del gen de uricasa-II en tres casos de nódulos vacíos de frijol, puede también representar un indicador particular de la organogénesis. No obstante, es importante estudiar la posibilidad de desacoplar los dos eventos por efecto de otras mutantes, con factores bacterianos o condiciones fisiológicas. Asimismo, conocer el lugar de síntesis del transcrito en nódulos vacíos, permitirá confirmar algunas hipótesis sobre su regulación⁶⁵.

3.2. EXPRESION POR INFECCION.

La aparición del resto de las nodulinas tardías ocurrió con posterioridad a la infección (liberación) intracelular, aunque la cinética de acumulación de transcritos fue variable. Para discutir la interpretación de estos efectos, conviene mencionar que los fenotipos relacionados con la infección y desarrollo del nódulo pueden prestarse a ambigüedad. Frecuentemente no se consideran parámetros cuantitativos (cantidad y estado de desarrollo del bacterioide, tamaño de las células, vacuolización, etc.). Además, existe una gran diversidad de genes bacterianos involucrados en estos eventos⁶⁶. A pesar de ello, está claro que la expresión de nodulinas tardías, requieren algún tipo de señal, activada o disponible durante el proceso de lisis de la

pared vegetal y la endocitosis. Varios reportes sugieren además, que esta activación puede estar mediada por múltiples señales, atendiendo al efecto de desacoplar de forma diferencial la expresión de algunas nodulinas, dependiendo del genotipo bacteriano⁶⁷.

En nuestro caso, observamos un efecto de acumulación diferencial de transcritos de dos nodulinas, usando mutantes que producían una infección escasa o lenta. Por ahora concluimos que el retraso en la aparición y/o maduración de las células infectadas, desacopla la expresión de nodulinas tempranas y tardías que se expresan en distintos tipos celulares. Estos resultados también sugieren que la regulación de Lb y Npv-30 — transcritas probablemente en las mismas células — debe ser mediado por factores distintos⁶⁸. Las interpretaciones anteriores se sustentan en evidencia indirecta; en todo caso, es necesario determinar con más precisión el nivel de infección, el estado de desarrollo de los bacteroides y considerar otros marcadores para discriminar efectos múltiples. Un marco de comparación podría establecerse por la correlación entre el tipo de bacteroides y la zonificación temporal del nódulo, como se ha hecho con alfalfa en un estudio reciente⁶⁹.

3.3. EXPRESION EN NODULOS INEFECTIVOS.

El nivel de expresión de nodulinas asociada con la FSN, es resultado de un efecto múltiple y acoplado de otros mecanismos previamente funcionales, con el estado metabólico producido por la entrada de nitrógeno al sistema. Para discriminar el efecto de la actividad de la nitrogenasa per se, usamos una mutante Fix⁻ alterada exclusivamente en los genes estructurales de nitrogenasa. Nuestros resultados muestran nuevamente una inducción inicial de nodulinas tardías independiente del amonio producido simbióticamente; también que en ausencia de esta actividad, se bloquea el incremento subsiguiente en la transcripción de varias nodulinas.

Estos dos modos de regulación se han observado en varios sistemas utilizando los genes de GS y Lb como modelos, pero poco se conoce sobre los mecanismos o factores involucrados. En la búsqueda de condiciones que mimetizen o regulen el efecto de la fijación efectiva, se han encontrado respuestas interesantes, tanto en la expresión genética, en la fisiología y en la diferenciación de nódulo (p.ej.: amonio exógeno, atmósferas de argón, suministro de fotosintato y CO₂, presión de oxígeno), y están discutidos en otro lado⁷⁰.

4. EXPRESION DE NODULINAS Y MECANISMOS REGULATORIOS: efectores del desarrollo, metabólicos y ambientales.

A partir de nuestros resultados, se ha podido confirmar y ampliar las hipótesis sobre las condiciones o factores que median la regulación de estas cuatro nodulinas.

4.1. REGULACION DE ENOD2.

Este transcrito, expresado en células que se diferencian tempranamente y cuyo producto tiene presumiblemente una localización extracelular (componente de la pared vegetal), representa un grupo especial de las nodulinas 'estructurales'⁷¹. Nuestros resultados sustentan la estrecha asociación de la expresión de ENOD2 con la organogénesis, pero también sugieren dos ideas adicionales: (1) El hecho que los niveles del transcrito correspondiente estén reducidos en nódulos vacíos, y que alcancen un nivel normal en nódulos bloqueados después de la infección intracelular, pone de manifiesto que sí existen condiciones del desarrollo posterior del nódulo que alteran la expresión de ENOD2. Si este gen se expresa en nódulos espontáneos y en los inducidos químicamente (probablemente por desbalances del gradiente morfogénico), su regulación podría ser mediada por fitohormonas. Recientemente se reportó la influencia de citocininas y de anaerobiosis en la activación del promotor de ENOD2 de Sesbania rostrata en plantas transgénicas conteniendo fusiones quiméricas del gen⁷². De acuerdo con esto, el control hormonal sería mediado por factores bacterianos difusibles y el segundo por una condición asociada con la infección y/o desarrollo del tejido central (¿disminución de pO₂ interna?).

Por otro lado, la acumulación del transcrito en nodulación lenta, nos lleva a suponer que la diferenciación retrasada o anómala de células infectadas deriva en una proporción mayor de células corticales, donde el ARNm de ENOD2 estaría sobrerrepresentado —al igual que el de uricasa-II— en la población de mensajeros totales del nódulo. No se puede descartar que alguna señal específica pudiera estar también sobreacumulada. El análisis por hibridación in situ en nódulos anómalos ayudará a deslindar entre esta u otra alternativa.

4.2. REGULACION DE LA URICASA-II EN FRIJOL.

La inducción de esta proteína ha sido estudiada atendiendo a su naturaleza nódulo-específica, y porque se detecta preferencialmente en las células no infectadas donde es sintetizada en polisomas libres, introduciéndose a peroxisomas sin modificaciones postraduccionales⁷³. En principio, parece ser que por su localización, la inducción inicial de esta enzima no requiere de señales directas de la bacteria. Nuestros resultados sugieren que tampoco es estrictamente necesario algún factor derivada de la liberación bacteriana, aunque sí es claro un efecto acumulativo de la infección y de la fijación efectiva.

Estudios sobre la regulación de uricasa-II de soya, muestran que el la región 5' respectiva fusionada al gen cat, dirige una expresión constitutiva en células transformadas de levadura; bajo el promotor 35S del CaMV la secuencia codificadora no se expresa en plantas transgénicas de tabaco y sin embargo, la enzima puede ser expresada, ensamblada en tetrámeros y funcionar en E. coli cuando el gene es fusionado al promotor de lacZ⁷⁴. Esto sugiere

varios niveles de regulación dependientes de activadores/represores específicos sobre la región de control y de regiones internas del polipéptido importantes en su estabilidad. Adicionalmente, se ha estudiado cuál es el mecanismo por el que una baja pO_2 induce su expresión en raíces⁷⁵.

Con este panorama⁷⁶, proponemos que la expresión basal del gen de uricasa-II en los nódulos de frijol, puede ocurrir antes de la diferenciación de células no infectadas; que esta inducción probablemente está mediada por condiciones de microaerobiosis parcial y/o asociada con la vascularización del tejido. Mas aún, considerando su actividad (urato oxidasa), su presencia en tejido no-infectado y su patrón de expresión durante el desarrollo (especialmente si es lento), sugerimos también que puede participar como un mecanismo alternativo para el control del nivel de oxígeno dentro del nódulo. El estudio inmunocitológico de nódulos inducidos por mutantes y bajo condiciones modificadas de O_2 externo, pueden ser un camino para encontrar apoyo a estas hipótesis.

4.3. REGULACION DE LA LEGHEMOGLOBINA.

Los mecanismos que controlan la expresión de este transportador de O_2 , tanto por su abundancia, sus isoformas y su naturaleza de proteína 'simbiótica' han sido estudiados a varios niveles⁷⁷. Conviene mencionar dos enfoques: (a) el efecto de mutantes bacterianas, y (b) datos derivados del estudio de elementos cis-activos y factores trans-activadores.

Del primer caso sabemos que el papel del grupo hemo bacteriano no es necesariamente común a todos los sistemas, ya que en alfalfa las mutantes en genes de la síntesis de hemo no inducen la Lb, mientras que en soya inoculada con el tipo equivalente de bacterias, la planta acumula la apoproteína y puede además proveer el hemo necesario para ser ensamblado a la globina⁷⁸. Además, un análisis de expresión de genes quiméricos de Lb de soya en levadura, ha sugerido que el hemo participa como un activador traduccional.

Por otro lado, datos obtenidos con fusiones del gen lbc₃ de soya con uidA introducidas en Lotus corniculatus (trébol pata de pájaro), indican que distintas secuencias interdependientes en la región de control de Lb influyen directamente el nivel, la cinética y la especificidad de la expresión de este gen en nódulos⁷⁹. Lo más controversial por el momento, es la posibilidad de que, aparte del hemo y de factores trans-activadores vegetales, existan otros elementos de origen bacteriano que regulen la expresión de Lb⁸⁰.

Según datos de localización in situ en nódulos indeterminados, el punto de máxima transcripción de Lb es una región delimitada donde aún no hay fijación de nitrógeno, pero que está adyacente a la zona donde ésta comienza⁸¹. En nódulos de frijol producidos por un Agrobacterium con plásmido simbiótico,

se detecta la acumulación del mensajero de Lb y una fijación marginal de N_2 . Esto sugiere que el desarrollo lento promovido por esta cepa, puede generar un estado de diferenciación de las células infectadas equivalente a la región arriba mencionada (interzona II-III). Esto habrá de verificarse con ayuda de marcadores fenotípicos adecuados al modelo de nódulos determinados.

4.4. REGULACION DE LA NODULINA-30.

La identidad de esta nodulina de frijol —un transcrito abundante cuyo producto nativo no ha sido aún localizado—, fué conocida gracias al análisis de secuencia. En este momento sabemos que comparte regiones de homología con otra familia multigénica de nodulinas, considerablemente expresadas y más caracterizadas en soya⁸².

Independientemente de lo anterior, se puede afirmar que se comporta como nodulina tardía, es decir, se expresa en asociación al fenotipo Bar⁺; en nódulos inefectivos se induce inicialmente a niveles normales, pero no se incrementa si el desarrollo se retrasa o en ausencia de fijación de nitrógeno. Al no encontrar acumulación de transcritos bajo el efecto de alguna mutación y considerando su cinética de expresión, concluimos que tiene un segundo requerimiento estrechamente asociado con la condición diazotrófica del nódulo; por ejemplo, algún metabolito que sólo se sintetiza (¿o requiere?) cuando el bacteroide fija activamente nitrógeno. Esta condición o factor pudiera ser además, diferente a las involucradas con la regulación de Lb. Después de analizar la regulación de fusiones génicas de Npv-30 en plantas transformadas y la inmunolocalización del producto en el nódulo, podrán establecerse hipótesis o explicaciones mejor fundamentadas⁸³.

4.5. REGULACION DE OTRAS NODULINAS.

Un aspecto interesante sobre la regulación de enzimas de nódulo, en particular de GS, difiere de los efectos más conocidos. Se ha reportado un aumento en fijación de nitrógeno y crecimiento vegetativo de plantas noduladas de alfalfa por la infección con un patógeno (Pseudomonas syringae pv. 'tabacci') que produce la tabtoxinina β -lactam. Esta molécula inhibe la actividad de las GS de una manera diferencial: se une irreversiblemente a la GS presente en raíces y nódulos (Gsr); mientras que la GS incrementada en nódulos (GSn) es insensible. Aparentemente, al modificar el patrón de recambio de GS (el complejo enzima-toxina es resistente a degradación), se altera la regulación de tal modo que se observa un incremento diferencial en las isozimas⁸⁴. En analogía con este caso, surge la posibilidad de que algunos metabolitos bacterianos (¿rhizotoxininas?) actúen como inhibidores selectivos de ciertas enzimas, de tal forma que conformaran un mecanismo indirecto de regulación y selección de isoformas específicas de nódulo.

5. NIVELES Y COMPONENTES DE CONTROL: importancia de un modelo para nodulación.

Para establecer un modelo que permita estudiar la asociación simbiótica de una forma sistemática, es necesario comprender algunos niveles y componentes de este complejo biológico. Los datos globales sobre expresión de nodulinas y diferenciación celular sugieren, en un primer nivel, el funcionamiento de un programa morfogenético de la planta, pero también que la infección de raíces por *Rhizobium* inicia un intercambio gradual y coordinado de señales moleculares. Estos factores modulan procesos potenciales de diferenciación, propios de la planta, mimetizando o potenciando a las señales originales, o bien, activando procesos específicos. La identificación de muchas de estas moléculas-sígnal se logrará a través del aislamiento, bioensayo y caracterización química de algunas fracciones del nódulo. El tipo de bioensayo deberá contar con un enfoque histoquímico (inmunodetección e hibridación *in situ*) y genético (mutantes bacterianas, plantas transgénicas) para correlacionar —en el tejido mismo— la presencia de señales, la inducción secuencial de nodulinas y la diferenciación celular.

Los cambios posteriores a la organogénesis del nódulo, ocurren principalmente por la penetración de las bacterias a las células vegetales, es decir, cuando se establece otro nivel de control. Por ello, es importante conocer factores derivados de la liberación bacteriana (fenotipo Bar), por lo que se han sugerido como candidatos a varias macromoléculas presentes en la matriz del hilo de infección (glucoproteínas, polisacáridos externos o capsulares) o aún moléculas pequeñas⁸⁵. Después de la infección intracelular, estos factores estarían solamente limitados por una membrana lipídica y no por la pared celular; es posible que así entren en contacto con varios receptores y/o efectores de la célula vegetal.

Considerando el origen del 'programa' de la planta, la propuesta más común es que el nódulo representa una modificación de las raíces por la condición simbiótica; no obstante, otros autores sugieren que pudiera derivarse de una estructura (¿vestigial?) de almacenamiento de carbono (como almidón) en limitación de nitrógeno⁸⁶ y que fue seleccionada como un nicho especial por bacterias de la rizósfera. Aunque el nódulo se origina y crece a costa de las reservas de la planta, adquiere más adelante características similares a otros órganos 'fuente' (i.e. cotiledones en germinación) cuando fija y exporta activamente nitrógeno, dado que en que ambos órganos se comparten enzimas y metabolitos específicos⁸⁷. En este sentido, no hay evidencias insalvables —falta estudiar más la uricasa-II— para descartar que los genes nodulinas se derivan de otros preexistentes⁸⁸. Un aspecto especial de las nodulinas radica en su semejanza inmunológica con proteínas inducidas por la infección por micorrizas (micorrizinas), que sugiere la existencia de un 'paquete' básico de proteínas requeridos para

funciones estructurales y/o metabólicos de tales interacciones⁸⁹.

Para integrar otros componentes en un modelo de control de esta interacción, se debe considerar un cúmulo de hipótesis sobre el origen, funcionamiento y potencialidades de los mecanismos de la bacteria para, por ejemplo: aprovechar exudados de la planta (flavonoides) e inducir resistencia a fitoalexinas; para producir compuestos morfogénicos, inhibir los mecanismos de defensa de la planta e infectar intracelularmente algunas células del nódulo. La estrategia de la planta, por otro lado, se contempla como una adecuación de algún proceso del desarrollo radicular para disponer temporalmente de una fuente 'endógena' de nitrógeno, pero desarrollando otros mecanismos para controlar un patógeno potencial; es decir, confinándolo en un compartimento lítico atenuado, limitando su consumo de oxígeno, regulando de alguna manera la cantidad de biomasa bacteriana soportable o aislando el tejido infectado, etc.

La comparación entre los modelos de nodulación de leguminosas, de no-leguminosas como Parasponia (Ulmaceae) e inclusive de 'nodulación inducida' en arroz, trigo y nabo, sugieren algunos procesos esenciales y un potencial en otros vegetales para inducir 'noduloides'⁹⁰. Si los rhizobia son capaces de inducir este proceso de manera controlada o eficiente, es importante conocer el conjunto de señales, factores y condiciones relevantes de cada nivel para hacerlos susceptibles de manipulación.

V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

1. La expresión de transcritos de nodulinas durante el desarrollo de nódulos de frijol, es un modelo adecuado para estudiar aspectos de regulación genética en plantas. La correlación de esta expresión con la diferenciación de nódulos con desarrollo anómalo permite identificar varias condiciones regulatorias.
2. Los marcadores moleculares elegidos (nodulinas indicativas) representan tipos de regulación distintos, por su cinética de expresión, localización y comportamiento en nodulación anómala. En frijol, se continúa trabajando sobre dos de ellas (Npv-30 y uricasa-II) y otras nodulinas tempranas⁹¹
3. Las mutantes bacterianas utilizadas producen bloqueos tempranos y tardíos del desarrollo, mostrando una variedad de fenotipos agrupados en tres o cuatro tipos. Las mutaciones producen la alteración de señales o factores que participan en la diferenciación celular y la expresión genética. Otras mutantes permitirían disectar más finamente algunos eventos o alternativamente, podrían ser caracterizadas con este sistema.
4. En nódulos vacíos se expresan una nodulina asociada a organogénesis (ENOD2) y si hay infección, las nodulinas tardías; en nódulos con desarrollo detenido o lento se desacoplan los patrones de expresión y en nódulos inefectivos, se detecta una inducción inicial normal en ausencia de la condición diazotrófica en el nódulo. Esta variación de los niveles relativos de expresión sugieren múltiples condiciones de regulación en distintos pasos del desarrollo.
5. Uricasa-II se expresa en nódulos vacíos. Esto sugiere que existen condiciones de regulación de este gen previas a la infección bacteriana. Aún no es claro cuáles puedan ser las condiciones responsables de la inducción inicial, pero se ha sugerido aquí la participación de factores del desarrollo y de una microaerobiosis local. Estudios de expresión con factores bacterianos y de localización in situ permitirán indagar el tipo de regulación.
6. Los patrones de expresión de ENOD2 sustentan la idea de una regulación por desarrollo; su nivel relativo en nodulación anómala permite discriminar dos niveles de control: uno asociado a la diferenciación del tejido cortical y otro con el desarrollo de la zona central. Para confirmar esto se debe profundizar el análisis funcional de la zona de control del gene respectivo el estudio de localización en nódulos alterados.
7. Los niveles de ARNm de leghemoglobina indica que para el

control de su expresión participan varios factores a distintos niveles. La acumulación del transcrito con una cepa nodulante de Agrobacterium brinda una condición ineresante para estudiar su regulación por técnicas inmunohistológicas.

8. La expresión de nodulina-30 es regulada de forma similar a otras nodulinas tardías, aunque requiere de alguna condición diferente a las correspondientes de Lb. Es probable también que sea más dependiente de efectores metabólicos derivados de la fijación simbiótica de N₂.
9. Se han propopuesto y discutido ideas experimentales que contribuirán a completar y confirmar algunos resultados. Principalmente, determinar los efectos de las mutaciones bacterianas o de factores purificados en la expresión de otros genes (otras nodulinas, genes de defensa), la inmunodetección y localización in situ de nodulinas indicativas en nódulos anómalos.

VI. A P E N D I C E S

1. NOTAS Y REFERENCIAS ADICIONALES

1. Revisado por Halverson & Stacey. *Microbiol. Rev.* 50:193-255, 1986.
2. cf. varios trabajos en: *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, Vol. 1. (Hennecke H. & D.P.S. Verma, eds.) Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. 482 pp. [Ref. Interlaken 1990]
3. Ver la discusión de Sprent et al. 1990, pp. 45-54 en: *Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives*. Gresshoff, P.M., L.E. Roth, G. Stacey, W.E Newton, eds. New York: Chapman & Hall, 1990. [Ref. Knoxville 1990]
4. cf. revisión anexa (p.): Sánchez F, Padilla JE, Pérez H, Lara M. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42:507-28, 1991.
5. Schubert K.R., *Ann. Rev. Plant Physiol.* 37:539-74, 1986; Vance & Heichel. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42:373-92, 1991; Layzell et al. 1991 (en: Gresshoff et al. 1990, Knoxville, op. cit.) pp.21-32.
6. Long S.R. *Cell* 56:203-14, 1989; *Ann. Rev. Genet.* 23:483-506, 1989; Martínez et al. *Crit. Rev. Plant Sci.* 9:59-93, 1990.
7. cf. Dart P.J. 1977 en: *A Treatise on Dinitrogen Fixation* (R.W.F. Hardy, ed.), Vol. 3 pp. 367-472. NY: Wiley; Brewin et al (en: Hennecke & Verma 1991. Interlaken, op. cit.) pp.325-30; Scheres et al. *Plant Cell* 2:687-700, 1990.
8. Revisado por de Bruijn et al. *Dev. Genet.* 11:182-96, 1990.
9. cf. Gresshoff et al. 1991 (en: Hennecke & Verma 1991. Interlaken, op. cit.) pp.331-5.
10. *R. tropici*, cf. Martínez-Romero et al. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1991, en prensa
11. Martínez et al. *J. Gen. Microbiol.* 131:1779-86, 1985; Vázquez et al. *J. Bacteriol.* 173:1250-58, 1991.
12. revisado por Martínez et al. *Crit. Rev. Plant Sci.* 9:59-93, 1990.
13. Sprent J.I. *New Phytol.* 11:129-53, 1989; y referencias

internas.

14. Proyectos/colaboraciones en curso por varios investigadores del Departamento de Biología Molecular de Plantas, 1991. CIIGB-UNAM.
15. Lara et al. *Plant Physiol.* 76:1010-23, 1984; Padilla et al. *Plant Mol. Biol.* 9:65-74, 1987; Sánchez et al. *Plant Physiol.* 84:1143-47, 1987; Campos et al. *Plant Mol. Biol.* 9:521-32, 1987.
16. ver referencias en Tabla 1 (p.39), del artículo anexo.
17. Padilla et al. *Plant Mol. Biol.* 9:65-74, 1987
18. Padilla, J.E., 1987. Tesis de Maestría en IBB, UACPyP/CCH-UNAM.
19. cf. los reportes citados de los grupos de D.P. Verma y de T. Bisseling en la revisión anexa
20. Conde, V., 1986. Tesis de Biología. FC-UNAM; Padilla et al. presentado en 4th Int. Symp. Mol. Genet. Plant-Microbe Interact. Acapulco 1988; Sánchez et al. pp. 370-75 en: *Molecular Genetics of Plant Microbe Interactions 1988*. Palacios R. & D.P.S. Verma, eds., St. Paul: APS Press, 1988.
21. Campos et al. *Plant Mol. Biol.* 9:521-32, 1987; Sánchez et al. en: *Molecular Genetics of Plant Microbe Interactions 1988* (Palacios R. & D.P.S. Verma, eds.) St. Paul:APS Press. pp.370-75, 1988.
22. Martínez et al. *J. Bacteriol.* 164:2828-34, 1987; Brom et al. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1280-83, 1988.
23. Conde, V., 1986. Tesis de Biología. FC-UNAM; Sánchez et al. en: *Molecular Genetics of Plant Microbe Interactions 1988* (Palacios R. & D.P.S. Verma, eds.) St. Paul: APS Press. pp.370-75, 1988.
24. ver referencias (p.39) en Tabla 1 del artículo anexo
25. Sánchez et al. en: *Molecular Genetics of Plant Microbe Interactions 1988* (Palacios R. & D.P.S. Verma, eds.) St. Paul:APS Press. pp.370-75, 1988.
26. Bennett et al. *Plant Mol. Biol.* 12:553-65, 1989.
27. Cock et al. *Plant Mol. Biol.* 14:549-60, 1990.
28. Quall et al.*
29. proporcionado por Patricia León, CIIGB-UNAM
30. proporcionado por Virginia Walbot. Stanford, CA

31. ver Tabla 2 (p.41) del artículo anexo
32. para mayor detalle, ver "Material and Methods" del artículo anexo y Miranda, J., 1991. Tesis de Maestría en IBB, UACPYP/CCH-UNAM.
33. Las definiciones y nomenclatura de términos en negritas pueden consultarse en los apéndices.
34. Existen revisiones muy completas (Newcomb W. *Int. Rev. Cytol.* 13:247-297, 1981.; Gloudemans & Bisseling. *Plant Sci.* 65:1-14, 1989.) y enfoques recientes (Kouchi et al. *Physiol. Plant.* 73:327-34, 1988; Scheres et al. *Plant Cell* 2:687-700, 1990).
35. Long S.R. *Cell* 56:203-14, 1989; Nap & Bisseling. *Science* 250:948-54, 1990. Sprent J.I. 1990. (en: Gresshoff et al. 1990, Knoxville, op. cit.) pp.45-54.
36. En este sentido resalta el trabajo del grupo Dénarié-Truchet, desde la postulación del MOIP (*Differentiation* 16:163-72, 1980), hasta el aislamiento de ModRm-1 (*Nature* 344:781-4, 1990);
37. Revisado en Vance et al. *Plant Cell Environ.* 11:413-27, 1988; Gresshoff et al. 1991 (en: Hennecke & Verma 1991. Interlaken, op. cit.) pp.331-5.
38. Park & Buttery. *Can. J. Plant Sci.* 68:199-202, 1988; Davis et al. *Crop Sci.* 28:859-60, 1988; Park & Buttery. *Plant Soil* 119:237-44, 1989.
39. Ver Glosario: fenotipos simbióticos.
40. Vale la pena mencionar que en los sobrenadantes de bacterias inducidas por flavonoides, existen otras fracciones cuyos efectos aún se desconocen.
41. Rolfe & Gresshoff. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39:297-319, 1988.
42. pseudoinfecciones: Calvert et al. *Can J. Bot.* 62:2375-84, 1984. ; Rolfe & Gresshoff. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39:297-319, 1988; autorregulación: Bohoolool; Caetano-Anollés & Gresshoff 1990 (en: Gresshoff et al. 1990, Knoxville, op. cit.) pp.727.
43. Fenotipo NAR: Modulation in the Absence of Rhizobium. Truchet et al. *Mol. Gen. Genet.* 219:65-8, 1989; Joshi et al. 1990 (en: Gresshoff et al. 1990, Knoxville, op. cit.) pp.744.
44. También los nódulos caulinares (en tallos) están relacionados con primordios de raíces adventicias.
45. también denominados: nodule-like structures, pseudonodules o 'noots' (híbrido —semántico—, de nodule y root)

46. Roche et al. pp.119-26 y Bisseling et al. pp.300-3 (en: Hennecke & Verma 1991. Interlaken, op. cit.)
47. Hirsch et al. 1991 (en: Hennecke & Verma 1991. Interlaken, op. cit.) pp.317-24; Ann Hirsch, comunicación personal.
48. Long & Cooper, 1988. pp. 163-78 (en: Palacios & Verma, Acapulco, op. cit. 1988)
49. Long S.R. Cell 56:203-14, 1989; Hirsch et al. 1991 (en: Hennecke & Verma 1991. Interlaken, op. cit.) pp.317-24
50. En *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* existen al menos tres mutantes de este tipo (referencias en Tabla 1 del artículo anexo); en soya existe un solo reporte. Stanley et al. J. Bacteriol. 166:628-34, 1986.
51. por ejemplo, cierta plasticidad morfogenética presente aún en cultivares de alfalfa. P. Gresshoff, comunicación personal.
52. Djordjevic et al. Ann. Rev. Phytopathol. 25:145-68, 1987; Glazebrook & Walker. Cell 56:661-672, 1989; Pühler et al. 1990 (en: Hennecke & Verma 1991. Interlaken, op. cit.) pp.189-194.
53. Werner et al. Z. Naturforsch. 40:179-81, 1985; van de Wiel et al. J. Plant Physiol. 132:446-52, 1988.
54. Wingender et al. Mol. Gen. Genet. 218-315-22, 1989; Sengupta-Gopalan et al. (en: Gresshoff et al. 1990, Knoxville, op. cit.) pp.701-8.
55. Podría tratarse también de sensibilidad a temperatura de los vectores utilizados, o efectos de dosis génica.
56. La mutante puede ser complementada a efectividad (Fix+), con intermediarios de síntesis de purinas (AICAR), Noel et al. Arch. Microbiol. 149:499-506, 1988; en el sistema de crecimiento utilizado, algún precursor podría ser suministrado por la planta. D. Noel, comunicación personal.
57. Schubert K.R., Ann. Rev. Plant Physiol. 37:539-74, 1986; Verma & Delauney, en: Plant Gene Research. Temporal and Spatial Regulation of Plant Genes, pp.169-99 (Verma & Goldberg, eds.). Viena: Springer Verlag. 1988.
58. que es el caso de las cepas JP32-C y JP32-F, ver Tabla 1 del artículo anexo.(p.39)
59. Soya y chícharo: Franssen et al. 1990 (en: Gresshoff et al. 1990a, Knoxville, op. cit.) pp.709-2; alfalfa: Dickstein et al. Genes Dev. 2:677-87, 1988; frijol: Sánchez et al. 1988 (en: Palacios & Verma 1988, Acapulco, op. cit.) pp.370-75; Sesbania: Strittmatter et al. Mol. Plant-Microbe Interact. 2:122-27, 1989;

- Lupinus: Szczyglowski & Legocki. *Plant Mol. Biol.* 15:361-64, 1990; Vigna: Trese & Pueppke. *Molec. Plant-Microbe Interact.* 4:46-51, 1991.
60. Hoerman et al. *Plant Mol. Biol.* 9:171-79, 1987; Dunn et al. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1:66-74, 1988?
 61. Ver Fig. 3 de Campos et al. *Plant Mol. Biol.* 9:521-32, 1987.
 62. Scheres et al. *Plant Cell* 2:687-700, 1990; Bisseling et al. 1991 (en: Hennecke & Verma 1991. Interlaken, op. cit.) pp.300-3; Proyecto en colaboración con el grupo del Dr. Bisseling
 63. Studer et al. *Eur. J. Cell Biol.* 45:177-84, 1987; Rossbach et al. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2:233-40, 1989.
 64. Raja et al. presentado en So. Simp. Int. Genet. Mol. Interac. Planta-Microorg. Interlaken, 1990. Abstr. P243 y K. Dunn, comunicación personal; Hirsch et al. 1991 (en: Hennecke & Verma 1991. Interlaken, op. cit.) pp.317-24; Van de Wiel et al. *Plant Cell* 2:1009-17, 1990; Allen et al. *Molec. Plant-Microbe Interact.* 4:139-46, 1991.
 65. Si se sintetiza en capas celulares internas (por dentro de la endodermis), podría existir un efecto de la pO₂
 66. Revisado en Martínez et al. *Crit. Rev. Plant Sci.* 9:59-93, 1990.
 67. Morrison & Verma. *Plant Mol. Biol.* 9:185-96, 1987; Mellor et al. *Plant Mol. Biol.* 12:307-16, 1989; Putnoky et al. *J. Cell. Biol.* 106:597-608, 1988.
 68. Suponemos que ambas se expresan en células infectadas, no obstante lb se acumula en nódulos formados por la cepa AT420 y mientras que Npv-30 permanece en un nivel reducido.
 69. Vasse et al. *J. Bacteriol.* 172:4295-306, 1990.
 70. Cock et al. *Plant Mol. Biol.* 14:549-60, 1990; Verma et al. 1991 (en: Hennecke & Verma 1991. Interlaken, op. cit.) pp.291-99; Atkins et al. *Plant Physiol.* 76:705-10, 1984; Macin et al. 1990 (en: Gresshoff et al. 1990, Knoxville, op. cit.) pp.741; Otrege et al. presentado en So. Simp. Int. Genet. Mol. Inter. Pl.-Microorg. Interlaken, 1991. Abstr. P233; Dakora & Atkins. *J. Plant Physiol.* 16:131-40, 1989.
 71. Franssen et al. 1990 (en: Gresshoff et al. 1990a, Knoxville, op. cit.) pp.709-2.
 72. de Bruijn et al. *Dev. Genet.* 11:182-96, 1990.
 73. revisado por Verma & Delauney, en: *Plant Gene Research. Temporal and Spatial Regulation of Plant Genes*, pp.169-99 (Verma

- & Goldberg, eds.). Viena: Springer Verlag. 1988.
74. Verma et al. 1991 (en: Hennecke & Verma 1991. Interlaken, op. cit.) pp.291-99.; Suzuki & Verma. Plant Physiol. 1991.
 75. Larsen & Jochimsen. EMBO J. 5:15-9, 1986; nueva**
 76. cf. Sengupta-Gopalan et al. (en: Gresshoff et al. 1990, Knoxville, op. cit.) pp.701-8, y varias referencias del artículo anexo.
 77. Enfoques bioquímico, genético y evolutivo. Una revisión breve en: Arredondo-Peter, R., 1985. Tesis de Maestría en Ciencias (Biol.). FC-UNAM, además de los trabajos clásicos de C. Appleby (véanse refs. en la revisión anexa).
 78. Leong et al. J. Biol. Chem. 257:8724-30, 1982; O'Brian et al. PNAS 84:8390-3, 1987.
 79. de Bruijn et al. Dev. Genet. 11:182-96, 1990; Stougaard et al. Mol. Gen. Genet. 220:353-60, 1990.
 80. Factor aislado de Azorhizobium caulinodans (BBE o BBP) que se une a una secuencia determinada en la región 5' del gene de Lb de Sesbania rostrata (BBS). Welters et al. 1990 (en: Gresshoff et al. 1990, Knoxville, op. cit.) pp.775.
 81. de Billy et al. Plant Journal, 1991 (en prensa).
 82. Campos et al. J. Cell Biochem. Suppl. (15 Part A):19, 1991.; Sánchez et al. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42:507-28, 1991.
 83. Proyectos en curso de M. Rocha, F. Campos, y C. Carsolio en nuestro departamento
 84. Knight & Langston-Unkefer. Science 241:951-8, 1988; Temple et al. 1990 (en: Gresshoff et al. 1990, Knoxville, op. cit.) pp.769.
 85. Perotto et al. 1991 (en: Hennecke & Verma 1991. Interlaken, op. cit.) pp.325-30.
 86. v.gr. nódulos espontáneos; I. Huguet, P. Gresshoff, comunicaciones personales.
 87. Mellor R.B., J. Exp. Bot. 40:831-39, 1989; i.e. Gsr: Bennett et al. Plant Mol. Biol. 12:553-65, 1989; i.e. α -glucosidasa, α -manosidasa: Kinnback & Werner 1990 (en: Gresshoff et al. 1990, Knoxville, op. cit.) pp.746
 88. Nap & Bisseling. Physiol. Plant., 1990.
 89. Wyss et al. Planta 182:22-26, 1990.

90. Revisado por Rolfe & Gresshoff. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 39:297-319, 1988; Sprent 1990 (en: Gresshoff et al. 1990, Knoxville, op. cit.) pp.45-54.
91. Miranda, J., 1991. Tesis de maestría en IBB. UACPYP/CCH-UNAM.

2. ABREVIATURAS

35S del CaMV	Promotor de un gen del virus del mosaico de la coliflor con actividad constitutiva en plantas
<u>cat</u>	Gen de la cloramfenicol-acetilasa (CAT)
Fenotipos simbióticos:	
Nod	Nodule formation
Noi	Nodule induction (equivalente a Nod)
Inf	Infection thread formation
Bar	Bacterial release
Bad	Bacterial development
Ndv	Nodule development
Fix	Nitrogen Fixation
FSN	Fijación simbiótica de nitrógeno
GeENODn	Nomenclatura de genes de nodulinas (Género especie, Early NODulin, n=No. de clona.
GS	Glutamina sintetasa
<u>hemA</u>	Gen de la ácido δ -amino-levulinico sintasa
<u>lacZ</u>	Gen de la β -galactosidasa (GAL)
Lb(s)	Lehemoglobina(s)
<u>lbc₃</u>	Gen de una isoforma de Lb
NGe-n	Nomenclatura de nodulinas: Nodulin, Género especie-n=peso molecular de la proteína nativa o del PTV (p.ej.: Npv-30)
<u>nod</u>	Genes de nodulación de <u>Rhizobium</u>
NodRm-1	Lipo-oligosacárido específico para alfalfa
NPA	Acido N-(1-naftil)-ftalámico
Npv-30	Nodulina-30 de frijol
PO ₂	Presión parcial de oxígeno (fase gaseosa)
PTV	Productos de traducción <u>in vitro</u>
TIBA	Acido 2,3,5,-tri-yodo-benzóico
<u>uidA</u>	Gene de la β -glucuronidasa (GUS)

3. GLOSARIO

- Adhesión bacteriana: unión específica del microsimbionte a la superficie radicular, presumiblemente mediado por polisacáridos superficiales, lectinas y iones bivalentes)
- Determinantes de superficie: polisacáridos superficiales; i.e. exopolisacáridos EPS, lipopolisacáridos LPS, polisacáridos capsulares CPS, glucanos con unión β -1,2
- Elementos (secuencias) cis-activas: regiones hacia arriba de los genes, que participan en la regulación transcripcional.
- Factores trans-activadores: péptidos capaces de interactuar con secuencias 5' cis-activas como factores de transcripción.
- Fitorreguladores [=fitohormonas]: i.e. auxinas, citocininas, etileno y agonistas sintéticos
- Flavonoides: compuestos heterocíclicos derivados de la vía de síntesis de fenil-propanoides y que participan en procesos determinantes de las interacciones planta-microorganismo.
- Fotosintato: conjunto de productos de fotosíntesis (azúcares, ác. orgánicos, Aa's), exportados de la hoja (fuentes) a los órganos-demanda.
- Meristemo: tejido de formación en plantas; grupos localizados de células pequeñas e indiferenciadas en activa división, que generan el crecimiento vegetal.
- Modelos simbióticos: Grupos o parejas de especies de leguminosas y los rhizobia compatibles, que han sido estudiados más activamente (alfalfa, trébol, soya, etc.)
- Pseudoinfecciones: iniciación localizada de divisiones subcorticales en la raíz de la planta
- Infección intercelular: penetración del microsimbionte por los tejidos de la planta, ya sea a través de hilos de infección, o por espacios del apoplasto (crack entry)
- Infección (liberación) intracelular: formación de unidades de membrana que rodean a la bacteria dentro del citosol, una vez rota la continuidad de la pared celular vegetal del hilo.
- Nodulación espontánea: formación de órganos radiculares en cultivo axénico, con histología y expresión genética similares a nódulos verdaderos en estados tempranos (sólo en cultivares de alfalfa y en baja proporción de las plantas)
- Organogénesis (del primordio de nódulo): formación de estructuras histológicas del nódulo tales como meristemo apical, capa cortical, endodermis y tejido central
- Respuesta de defensa (P): mecanismos de ataque o protección contra ataques de patógenos, mediado por cambios a varios niveles (síntesis de fitoalexinas antimicrobianas, quitinasas, glucanasas; cambios de pared celular, repuesta hipersensible (necrosis)
- Transducción de señales (P,F): Acciones y sistemas de comunicación molecular entre el exterior y los compartimentos intracelulares (hormonas, receptores, segundos mensajeros, cinasas, etc.)
- Xilogénesis: formación de estructuras asociadas a [sistemas de] tejidos vasculares (traqueidas, vasos cribosos, etc.)

VII. A G R A D E C I M I E N T O S

Una dosis de justicia y otra de nostalgia obliga a mencionar a muchos —no todos, memoria falible est— de los que han colaborado para hacer esto:

La familia: a Dalia por razones obvias y permanentes; a mis 2 padres (Poncho y Pina) + 5 hermanos (Al-PAN-so, el Dr. Javier, Pepito (hardware) y Eduardo (software) y Lu[é]s) por su real apoyo, a Don Mario y Emilia mis suegros preferidos y claro, los consabidos cuñados: Ia y Rocío; Memo, Favi y Gil, gracias mil (verso sin esfuerzo).

Al maestro (salario justo), con cariño:
A Federico, Ale, Miguel L. por su contribución a una formación vegetal, génica y protéica, académicamente muy nutritiva y a otros integrantes de comités y jurados: Alejandro Alagón, Esperanza, rhizoexperta; Luis Covs, Dres. Possani y Merchant y a Mario Rocha en especial, su paciencia y disposición para examinarme y asesorarme con este proyecto y tesis. Otras influencias (ojalá no se pierdan): Willy Hansberg y la Dra. Alice G. Con todo respeto, para los iniciadores de estos Centros en Cuernavaca: a Jaime Mora por charlas sugestivas, aguerridos seminarios y a Rafael por nuestros buenos tiempos cefinitas; a Paco por los nuevos aires ceingebitas.

A los cuates: lic's, maestros y doctores (en ciencia y varias disciplinas de la cotidianeidad), también. Los coetáneos: al MAC un resto de rollos de por medio, Helena su decisión y cenas ricas, Martha: sonrisas y compañerismo, Lorenzo: versatilidad y buen humor. David(oso): ciencia, más ciencia (y otros líos divertidos) Jesús A. (rorro) por ahora, nostalgia. A otros colegas rhizonodulólogos y anexas. Francisco, Héctor, Carmen Q. Juan, Araceli, José Luis, Javier, Mario S., Paty, Alejandros (GR y cano), Irene, Jaque; a Sol, Roberto, Germán(cito), y recientes plantófilos: Carolina, Raúl, Walt, Miguel V. Alberto, Luis, Fernando. A los clásicos cefinitas: Oscar, Marco, Memo, Susy, Osvaldo, Gina, Jorge, Enrique y otros más nuevos: Mónica César, Socorro, Sarisa. A Gerardo A. y Javier C. su apoyo y paciencia. A Raúl A. muchas ideas y ánimo. A Víctor, Quique M., el tocayo Martínez (terrón). Música y ciencia: Mere, Estefan y Rodrigo Apoyo de muchos tipos: Zitla, Lola, Adriana, David Link y desde hace poco Blanca G. A otros amigos. Los sempiternos magníficos: Laura, Fidel, Mario G. Carlos, Nemesio, Mario C. y uamitas de entonces. Mónica y José Luis, Linda y Toni del CAD, muchos cefinitas y otros tantos ceingebitas, biologuitos de la UAEM, etc.

Gracias a todos, va esta tesis en prenda!