

03062

2ej.º 9

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Unidad Académica de los Ciclos Profesional
y de Posgrado del C.C.H.

Caracterización de una Secuencia de Rhizobium phaseo-
li tipo 2 Homóloga al Gene 2 del T-DNA de Agrobacte-
rium tumefaciens.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA
PRESENTA
Marco Aurelio Pardo Galván
Agosto de 1988

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.

INTRODUCCION.

-La Interacción Planta-Rhizobium.

Rhizobium: clasificación general.

Rhizobium: el proceso simbiótico.

Genes de Rhizobium involucrados en nodulación.

Rhizobium phaseoli: características.

-Hormonas en Plantas.

Citocininas

Auxinas

-Citocininas Producidas por Microorganismos del Suelo.

-Auxinas Producidas por Microorganismos del Suelo.

-Objetivo.

MATERIALES Y METODOS.

RESULTADOS.

DISCUSION.

REFERENCIAS

INTRODUCCION

La Interacción Planta-Rhizobium.

Los Rhizobia, bacterias gramnegativas del suelo, interactúan con plantas leguminosas y establecen una relación simbiótica. En los últimos años se ha intensificado el estudio de esta simbiosis, tanto por su importancia agronómica como por su interés para el conocimiento básico.

Debido a su fácil manipulación, Rhizobium es el simbiote mejor caracterizado. La genética molecular de Rhizobium ha contribuido en forma determinante a la comprensión global de su relación simbiótica con la planta. Sin embargo, aún desconocemos muchos aspectos tanto genéticos como bioquímicos de esta relación.

Rhizobium: clasificación general.

La planta establece una simbiosis solo con un grupo determinado de Rhizobium. Tradicionalmente, a este grupo se le clasificaba de

acuerdo a la leguminosa que infecta. Así por ejemplo, los Rhizobium que nodulan trébol, chicharo, alfalfa y frijol se les consideraba como las "especies" R. trifolii, R. leguminosarum, R. meliloti y R. phaseoli, respectivamente. Esta clasificación ha sido inadecuada, por lo que se ha recurrido a nuevos criterios de clasificación, como son la homología DNA-DNA entre distintos Rhizobium, comparación de sus patrones de proteínas, requerimientos nutritivos, etc. (Roberts, 1980; Hollis, 1981; Elkan, 1984). Actualmente, se les clasifica de la siguiente manera:

-R. leguminosarum: con los biovars viciae, phaseoli y trifolii.

-R. meliloti.

-R. loti, que comprende al vasto grupo de los rhizobia de crecimiento rápido anteriormente pertenecientes al grupo de los "cowpea".

-R. fredii.

En esta nueva clasificación aparece un nuevo género, Bradyrhizobium, que contiene al antiguo R. japonicum de crecimiento lento.

En el presente trabajo y por simplificación, denominaré a R. leguminosarum bv. phaseoli simplemente como R. phaseoli.

Rhizobium: el proceso simbiótico.

Rhizobium establece simbiosis con plantas leguminosas, con algunas excepciones como Parasponia, de tal manera que la bacteria

provee de nitrógeno a la planta y, a su vez, la planta provee nutrientes (fotosintato) y da protección a la bacteria. Para establecer la simbiosis, tanto la planta como la bacteria llevan a cabo una interrelación estrecha y complicada que genera una serie de modificaciones tanto bioquímicas como morfológicas que culminan en la formación de una estructura planta-bacteria altamente diferenciada llamada nódulo, donde finalmente se realiza la fijación de nitrógeno.

El nódulo se forma generalmente en las raíces de la planta, aunque existen excepciones como en el caso de Azorhizobium caulinodans, el cual puede formar además, nódulos en el tallo.

Podríamos dividir al proceso simbiótico en cuatro fases o estadios, aunque no exista un límite entre cada uno de ellos, ya que frecuentemente los distintos eventos se sobreponen:

La primer fase comprendería el reconocimiento entre la bacteria y la planta, el enroscamiento del pelo radicular y la inducción a distancia de una actividad mitogénica de las células corticales inmediatas al pelo radicular.

Existe evidencia de que la unión de la bacteria al pelo radicular emergente esta mediado probablemente por lectinas de origen vegetal (Dazzo, 1982). En la zona donde emergen los pelos radiculares se excretan compuestos flavonoides que activan algunos genes del Rhizobium cuyos productos participan en la nodulación. La bacteria por su parte, secreta factores desconocidos que causan enroscamiento del pelo radicular y que

provocan una actividad meristemática en las células de la corteza externa (Bauer, et. al., 1985).

En la segunda fase, la bacteria invade al pelo radicular y queda envuelta en una estructura tubular de origen vegetal llamada hilo de infección, que se prolonga hasta las células de la corteza externa. Se induce entonces por segunda ocasión una actividad meristemática a distancia de las células de la corteza interna. En este momento, la planta manda una señal a la raíz que impide que se formen demasiados nódulos (Pierce, 1983). Sobre este punto en particular me referiré más tarde en la discusión.

El tercer estadio estaría comprendido por la emergencia del nódulo, su crecimiento y la invasión de las bacterias a cierto subconjunto de células del nódulo.

Finalmente, en la cuarta fase las bacterias se diferencian en bacteroides, se compartimentalizan las funciones en el nódulo, el bacteroide fija el nitrógeno en amonio, la planta lo asimila y provee de fotosintato a la bacteria.

Estos cuatro estadios comprenden exclusivamente el proceso de formación del nódulo; faltaría considerar eventos como senescencia del nódulo, competencia y eficiencia de nodulación.

Genes de Rhizobium involucrados en nodulación.

Los genes que intervienen en la nodulación se encuentran en un plásmido de alto peso molecular al que se le denomina plásmido

simbiótico (pSim) (Hooykaas, 1981; Zurkowski, 1982; Scott, 1982). En Bradyrhizobium, estos genes son cromosomales (Djordjevic, 1987).

Se han caracterizado en el pSim una gran cantidad de genes que inciden de una forma o de otra en la simbiosis. Aquí referiré solo aquellos que intervienen en nodulación:

- Genes nod comunes. Se ha observado que estos genes participan en el enroscamiento del pelo radicular (fenotipo Hac), la inducción a distancia de la división celular y en la formación del hilo de infección (aunque la síntesis per se del hilo corresponde a la planta). Se han descrito cinco genes hasta el momento: nod A, nod B, nod C, nod I y nod J (Egelhoff, 1985; Djordjevic, 1987). Se les llama genes nod comunes debido a que se encuentran conservados tanto estructural como funcionalmente en casi todos los Rhizobium estudiados e incluso, en Bradyrhizobium y Azorhizobium caulinodans. Las mutaciones en cualquiera de estos genes pueden ser complementadas cuando se introduce una copia homóloga aún proveniente de otra especie. Los genes nod A, B y C están organizados en un operón. El producto de nod A es citosólico y el de C es membranal y solo se expresan durante la simbiosis. El gene nod D es un regulador de la expresión de los genes nod comunes. En R. meliloti se han localizado tres copias del gene nod D. La activación de nod D esta mediada por compuestos flavonoides secretados por la planta, que pueden activar o inactivar al producto de nod D (Djordjevic, 1987; Rossen, 1985). Ac-

tualmente, no se consideran como equivalentes a los genes nod D de las distintas especies de Rhizobium, ya que cada uno de ellos responde de manera distinta a los exudados de una planta determinada, por lo que este confiere una cierta función de especificidad por el hospedero (Spaink, 1987).

Cerca de estos genes se encuentra otra región que contiene a los genes nod I y nod J. Mutaciones en estos genes provocan hilos de infección defectuosos, un retraso en la nodulación y disminuyen el número de nódulos (Djordjevic, 1987).

-Genes nod específicos (hsn): son llamados específicos porque las alteraciones en estos genes no pueden ser complementadas por secuencias de otras especies. Inciden en el espectro de infección de la cepa. Esto significa que las bacterias que llevan mutaciones en estos genes pueden tener un fenotipo Nod- para una planta pero nodulan, aunque deficientemente, a otras plantas. Este es el caso para los genes nod F y nod E (hsnA y B) en R. trifolii, cuyas mutaciones generan un fenotipo nod- en trébol, pero pueden nodular chícharo (revisada por Rossen, 1987). En la tabla 1 se muestran los genes nod de Rhizobium descritos hasta el momento y su fenotipo simbiótico.

Otros genes importantes para la nodulación son aquellos involucrados en la producción de exopolisacáridos (EPS) y lipopolisacáridos (LPS). Mutaciones en estos genes provocan infecciones aberrantes (Finan, 1985; Chen, 1985). El papel que

juegan los EPS y LPS en la nodulación aún es desconocida.

Rhizobium phaseoli: características.

Rhizobium phaseoli nodula a Phaseolus vulgaris (frijol) y es el modelo de estudio en este trabajo.

Se han caracterizado dos tipos de Rhizobium phaseoli: el tipo 1, que es el más frecuente, tiene varias copias de los genes estructurales de la nitrogenasa (Quinto, 1982), que es la enzima encargada de la reducción del nitrógeno molecular. Contiene además, los genes *psi* (Borthakur, 1985) y *psr*, que están involucrados en la producción de exopolisacáridos. Su espectro de infección está limitado a Phaseolus (Martínez, 1985). Es, en el tipo 1, donde mejor están caracterizados los genes *nod* para R. phaseoli (Vázquez, 1988).

Los Rhizobium phaseoli tipo 2 no tienen reiterados los genes de la nitrogenasa, no producen melanina, no contienen a las secuencias *psi* y *psr*, son ácido y aluminio resistentes, su espectro de infección es más amplio y la presencia de su plásmido simbiótico en el fondo genético de Agrobacterium confiere las capacidades de nodular y fijar nitrógeno en frijol y *Leucaena* (Martínez, 1985, 1987; Brom, 1988). El modelo de estudio en este trabajo pertenece al R. phaseoli tipo 2.

Hormonas en Plantas.

El estudio del modo de acción de una hormona vegetal en particular se ha complicado debido a que existen varios sitios de biosíntesis de la hormona y porque al remover un órgano secretor de la hormona, se afectan otros procesos de la planta, muchos de los cuales no están directamente relacionados con aquellos controlados por la hormona.

La tabla 2 muestra un esquema general de las principales hormonas encontradas en plantas, así como su participación en distintos eventos de desarrollo y crecimiento de la planta.

Para ilustración de este trabajo, me concretaré a describir solo los detalles generales sobre el efecto de las citocininas y las auxinas:

Citocininas:

Las principales citocininas naturales encontradas en plantas son la zeatina y la isopenteniladenina. El principal lugar de biosíntesis de estas hormonas es la raíz. Se sabe que intervienen en el proceso de germinación y en los eventos tempranos de post-germinación. Actualmente, se acepta que las citocininas intervienen en el crecimiento y división celular (Nishinari, 1980).

Aunque aun se desconoce el modo de acción de estas hormonas, existen trabajos en los que se propone que intervienen en el aparato traduccional (Fox, 1975).

Auxinas:

Los principales compuestos naturales con actividad de auxina encontrados en plantas son el ácido indol-3-acético (IAA) y distintos conjugados de éste.

IAA . La estructura y las principales vías de biosíntesis de IAA en plantas se ilustran en la fig. 1."

Los principales sitios de biosíntesis de auxinas son los tejidos en actividad meristemática, pero especialmente el ápice foliar, las hojas en desarrollo y las hojas maduras (Wightman, 1973).

Se han propuesto dos hipótesis principales sobre el modo de acción de las auxinas:

1) Activación génica: existe evidencia que indica que las auxinas son capaces de alterar la síntesis de RNA y proteínas. Tal es el caso en los estudios hechos por Verma (1975) para la celulasa (enzima probablemente involucrada en la degradación de la pared celular durante el crecimiento mediado por auxina) en epicótilos de chícharo tratados con IAA, donde demuestra que existe síntesis de novo de mRNA de celulasa.

2) Bomba de protones: Esta hipótesis fue propuesta por Hager, et. al. (1971). Ellos encontraron una similitud del efecto en el crecimiento provocado por la auxina y el inducido por la presencia de protones (H^+). Proponen que las auxinas activan una ATPasa membranal que provoca una salida de protones del citoplasma hacia la pared celular, incrementando de esta forma la plasticidad de la pared. Por otro lado, Cleland (1973) y Rayle (1973) encontraron que los coleoptilos de Avena tratados con auxinas secretaban protones al medio. La acidificación del medio fue detectada en un período de 20 a 30 min.

Ambas hipótesis no son excluyentes entre sí. Vanderhoef y Stahl (1975) hicieron la observación de que si se considera la velocidad de crecimiento y no el crecimiento total en células tratadas con auxinas, existen entonces dos fases de crecimiento en respuesta al tratamiento: la primera respuesta se inicia aproximadamente a los 12 min y la segunda a los 40 min. La segunda fase, mas no la primera, se inhibe con cicloheximida. Entonces, la primera respuesta podría estar mediada por la bomba de protones y la segunda por la síntesis de RNA y proteínas.

Citocininas Producidas por Microorganismos del Suelo.

Se ha encontrado que ciertos hongos (Crafts, 1974), Rhizobium, los fitopatógenos Corynebacterium fascians (Einset, 1977), Pseudomonas y Agrobacterium tumefaciens (Kaiss-Chapman, 1977) producen citocininas. De estos, solo en Agrobacterium se conoce la función que desempeñan.

Citocininas producidas por Agrobacterium tumefaciens.

Actualmente se conocen dos genes de Agrobacterium que participan en la síntesis de citocininas. Ambos se encuentran en el plásmido infectivo llamado pTi (plásmido inductor de tumores, fig.2). Uno de ellos se encuentra en la región vir, se expresa en la bacteria y es importante para la virulencia. El otro forma parte de los genes del T-DNA (gene 4), se expresa en la planta y su expresión es importante para la tumorigénesis (ver adelante).

Citocininas producidas por Rhizobium.

En comparación con Agrobacterium, es muy poco lo que se conoce acerca de las citocininas producidas por Rhizobium. Se sabe que produce cantidades muy pequeñas de la hormona. Existen trabajos que buscan relacionar la producción de estas hormonas con el proceso de nodulación (Wang, 1982; Badenoch-Jones, 1984, 1987). Long (1988) reportan experimentos en los que logran inducir con citocininas unas estructuras pseudonodulares en la raíz.

A pesar de estos trabajos, aún es oscuro el papel que pudieran desempeñar las citocininas en la nodulación. Falta entonces ampliar los trabajos que demuestren en definitiva el papel de las citocininas en el proceso simbiótico.

Auxinas Producidas por Microorganismos del Suelo.

IAA. Se ha encontrado que existen muchos microorganismos del suelo que excretan IAA al medio, tales como Flavobacterium, Azotobacter, Azospirillum y Rhizobium; incluyendo también bacterias patógenas como Xantomonas, Pseudomonas y Agrobacterium (Brown, 1968, 1972; Fett, 1987).

Para el interés del trabajo, describiré algunos de los estudios hechos en Pseudomonas, Agrobacterium y Rhizobium.

IAA en Pseudomonas.

Pseudomonas induce lesiones o hipertrofias en la planta. En P. syringae pv. savastanoi la información genética requerida para la tumorogénesis se encuentra en un plásmido llamado pIAA1. Este contiene dos genes bien caracterizados involucrados en la producción de IAA y son : el gene iaaM que codifica para la enzima triptofano monooxigenasa que cataliza la conversión del triptofano en indolacetamida y, el gene iaaH, que codifica para la enzima indolacetamida hidrolasa; esta enzima convierte la in-

dolacetamida en IAA (fig.3). Ambos genes son indispensables para la tumorigénesis (Comai, 1981).

IAA en Agrobacterium.

El proceso tumorigénico:

A. tumefaciens y A. rhizogenes inducen tumores en la planta. El primero causa tumores en el tallo y el segundo provoca un crecimiento profuso de la raíz. Aunque de A. rhizogenes se han hecho buenos trabajos, es en A. tumefaciens donde mejor se ha estudiado el proceso tumorigénico y los genes que intervienen en él.

La infección por Agrobacterium se realiza a través de una herida en la planta. Al igual que P. savastanoi, en A. tumefaciens la mayoría de los genes necesarios para inducir el tumor se localizan en el pTi. En el cromosoma se han identificado dos genes llamados chvA y chvB importantes en la tumorigénesis (Douglas, 1985). Se han encontrado genes equivalentes a los genes chvA y chvB en Rhizobia de crecimiento rápido que se denominan ndvA y ndvB (Dylan, 1986). En Agrobacterium, estos genes participan en la síntesis de beta-1-2-glucano y mutaciones en estos genes afectan la unión de la bacteria a la célula vegetal durante la infección. Además, tienen efectos pleiotrópicos como son la disminución de la osmotolerancia de la bacteria, inestabilidad de sus plásmidos y la pérdida del flagelo (Puvanesarajah, 1985). En

Rhizobium, las mutaciones en los genes *ndvA* y *ndvB* inducen nódulos aberrantes no fijadores de nitrógeno (Dylan, 1986).

Después de que se produce una herida en la planta, esta secreta compuestos fenólicos que inducen la expresión de ciertos genes del pTi comprendidos en la región "vir" (Bolton, 1986; Lichtenstein, 1986). Estos genes son los responsables de los eventos de transferencia e integración en el genoma de la célula vegetal de un fragmento de 25 Kilopares de bases (Kb) de DNA del plásmido Ti, al que se denomina T-DNA (ver fig.2). Una vez integrado el T-DNA, se expresan dos regiones codificadas por él: una involucrada en la biosíntesis de opinas, que son aminoácidos modificados que sirven como nutrientes para el Agrobacterium, y otra que participa en la síntesis de auxinas y citocininas (Schroder, 1984; Inze, 1984). La producción de estas hormonas provoca un crecimiento descontrolado de las células en el sitio de infección, dando lugar a la formación de un tumor. Las células que tienen integrado el T-DNA pueden crecer en cultivo sin necesidad de añadir auxinas y citocininas.

El gene 1 del T-DNA codifica para la triptofano monooxigenasa y el gene 2 para la indolacetamida hidrolasa (fig.3).

En la secuencia nucleotídica de los genes 1 y 2 se observó que para los genes 1 de Agrobacterium y *iaaM* de P. savastanoi existe un 50% de homología a nivel de secuencia de aminoácidos; en cambio, entre los genes 2 de Agrobacterium y *iaaH* de P. savastanoi

existe solo un 27% de homología (Yamada, 1985). Una diferencia importante entre los genes 1 y 2 de Agrobacterium y los de Pseudomonas es que los de Agrobacterium poseen un promotor eucariote (Breathnach, 1981).

IAA en Rhizobium.

Muchos son los trabajos en los que se demuestra que Rhizobium es capaz de producir IAA (Badenoch-Jones, 1982; Bauer, 1981). Esta producción se estimula añadiendo triptofano al medio de cultivo (Dullaart, 1970). En algunos de estos estudios se ha querido correlacionar la producción de IAA con el proceso simbiótico. Tal es el caso para R. leguminosarum bv. viciae y trifolii, en el que se encontró que no existía una correlación entre la producción de auxina y la nodulación (Wang, 1982; Badenoch-Jones, 1982).

En R. phaseoli tipo 1, Ernstsén y colaboradores (1987) midieron las pozas intracelulares de indoles, así como la biosíntesis y catabolismo de IAA. Encontraron que esta vía de biosíntesis de IAA difiere de la vía utilizada por Pseudomonas y Agrobacterium. En el caso de R. phaseoli, el triptofano es convertido en indoletanol, este en ácido indolacético y, finalmente en indolmetanol (fig.4). Indolacetamida no es catabolizada. Sin embargo, este trabajo fue hecho con Rhizobium en vida libre, por lo que no se descarta la posibilidad de que exista una vía alterna que fun-

cione durante la simbiosis.

Objetivo.

Con el fin de detectar en Rhizobium secuencias que fuesen homólogas a los genes 1 y 2 del T-DNA de A. tumefaciens, E. Martínez realizó un experimento de hibridización de DNAs de distintos Rhizobia contra estos detectores. Entre los Rhizobia utilizados se encuentran representantes de R. leguminosarum bv. viciae y trifolii, R. meliloti, R. fredii, R. spp. y R. phaseoli tipo 1 y 2. No encontró hibridización del gene 1 con el DNA de ninguno de los Rhizobia utilizados, pero las cepas de R. phaseoli tipo 2 (CFN 299 y CIAT 899), así como la cepa CFN 244 (aislamiento natural de Macroptilium gibosifolium que nodula también al frijol) hibridizaron con el gene 2.

Si en Agrobacterium el gene 2 participa en el proceso tumorogénico, entonces en Rhizobium qué papel jugará la secuencia homóloga al gene 2?

Nosotros estamos interesados en el papel que pudieran tener las hormonas durante la simbiosis. Puesto que hemos identificado en Rhizobium una secuencia homóloga a un gene cuyo producto sin-

tetiza IAA, nos preguntamos si esta secuencia incide en el proceso simbiótico. El objetivo de este trabajo fué tratar de contestar esta pregunta.

MATERIAL Y METODOS.

Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados y construídos los presento en la tabla 3.

--Medios de Cultivo:

PY.- 0.5% Peptona de caseína, 0.3% Extracto de levadura y 7mM de CaCl.

LB.- 0.1% Peptona de caseína, 0.5% Extracto de levadura y 1% de NaCl.

Cuando fué necesario, se utilizó sacarosa al 5%.

-- Concentración de Antibióticos:

Para Rhizobium y Agrobacterium: Kanamicina 60mg/lt., Rifampicina 50mg/lt, Nalidíxico 20mg/lt, Tetraciclina 5mg/lt, Spectinomicina 100mg/lt.

Para E.coli: Kanamicina 30mg/lt, tetraciclina 10mg/lt, Nalidíxico 10mg/lt., Carbinicilina 100mg/lt.

-- Temperatura de crecimiento: Rhizobium y Agrobacterium fueron crecidos a 30 grados C. E. coli a 37 grados C excepto durante las conjugaciones con Rhizobium o Agrobacterium.

-- Condiciones de conjugación: En medio PY a 30 grados C usando

una relación de donadoras/receptoras de 1/10.

--Extracción de DNA total.

Se crece a las cepas en 5 ml de medio rico. Centrifugar los 5 ml a 10,000 g por 5 min. Resuspender en 1 ml de buffer Tris 50mM-EDTA 20mM (TE 50/20) a pH 8. Centrifugar a 10,000 g por 5 min. Resuspender en 0.5 ml de TE 50/20. Agregar 0.05 ml de proteasa 5 mg/ml y 0.05 ml de SDS 10% en TE 50/20. Incubar 1 hr. a 37 grados C. Pasar 3 veces por jeringa. Extraer 3 veces con fenol-cloroformo-isoamílico en una relación de 24-24-1 respectivamente. Extraer 2 veces con cloroformo-isoamílico en una relación 24-1 respectivamente. Añadir a la fase acuosa 2.5 vol. de etanol y 1/25 de vol. de NaCl 5 M. Precipitar por 4 hrs. o toda la noche a -20 grados C. Centrifugar por 15 min., decantar, lavar 3 veces con etanol al 70%, secar al vacío y resuspender la pastilla en TE 10/1 pH 8 que contenga RNasa a una concentración de 0.2 mg/lt.

-- Purificación de plásmidos recombinantes en E. coli.

Se llevó a cabo por el método de Birnboim y Doly (1979).

-- Perfil electroforético de plásmidos de alto peso molecular.

Se utilizó la técnica de Eckhardt (1978).

-- Condiciones de hibridización:

La transferencia del DNA a filtros de nitrocelulosa se hizo de

acuerdo al método de Southern (1975). Los detectores fueron marcados con ^{32}P por "nick translation" (Rigby, 1977). Para las hibridaciones homólogas, los filtros fueron lavados con 0.1X SSC y 0.1% de SDS a 55 grados C. Para las hibridaciones heterólogas, se lavaron con 2X SSC y 0.1% SDS a 55 grados C.

-- Condiciones de nodulación y determinación de la fijación de nitrógeno.

Se utilizó el cultivar de frijol "Negro Jamapa". Las semillas se esterilizaron con etanol por 10 seg. y con hipoclorito de sodio al 50% por 15 min. Se lavaron exhaustivamente con agua estéril y se pregerminaron por 3 días en oscuridad. Luego se pasaron a frascos de 1 lt. que contenían vermiculita con solución nutritiva sin nitrógeno (Wacek, 1976). Las plantas fueron inoculadas con 1 ml de cultivo bacteriano denso. Se mantuvieron a los frascos con las plantas inoculadas por 2 días más en oscuridad y finalmente se transfirieron a 30 grados C con luz, oscuridad y humedad controladas.

La actividad de la nitrogenasa fue determinada a los 14 días después de la inoculación. Esto se realizó colocando a la raíz en frascos de 25 ml que sellan herméticamente e inyectando acetileno. Después de 1 hr. se determinó el contenido de etileno por cromatografía de gases.

RESULTADOS

La cepa CFN 299 de Rhizobium phaseoli es del tipo 2. Esta cepa es un aislamiento natural de nódulo de Phaseolus vulgaris de Brasil, es resistente a ácido y aluminio y contiene 3 megaplásmidos (fig.5) siendo el mayor el plásmido simbiótico (plásmido c). El pSim de esta cepa, al igual que el de la cepa CIAT 899 perteneciente al R. phaseoli tipo 2, confiere las capacidades de nodular y fijar nitrógeno estando en un fondo genético de Agrobacterium (Martínez, 1987). De acuerdo a los datos publicados hasta el momento, ningún pSim de otros Rhizobium confiere la capacidad de fijar nitrógeno en el fondo genético de Agrobacterium (Brom, 1988; revisado en Martínez, 1987).

Otra característica de R. phaseoli tipo 2, que comparte con la cepa CFN 244 (que es un aislamiento natural de Macroptilium gibosifolium, pero que también nodula frijol), es la presencia en su genoma de una secuencia homóloga al gene 2 del T-DNA de Agrobacterium tumefaciens (fig.6).

El gene 2 se localiza en el pTi y está íntimamente ligado al proceso tumorigénico de A. tumefaciens, por lo que análogamente quisimos saber la localización en el genoma de Rhizobium de esta secuencia homóloga al gene 2, así como su participación en el proceso simbiótico.

Para saber en qué replicón de la CFN 299 se encuentra esta secuencia, llevé a cabo un experimento que consiste en hibridizar

al gene 2 con genomas de Agrobacterium que contienen uno u otro de los plásmidos de la CFN 299 (fig.7). Encontré que la secuencia se localiza en el pSim (cepa Ac).

Para conocer la participación de la secuencia homóloga al gene 2 en la simbiosis, primero se mutará esta secuencia y después se probará el fenotipo para nodulación.

Se llevó a cabo una mutagénesis in vitro que consiste en insertar al gene 2 un fragmento de DNA que confiera resistencia para algún antibiótico y después, por recombinación, transferir la mutación a la secuencia homóloga del Rhizobium.

La mutagénesis del gene 2 se ilustra en la fig.8a. En ella se muestra la inserción de un cassette de resistencia a tetraciclina (ΔTc , Fellay, 1987) en el sitio de restricción Xma, generándose el vehículo intermediario pG2 ΔTc .

La transferencia de esta mutación se hizo de acuerdo al concepto de "plásmido suicida" (Beringer, 1978), que dice que aquellos plásmidos cuyos orígenes de replicación no son reconocidos en un fondo genético determinado, como es el caso de plásmidos derivados de ColE1 en Rhizobium y Agrobacterium, podrán estabilizarse solo si recombina con regiones homólogas del genoma de la cepa receptora (recombinación sencilla). El resultado de esta recombinación es la cointegración del plásmido con el genoma. Cuando ocurre una segunda recombinación (doble recombinante) entre la región silvestre y la región mutada del plásmido, se genera un intercambio de secuencias homólogas,

quedando mutada la región silvestre. Como resultado de esta segunda recombinación, el plásmido introducido se escinde y se pierde en la población.

En este trabajo, la obtención de una doble recombinante a partir del pG2 Δ Tc se dificultó por los tres motivos siguientes: primero, el pG2 Δ Tc carece de los genes necesarios para su movilización (función mob) y transferencia (función tra). Los genes que confieren ambas funciones deben ser compatibles con el plásmido por transferir. Para el pG2 Δ Tc se requieren funciones mob y tra compatibles con plásmidos derivados de ColE1. Este problema fue resuelto manteniendo al pG2 Δ Tc en presencia del plásmido pGJ28 que posee la región mob de ColE1 (Warren, 1980) y el plásmido pR64drd11 (Willetts, 1980) cuyas funciones tra son compatibles con derivados de ColE1 (fig.9). Esta técnica fue utilizada para Agrobacterium por Van Haute y colaboradores (1983).

Segundo, no se obtuvieron recombinantes sencillas usando como receptor a la cepa CFN 299. Este problema fue resuelto utilizando como receptor a la cepa de Agrobacterium que contiene al pSim de la CFN 299 (cepa Ac).

Tercero, una vez obtenida la recombinante sencilla, la frecuencia con que se genera la segunda recombinación resultó ser excesivamente baja, razón por lo cual no se pudo obtener una doble recombinante por el método de selección negativa. Debí implementar entonces una estrategia que me permitiese seleccionar

positivamente a las dobles recombinantes. Este problema fue resuelto insertando al pG2 λ Tc un cassette que confiere sensibilidad a sacarosa (cassette Sac), generándose el vehículo intermediario pMAS-T23 (fig.8b). Este cassette contiene, entre otros genes, a los genes sacR y sacB de *Bacillus subtilis*; las cepas bacterianas que contengan estos dos genes mueren si son cultivadas en un medio de cultivo con 5% de sacarosa. De este modo, las recombinantes sencillas del pMAS-T23 mueren en presencia de 5% de sacarosa. En cambio, durante la segunda recombinación el vehículo se pierde (y con él se pierde también el cassette Sac), lo que permite a las dobles recombinantes crecer en presencia de sacarosa. De esta manera la selección de dobles recombinantes es sumamente fácil: basta crecer un cultivo denso de la recombinante sencilla en un medio sin sacarosa, después hacer diluciones del cultivo e incubarlo en presencia de sacarosa al 5%. Las colonias que aparezcan se prueban para la pérdida de las resistencias del vehículo, excepto Tc en este caso, y las que hayan perdido estas resistencias serán dobles recombinantes. La fig.10a muestra la recombinación sencilla, esto es, la integración del pMAS-T23 al pSim de la Ac. En la fig.10b la generación de una doble recombinante (cepa AC-54). Las frecuencias de recombinación sencilla y doble las presento en la tabla 4.

Para saber el efecto que pudiera tener en la simbiosis la secuencia mutada, era importante transferir el pSim mutado a su

fondo genético natural, la cepa CFN 299. Este pSim se transfiere por sí solo a baja frecuencia, por lo que bastó conjugar a la cepa Ac-54 con la cepa CFN 299-4, que es una derivada de la CFN 299 que contiene una inserción de Tn5 en el cromosoma, y después seleccionar las transconjugantes que sean resistentes a Kan y Tc. Seleccione a una de estas transconjugantes para los experimentos de nodulación (cepa CFN 299-6, fig. 10c).

Para determinar el fenotipo simbiótico de la cepa CFN 299-6, se crecieron a las plantas de frijol en frascos de 1 lt. que contienen vermiculita y solución nutritiva sin nitrógeno. Después de 14 días se determinó la fijación de nitrógeno, peso de la raíz, peso de nódulos y número de nódulos por planta. Los resultados de este experimento se muestran en la fig. 11.

Se observa que el peso seco de la raíz es idéntico para las plantas inoculadas con una u otra cepa. La fijación de nitrógeno medida por actividad específica (por peso de nódulo) es semejante en ambas cepas; sin embargo, en la fijación de nitrógeno medida por planta, la mutante fija solo el 50% con respecto a la silvestre. El peso de los nódulos de la CFN 299-6 es el 50% (en peso total) al de la CFN 299-4. En cuanto al número de nódulos, la CFN 299-6 induce solamente el 50% con respecto a la CFN 299-4. Los datos de la fig. 11 son el resultado de cuatro experimentos independientes. La desviación estándar presentada en la fig. 11 es el promedio de las desviaciones estándar resultantes en cada experimento.

DISCUSION

Rhizobium, así como otros microorganismos que interaccionan con plantas, producen compuestos que en la planta funcionan como hormonas, por lo que se concibe a esta producción hormonal como una señal que utiliza la bacteria durante su relación con la planta.

Por ejemplo, en Pseudomonas savastanoi y Agrobacterium se ha comprobado que estos compuestos se requieren para alterar los balances hormonales de la planta, dando lugar al efecto tumorigénico.

Es por ello que en Rhizobium, que pertenece a la misma familia de Agrobacterium y que también establece una estrecha interrelación con la planta, se piense que los compuestos hormonales que secreta inciden en su relación con la planta, esto es, durante la simbiosis. Desafortunadamente, aún se carece de suficiente evidencia que lo confirme.

Si analizamos los dos primeros estadios de la interacción simbiótica observaremos que se inducen dos efectos de división celular a distancia, el primero en la corteza externa y luego en células de la corteza interna. Existen datos que sugieren que este efecto bien pudiera estar mediado por hormonas de origen bacteriano. Por ejemplo, Bauer y colaboradores (1985) encontraron que Rhizobium induce un gran número de sitios susceptibles de in-

fección (esto es, grupos de células corticales en división) sin que hubiese contacto directo entre la raíz y la bacteria y esta inducción es especie específica. Asimismo observaron que el compuesto benziladenina (citocinina) provoca este mismo efecto. Por otro lado, Long y colaboradores (1988) lograron inducir estructuras pseudonodulares en presencia de zeatina, como sustituto de los genes nod comunes A y B.

En este trabajo se reporta la presencia de una secuencia homologa al gene 2 de Agrobacterium tumefaciens en el plásmido simbiótico de la cepa CFN 299. Ya antes se había reportado la presencia de secuencias homólogas al pTi en los plásmidos simbióticos de Rhizobium de crecimiento rápido (Prakash, 1982), aunque no fue determinada la naturaleza de estas secuencias. Con respecto a los genes chvA y chvB y sus homólogos en Rhizobium ndvA y ndvB, estos son cromosomales y aunque son necesarios para la infección, sus efectos son pleiotrópicos sobre otras funciones de la célula que no están relacionados con el proceso infectivo per se.

En cambio, en este trabajo reporto una secuencia en el pSim de la cepa de R. phaseoli tipo 2 CFN 299 que es homóloga al gene 2 del T-DNA, cuya función se conoce. Esto pudiera ser entonces el primer gene involucrado en nodulación en que se conociera al producto que codifica. La indolacetamida hidrolasa codificada por el gene 2 del T-DNA cataliza la formación del ácido indol-3-acético a partir de indolacetamida. Aunque aún no lo he

demostrado, ésto nos sugiere que el producto de la secuencia homóloga del Rhizobium interviene en la biosíntesis de IAA. Para saberlo, será necesario medir su actividad enzimática ya sea en el Rhizobium o en E. coli que contenga clonada esta secuencia. Aun sabiendo que este producto es capaz de sintetizar IAA, no significaría que in vivo fuese el IAA el producto de la reacción. Por ejemplo, en Agrobacterium tumefaciens se ha encontrado que la indolacetamida hidrolasa también utiliza como sustrato al compuesto alfa-naftalen acetamida, y el producto de esta reacción tiene actividad auxínica (Inzé, 1984).

El objetivo de este trabajo es demostrar la participación de esta secuencia en la simbiosis. La estrategia utilizada para demostrarlo fué la siguiente: mutar a la secuencia y observar qué evento de la simbiosis es afectado.

La mutagénesis representó un serio problema debido a dificultades en los eventos de transferencia y recombinación del pG2. El problema fué resuelto complementando en trans las funciones compatibles de movilización y transferencia. Este sistema es de gran utilidad para transferir plásmidos derivados de ColE1 que carecen de las funciones mob y tra.

Otro problema representó la selección de las dobles recombinantes debido a la baja frecuencia de recombinación. Sin embargo, este problema fué resuelto insertando en el pG2::Tc un cassette que confiere sensibilidad a sacarosa. Esto permitió seleccionar positivamente a las dobles recombinantes. Esta estrategia

es una excelente alternativa para la selección de dobles recombinantes.

Una vez obtenida la mutante (cepa CFN 299-6), se le probó para nodulación. Los nódulos de la mutante aparecieron al mismo tiempo que los de la silvestre, y sus nódulos son normales en tamaño y en su capacidad de fijar nitrógeno, lo que indica que se mantienen intactas todas las funciones necesarias para formar un nódulo normal. El peso seco de las raíces infectadas con la mutante o la silvestre fue idéntico; esto nos dice que la presencia de esta secuencia no estimula el crecimiento de la raíz. Sin embargo, la mutante indujo sólo un 50% de nódulos con respecto a la silvestre.

Así pues, la función de la secuencia homóloga al gene 2 de Agrobacterium incide en la capacidad de la cepa CFN 299 de inducir un mayor número de nódulos.

Como lo describí anteriormente, Rhizobium induce en la raíz un gran número de sitios susceptibles de ser infectados. Estos sitios aparecen como grupos de células corticales en división; de todos estos sitios susceptibles, sólo un pequeño número forma nódulos. El proceso inhibitorio que impide que se formen demasiados nódulos se conoce como "autorregulación" y está determinado por la planta (Pierce, 1983; Rolfe, 1988). Este proceso probablemente evita que se drene demasiado fotosintato hacia los nódulos, lo que acarrearía problemas nutricionales para el resto de la planta. Carroll (1985) reporta una mutante de soya alterada

en el sistema de autorregulación (supernodulante). En chícharo se ha reportado una mutante con características similares a la de soya (Jacobsen, 1984).

Ahora bien, una hipótesis sobre la función de esta secuencia homóloga al gene 2 es que contiene con el sistema de autorregulación de la planta, manteniendo en estado "infectable" a un mayor número de sitios. Esto lo podría llevar a cabo controlando los balances hormonales que mantiene a las células corticales en actividad meristemática. En un futuro, pienso hacer experimentos tendientes a demostrar si esto es cierto o no.

Solo los Rhizobium phaseoli tipo 2 y la cepa CFN 244 (que es un aislamiento natural de Macroptilum gibosifolium y que nodula a Phaseolus vulgaris) poseen una secuencia homóloga al gene 2 de Agrobacterium. Se pregunta uno si el pSim de estos Rhizobium son más cercanos al pTi de Agrobacterium que los pSim de los demás Rhizobium. Esto resulta posible si se piensa en el hecho de que no sólo existe una secuencia homóloga al gene 2, sino también al gene 5 del T-DNA (E. Martínez, comunicación personal) y no es improbable que la homología se extienda a otros genes. Sin embargo, por qué los demás Rhizobium no comparten esta secuencia?. Probablemente se deba a que existen varias estrategias de infección entre los Rhizobia y por ello utilizan genes distintos o bien, existen genes que son heterólogos a nivel de secuencia nucleotídica, pero que son homólogos funcionalmente al producto

del gene 2.

Por otro lado, es importante conocer la secuencia nucleotídica de este gene y de su zona promotora, pues recordemos que el gene 2 del T-DNA posee un promotor eucariote, no así el gene *iaaH* de *P. savastanoi*. La secuencia nucleotídica también nos hablaría sobre la divergencia de este gene en Rhizobium, Agrobacterium y Pseudomonas.

También creo importante conocer la regulación de la expresión del producto de esta secuencia. Todo ello nos ayudaría a entender con mayor exactitud la función que desempeña este gene una vez en contacto con la planta.

TABLA I.

Gene	Fenotipo en cepas de <u>Rhizobium</u>		
	<u>R. leguminosarum</u>	<u>R. trifolii</u>	<u>R. meliloti</u>
nod A	Hac ^{- a}	Hac ⁻	Hac ⁻
nod B	Hac ⁻	Hac ⁻	Hac ⁻
nod C	Hac ⁻	Hac ⁻	Hac ⁻
nod D	Hac ⁻	Hac ⁻	Retraso ^b
nod E	Retraso	Retraso *	Retraso
nod F	_____	Retraso *	Retraso
nod G	_____	_____	Retraso
nod H	_____	_____	Hac ^{- *}
nod I	Retraso	Infección defectuosa	_____
nod J	Retraso	Infección defectuosa	_____
nod L	_____	Hac ⁻	_____
nod M	?	?	_____
nod O	_____	Nod ^{- **}	_____
nod X	Nod ^{- **}	_____	_____

- NOTAS: a) Hac⁻ .- Enroscamiento del pelo radicular.
 b) Retraso.- Retraso en la nodulación.
 *) Nod⁺ en chícharo.
 **) En chícharos Afganistán.

Type of hormone (showing a representative example of each class)

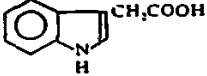
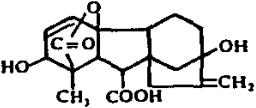
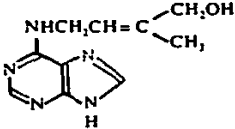
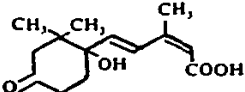
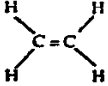
Type of hormone (showing a representative example of each class)	Chemical structure	Cell elongation	Cell division	Induction of primary vascular tissue	Induction of secondary vascular tissue	Root and shoot initiation	Breaking of seed dormancy	Senescence	Abscission of flowers, fruits and leaves	Fruit growth	Sex expression	Control of stomatal aperture
Auxins Indole-3-acetic acid (IAA)		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
Gibberelins Gibberellic acid (GA ₃)		✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
Cytokinins Zeatin			✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
Inhibitors Abscisic acid (ABA)		✓				✓	✓	✓	✓			✓
Ethylene		✓	✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓	

Tabla II. Esquema general de las principales hormonas en plantas y su efecto en el crecimiento y desarrollo.

(Hall, 1984).

TABLA III

Cepas y plásmidos utilizados y construídos en este trabajo.

CEPAS	GENOTIPO	REFERENCIA
<u>E. coli</u> HB101	F ⁻ , hsdR, hsdM, recA ⁻ , S ⁿ ^r .	Maniatis, 1982.
<u>R. phaseoli</u> CFN 299	Acido y aluminio resistente Na ^r .	Martínez, 1987.
CFN 299-4	Derivada de la CFN 299 con una inserción Tn5 en el cromosoma.	Martínez (no publicado).
CFN 299-6	Derivada de la CFN 299-4 (omega-Tc en el pSim).	Este trabajo.
<u>Agrobacterium</u>		
GMI9023	<u>A. tumefaciens</u> sin plásmi- dos, S ^m ^r , Rif ^r .	Rosenberg, 1984.
Ac	Derivada de la GMI9023 que contiene el pSim de la CFN 299.	Martínez, 1987.
Aa	Derivada de la GMI9023 que contiene al plásmido a de la CFN 299, Km ^r por un Tn5 en el plásmido a.	Martínez, 1987.
Ab	Derivada de la GMI9023 que contiene al plásmido b de la CFN 299, Km ^r por un Tn5 en el plásmido b.	Martínez, 1987.
Ac-54	Derivada de la Ac con una inserción omega-Tc en el pSim de la CFN 299.	Este trabajo.
<u>PLASMIDOS</u>		
pG2	Derivado del pCK7 que contiene al gene 2 del T-DNA de <u>A. tumefaciens</u> , Km ^r .	Inzé, 1985
PHP-45 omegaTc	Derivado del PHP45 (Prentki, 1984) que lleva el cassette omega-Tc de 2Kb.	Fellay, 1987.
pGUS3	Derivado del pUCD800	D. Romero (no publicado).
pG2 omegaTc	Derivado del pG2 con una inserción omega-Tc en el gene 2.	Este trabajo.

TABLA III (continuación)

pMAS-T23	Derivado del pG2 omegaTc con una inserción del cassette Sac en el sitio de BamHi del pG2.	Este trabajo.
pGJ28	Derivado de Co1D que lleva clonadas las funciones mob de Co1E1.	Van Haute, 1983.
pR64drd11	Sm ^r , Tc ^r , Inc I alfa.	Warren, 1980.

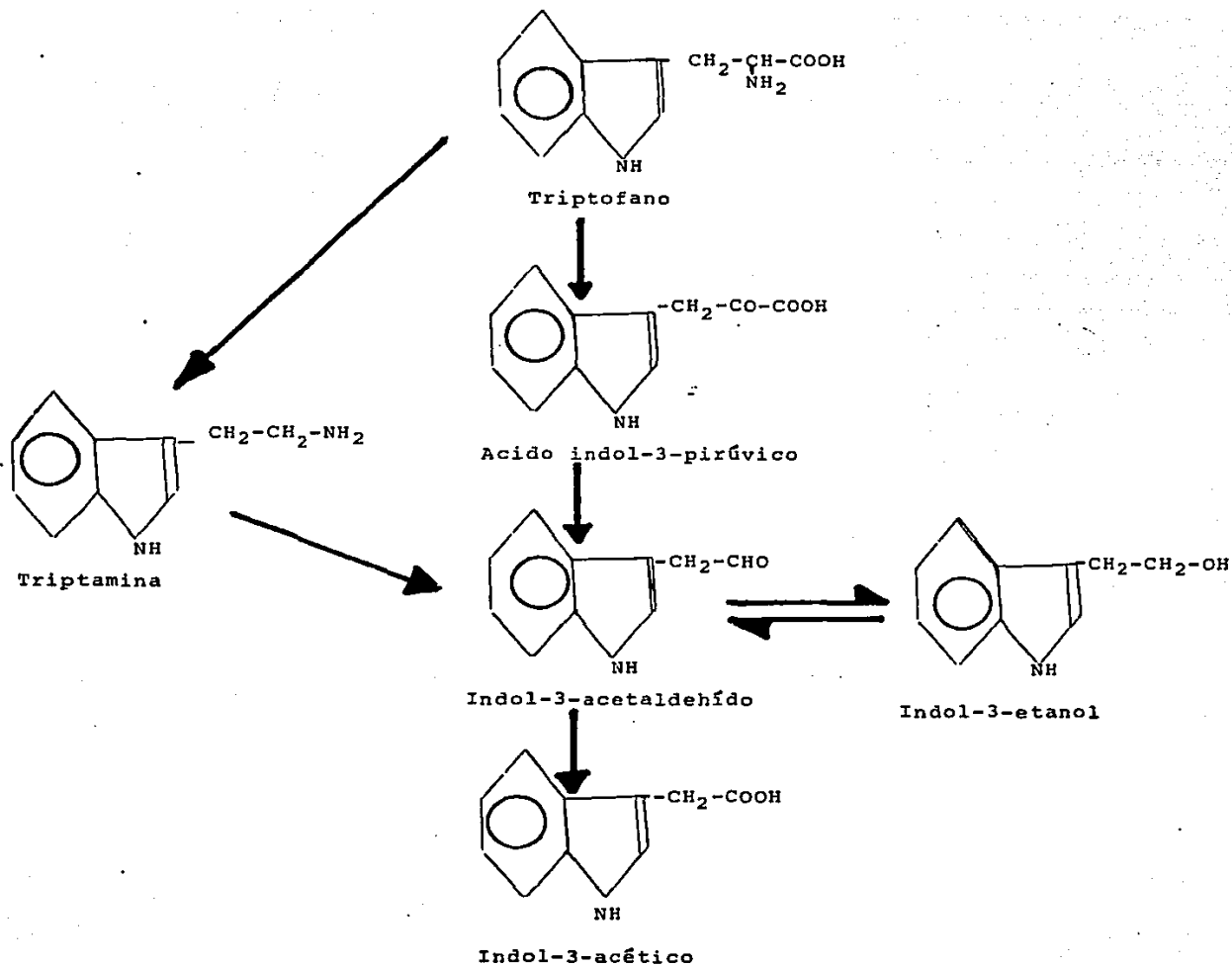


Fig.1. Principales vías de biosíntesis de IAA en plantas.

Fig. 2

Representación del plásmido T_i de A. tumefaciens C₅₈.

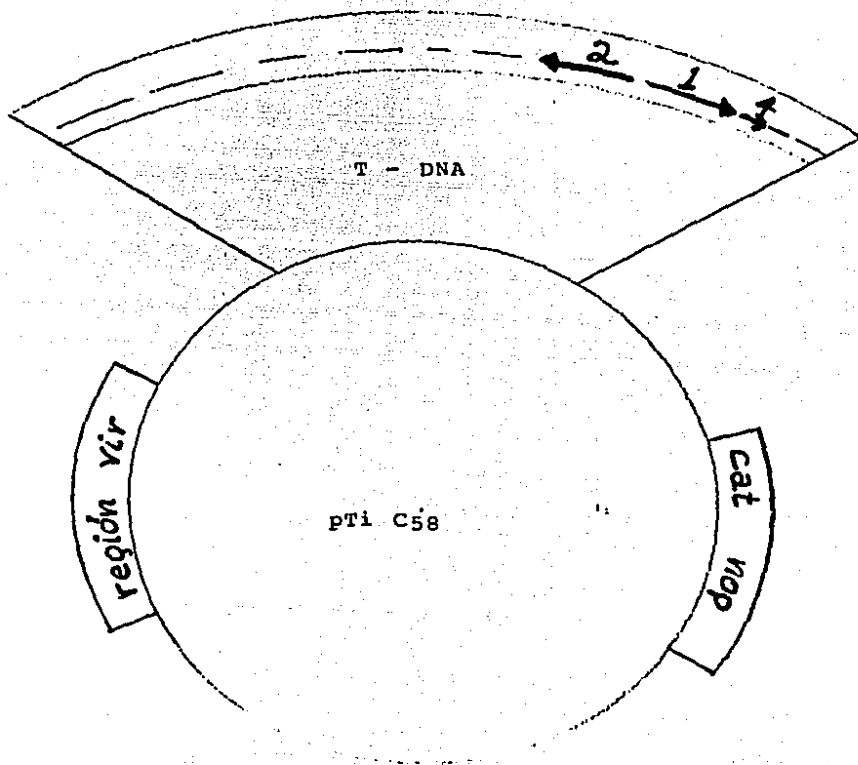
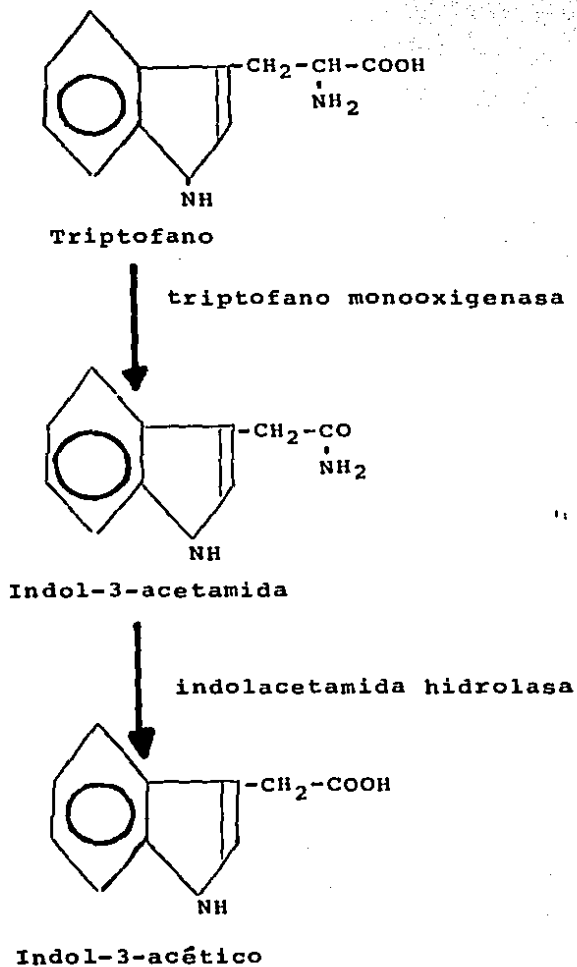
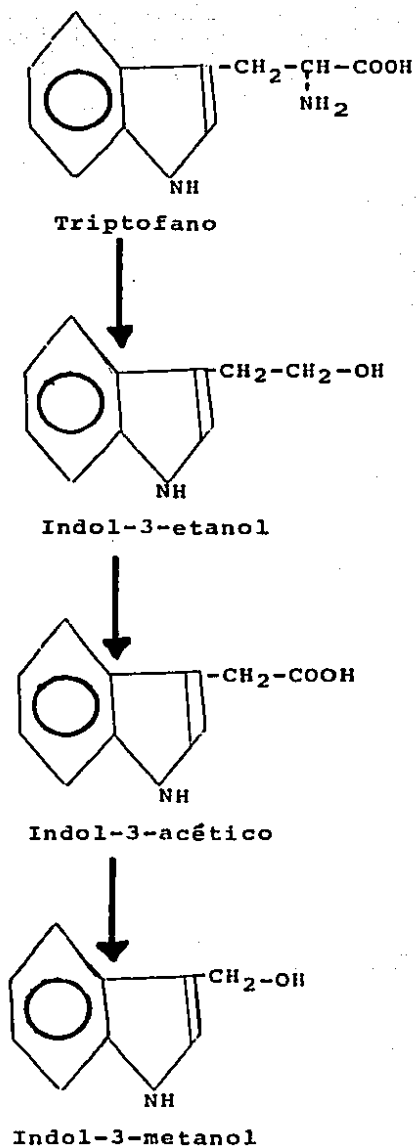


Fig.3. Biosíntesis de IAA por P. savastanoi y A. tumefaciens.*



* Ref. Kosuge, 1982; Scroder, 1984.

Fig.4. Biosíntesis de IAA en R. phaseoli (tipo 1) en vida libre. *



* Ernstsén, 1987.

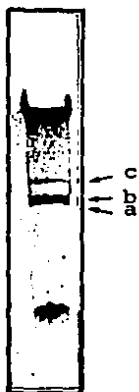


Fig.5. Perfil de plásmidos de la cepa CFN299 obtenido por la técnica de Eckhardt (1978).

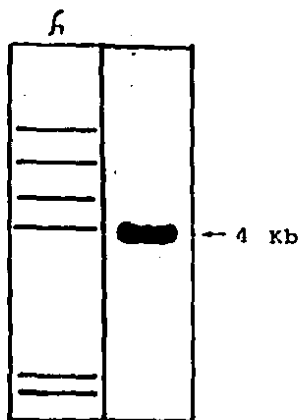


Fig.6. Hibridización del pG2 en genoma de la CFN 299 digerido con Bam-HI. En EcoRI hibridiza un fragmento del mismo tamaño (4Kb). λ = fago Lambda digerido con -- Hind III.

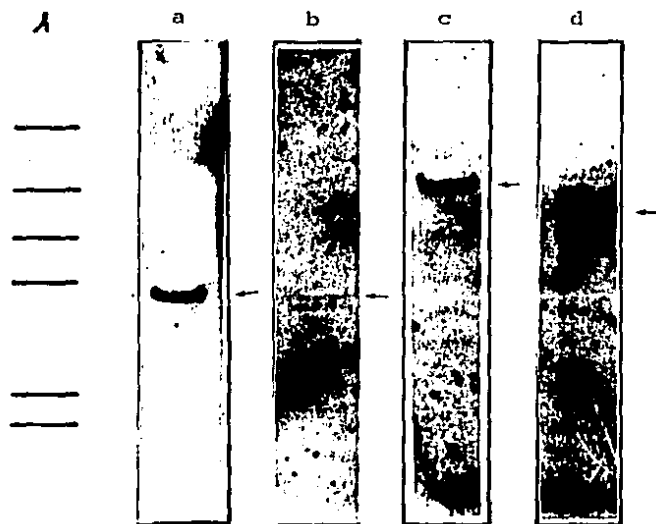


Fig.7. Hibridización del pG2 en genomas de las cepas: a)CFN 299, b)Ac, c)Aa y d)Ab. En (a) y (b) las flechas indican hibridización del gene 2. En (c) y (d) las flechas indican hibridización con Tn5 (gene de Km).Hibridización en condiciones laxas (2XSSC,55 °C).

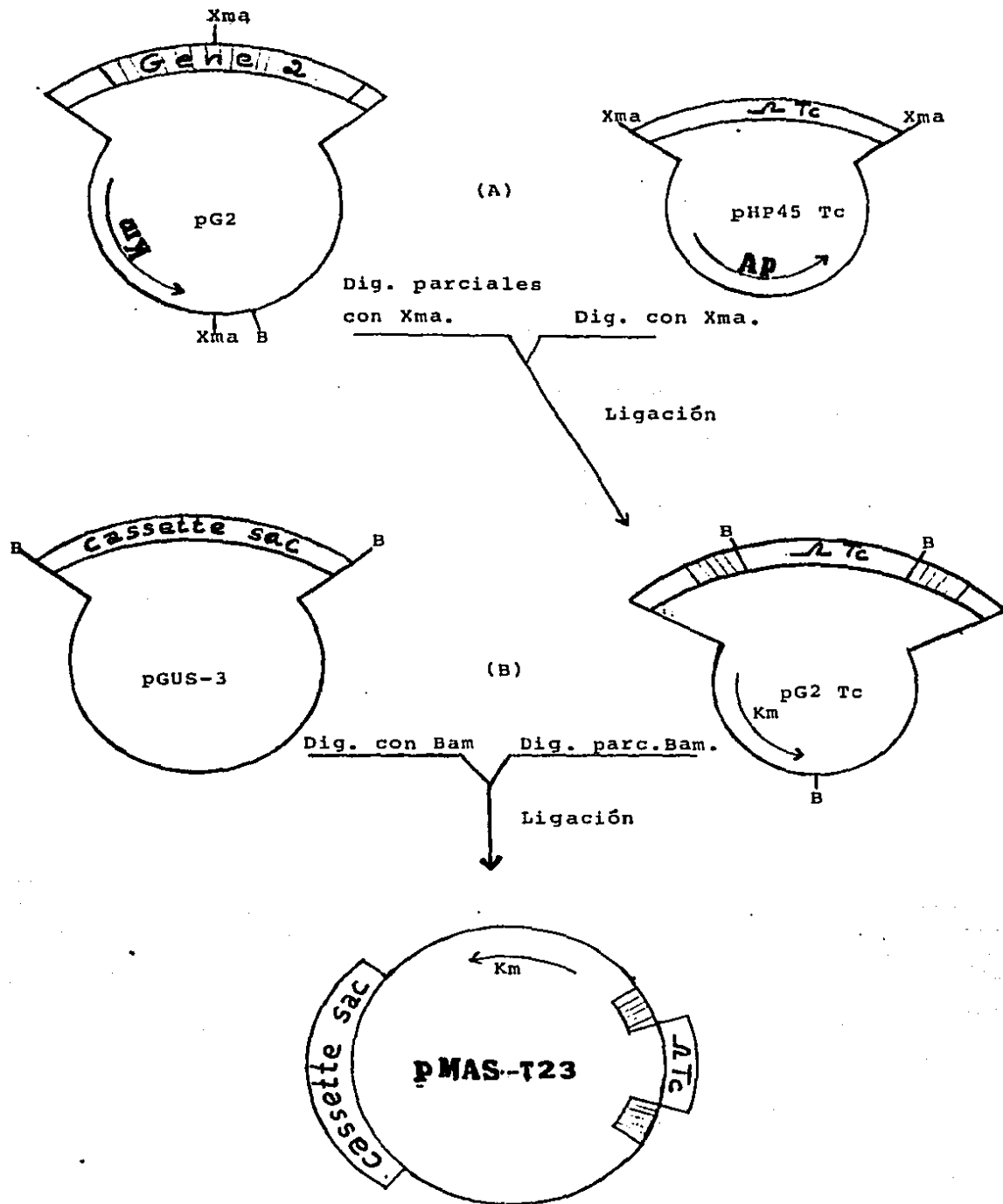
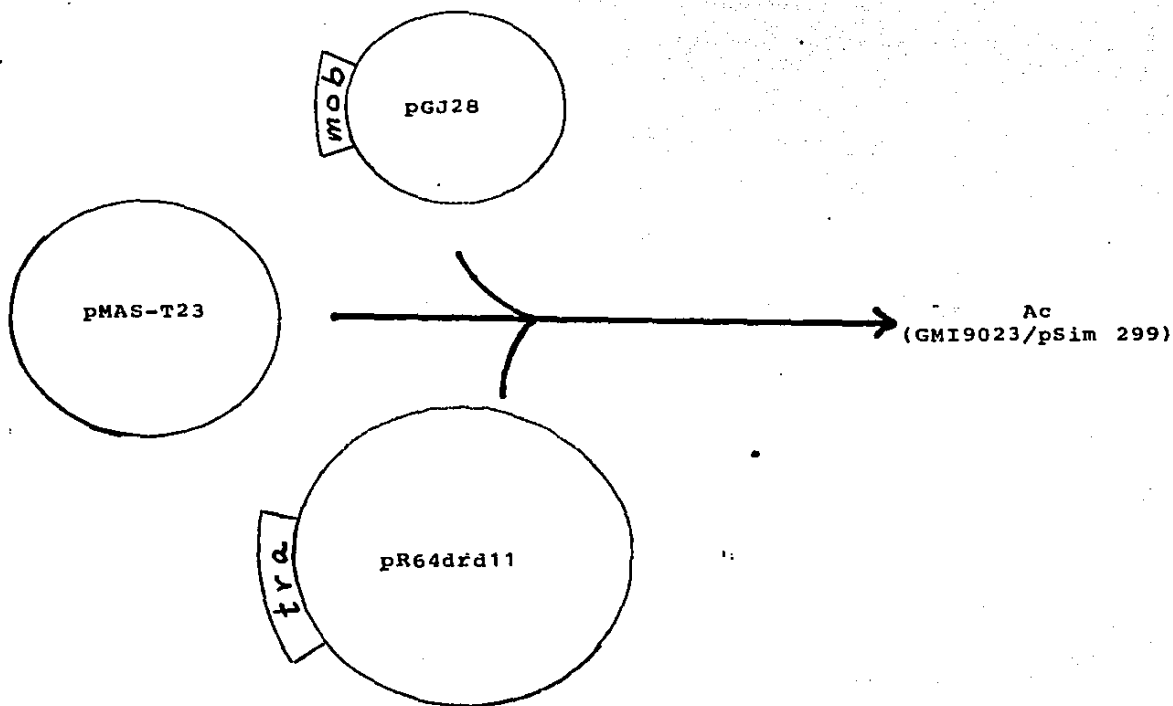


Fig.8. Construcción del vehículo intermediario pMAS-T23.

FIG. 9

Sistema de transferencia del pMAS-T23 a la cepa Ac.



ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

TABLA IV

Frecuencia de recombinación de la cepa Ac con el pMAS-T23.

Cepa	Recombinación sencilla	Recombinación doble.
Ac	1.5×10^{-9}	5.0×10^{-5}
C58*	6.0×10^{-8}	2.5×10^{-4}

* Reportado para la recombinación 100% homóloga en *A. tumefaciens* (van Haute 1983).

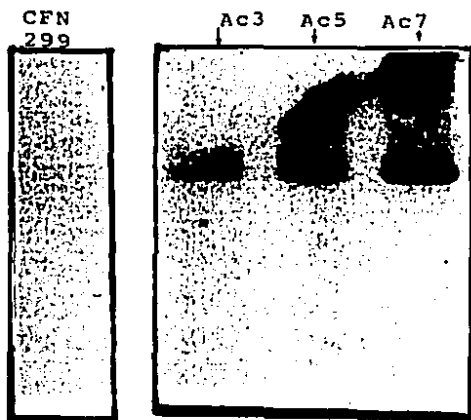


Fig.10 (A).Hibridización del pG2 en perfiles de plásmidos de recombinantes sencillas (cointegración del pMAS-T23) independientes en la cepa Ac.Condiciones de hibridización estricta (para alta homología).

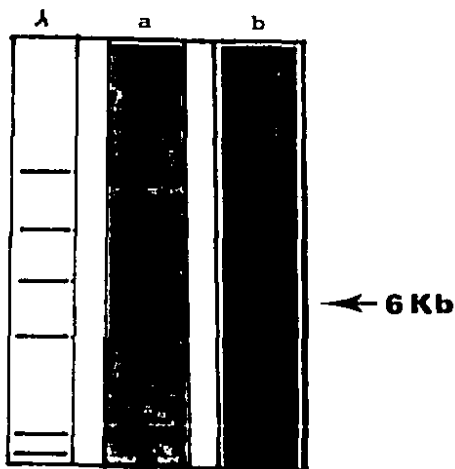


Fig.10 (B).Hibridización del pG2 (a) y Tc (b) en el genoma de la doble recombinante Ac-54 digerido con EcoR1.En la doble recombinante se genera un fragmento de 6-Kb (por las 2 Kb del cassette de Tc).Este fragmento de 6Kb fué clonado en el pUC19 y usado como detector en el experimento de la fig.10(C).

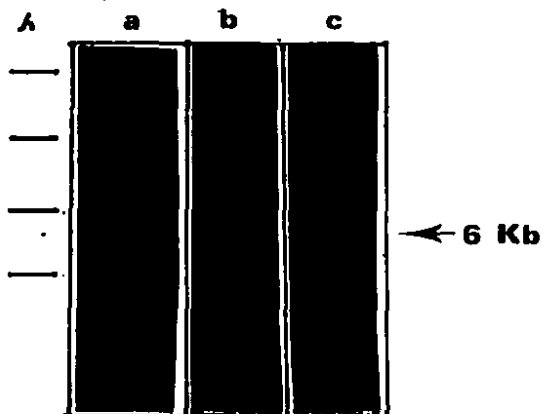


Fig.10 (C).Hibridización del fragmento de 6Kb (fig.10B) en los genomas de las cepas: a)CFN 299-4; b) Ac-54 y c) CFN 299-6. La cepa CFN 299-6 corresponde a una transconjugante de la CFN 299-4 que recibió el pSim mutado de la Ac-54.

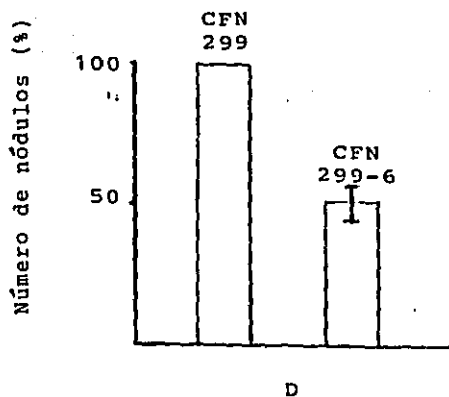
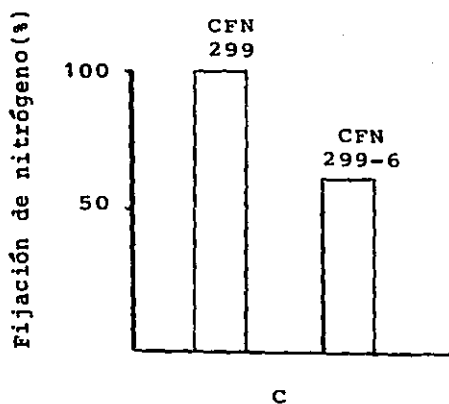
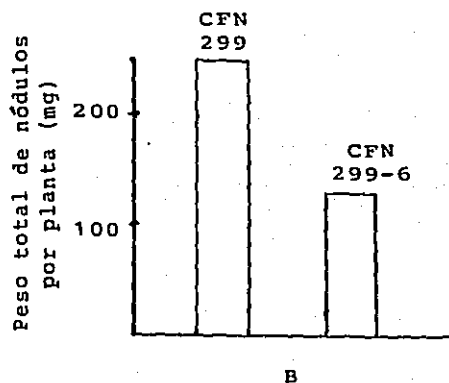
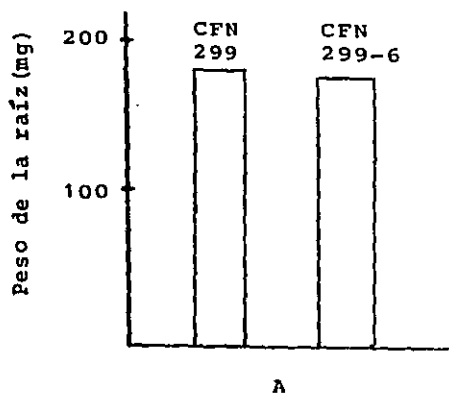


Fig. 11. Nodulación de la CFN 299-6. (A) Peso de la raíz por planta; (B) Peso de nódulos por planta; (C) Porcentaje de fijación de nitrógeno; (D) Número de nódulos (porcentaje por planta).

REFERENCIAS

Bauer, W. D., Bhuvanewari, T. V., Calvert, H. E., Law, I. J., Malik, H. A. S., Vesper, S. J. (1985). "Recognition and infection by slow-growing rhizobia". In Nitrogen Fixation Research Progress. Ed. H. J. Evans, P. J. Bottomley and W. E. Newton; pp. 247. Amsterdam; Martinus Nijhoff.

Badenoch-Jones, J., Summons, R. E., Djordjevic, M. A., Shine, J., Letham, D. S., Rolfe, B. G. (1982). "Mass spectrometric quantification of indole-3-acetic acid in Rhizobium culture supernatants: relation to root hair curling and nodule initiation". Appl. Envir. Microbiol. vol. 44, No. 2; pp. 275.

Badenoch-Jones, J., Parker, C. W., Letham, D. S. (1987). "Phytohormones, Rhizobium mutants, and nodulation in legumes. VII. Identification and quantification of cytokinins in effective and ineffective pea root nodules using radioimmunoassay". J. Plant Growth Regul. 6; pp. 97.

Beringer, J., Beynon, J. L., Buchanan-Wollaston, A. V., Johnston, A. W. B. (1978). "Transfer of the drug-resistance transposon Tn5 to Rhizobium". Nature (London) 276; pp. 633.

Birnboim, H., Doly, L. (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA". Nucl. Ac. Res. 7; pp.1513.

Bolton, G.W., Nester, E.W., Gordon, M.P. (1986). "Plant phenolic compounds induce expression of the Agrobacterium tumefaciens loci needed for virulence". Science 232; pp.983.

Borthakur, D., Downie, J.A., Johnston, A.W.B., Lamb, J.W. (1985). "psi, a plasmid-linked Rhizobium phaseoli gene that inhibits exopolysaccharide production and which is required for symbiotic nitrogen fixation". Mol. Gen. Genet. 200 ; pp.278.

Breathnach, R., Chambon, P. (1981). Ann. Rev. Biochem. 50; pp.349.

Brom, S., Martinez, E., Davila, G., Palacios, R. (1988). "Narrow and broad host range symbiotic plasmids of Rhizobium spp. strains that nodulate Phaseolus vulgaris". App. Env. Microbiol. vol. 54, No.5; pp.1280.

Brown, M.E., Burlingham, S.K. (1968). "Production of plant growth substances by Azotobacter chroococcum". J. Gen. Microbiol. 53; pp.135.

Brown, M.E. (1972). "Plant growth substances produced by microorganisms of soil and rhizosphere". J. Appl. Bact. 35; pp.443.

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. 30; pp.2375.

Carroll, B. J., McNeil, D. L., Gresshoff, P. M. (1985). "A supernodulation and nitrate-tolerant-symbiotic (nts) soybean mutant". Plant Phys. 78 ; pp.34.

Chen, H., Batley, M., Redmond, J. W., Rolfe, B. G. (1985). "Alteration of the effective nodulation properties of a fast-growing broad host range Rhizobium due to changes in exopolysaccharide synthesis". J. Plant Physiol. 120 ; pp.331.

Cleland, R. (1973). "Auxin-induced hydrogen ion excretion from *Avena* coleoptiles". P. N. A. S. (USA) 70; pp.3092.

Comai, L., Kosuge, T. (1982). "Cloning and characterization of *iaaM*, a virulence determinant of *Pseudomonas savastanoi*". J. Bact. vol. 149, No. 1; pp.40.

Crafts, C. B., Miller, C. O. (1974). "Detection and identification of cytokinins produced by mycorrhizal fungi". Plant Physiol. 54; 586.

Dazzo, F., Truchet, G. L., Sherwood, J. E., Hrabak, E. M., Gardiol, A. E. (1982) "Alteration of the trifolium A-binding capsule of *Rhizobium tri-*

folii 0403 by enzymes released from clover roots". Appl. Environ. Microbiol. 44 ; pp.478.

Djordjevic, M.A., Redmond, J.W., Batley, M., Rolfe, B.G. (1987b). "Clovers secrete specific phenolic compounds which stimulate or repress nod gene expression in Rhizobium trifolii". EMBO J. 6 ; pp.1173.

Douglas, C.J., Staneloni, R.J., Rubin, R.A., Nester, E.W. (1985). J. Bact. 161 ; pp.850.

Dylan, T., Ielpi, L., Stanfield, S., Kashyap, L., Douglas, C., Yanofsky, M., Nester, E., Helinski, D.R., Ditta, G. (1986). "Rhizobium meliloti genes required for nodule development are related to chromosomal virulence genes in Agrobacterium tumefaciens". P.N.A.S. 83; pp.4403.

Eckhardt, T. (1978). "A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria". Plasmid 1 ; pp.584.

Egelhoff, T.T., Long, S.R. (1985). "Rhizobium meliloti nodulation genes: identification of nod DABC gene products, purification of nod A protein and expression of nod A in Rhizobium meliloti". J. Bact. 164 ; pp.591.

Einset, J.W., Skoog, F.K. (1977). "Isolation and identification of ribosyl-cis-zeatin from transfer RNA of Corynebacterium

fascians". Biochem. Biophys. Res. Commun. 79 ; pp.1117.

Elkan, G.H. (1984). Biological Nitrogen Fixation: Alexander, M. (ed).

Ernstsen, A., Sandberg, G., Crozier, A., Wheeler, C.T. (1987). "Endogenous indoles and the biosynthesis and metabolism of indole-3-acetic acid in cultures of Rhizobium phaseoli". Planta 171 ; pp.422.

Evans, M.L. (1974). "Rapid responses to plant hormones". Ann. Rev. Plant Phys. 25; pp.195.

Fellay, R., Frey, J., Krisch, H. (1987). "Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for in vitro insertional mutagenesis of Gram-negative bacteria". Gene 52; pp.147.

Fett, W.F., Osman, S.F., Dunn, M.F. (1987). "Auxin production by plant-pathogenic Pseudomonads and Xanthomonads". Appl. Env. Microbiol. vol. 53, No. 8; pp.1839.

Finan, T.M., Hirsch, A.M., Leigh, J.A., Johansen, E., Kuldau, G.A. (1985). "Symbiotic mutants of Rhizobium meliloti that uncouple plant from bacterial differentiation". Cell 40 ; pp.869.

Fox, J. E., Erion, J. L. (1975). "A cytokinin binding protein from higher plant ribosomes". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 64 ; pp.694.

Hager, A., Menzel, H., Krauss, A. (1971). "Experiments and hypothesis concerning the primary action of auxin in elongation growth". *Planta* 100 ; pp.47.

Hall, M. A. (1984). "Developmental control in animals and plants". Ed. Graham, C. F., Wareing, P. F.; Blackwell Scientific Publications, G. B. Ch. 5-3 ; pp.313.

Hollis, A. B., Kloos, W. E., Elkan, G. H. (1981). *A. Gen. Microbiol.* 123; pp.215.

Hooykaas, P. J. J., van Brussel, A. A. N., den Dalk-Ras, H., van Slog Teren, G. M. S., Schilperoort, R. S. (1981). *Nature* 291; pp.351.

Inzé, D., Follin, A., Van Lijsebettens, M., Simoens, C., Genetello, C., Van Montagu, M., Schell, J. (1984). "Genetic analysis of the individual T-DNA genes of *Agrobacterium tumefaciens*; further evidence that two genes are involved in indole-3-acetic acid synthesis". *Mol. Gen. Genet.* 194 ; pp.265.

Jacobsen, E., Feenstra, W. J. (1984). "A new pea mutant with efficient

nodulation in the presence of nitrate". Plant Sci. Lett. 33 ; pp.337.

Kaiss-Chapman, R.W., Morris, R.O. (1977). "Trans-zeatin in culture filtrates of Agrobacterium tumefaciens". Biochem.Biophys.Res. Commun. 76 ; pp.453.

Lichtenstein, C. (1986). "A bizarre vegetal bestiality". Nature 322 ; pp.682.

Long, S.R., Cooper, J. (1988). "Overview of Symbiosis". Molecular Plant-Microbe Interactions (enviado a publicacion).

Martínez, E., Pardo, M.A., Palacios, R., Cevallos, M.A. (1985). " Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of Rhizobium in nodulation and nitrogen fixation in Phaseolus vulgaris". J. Gen. Microbiol. 131 ; pp.1779.

Martínez, E., Palacios, R., Sánchez, F. (1987). "Nitrogen-fixing nodules induced by Agrobacterium tumefaciens harboring Rhizobium phaseoli plasmids". J. Bact. vol. 169, No. 6 ; pp.2828.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982). "Molecular cloning". Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.

Nishinari, N., Syono, K. (1980). "Changes in endogenous cytokinin levels in partially synchronized cultured tobacco cells". *Plant Physiol.* 65 ; pp.437.

Pierce, M., Bauer, W.D. (1983). "A rapid regulatory response governing nodulation in soybean". *Plant Physiol.* 73 ; pp.286.

Prentki, P., Krisch, H.M. (1984). "In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment". *Gene* 29; pp.303.

Puvanesarajah, V., Schell, F.M., Stacey, G., Douglas, C.J., Nester, E.W. (1985). "Role for 2-linked-beta-D-glucan in the virulence of Agrobacterium tumefaciens". *J.Bact.* 164 ; pp.102.

Quinto, C., de la Vega, H., Flores, M., Fernández, L., Ballado, T., Soberón, G., Palacios, R. (1982). "Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in Rhizobium phaseoli". *Nature* 299 ; pp.724.

Rayle, D.L. (1973). "Auxin induced H-ion secretion in Avena coleoptiles and its implications". *Pianta* 114; pp.63.

Rigby, P.W.J., Diekman, M., Rhodes, C., Berg, P. (1977). "Labelling deoxyribonucleic acid to a high specific activity in vitro by nick-translation with DNA polymerase I". *J.Mol.Biol.* 113; pp.237.

Roberts, G., Leps, W.T., Silver, L.E., Brill, W.J. (1980). "Use of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis to identify and classify Rhizobium strains". *Appl. Env. Microbiol.* 39; pp. 414.

Rolfe, B.G., Gresshoff, P.M. (1988). "Genetic analysis of legume nodule initiation". *Ann. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.* 39; pp. 297.

Rosenberg, C., Huguet, T. (1984). "The pAtC58 plasmid of Agrobacterium tumefaciens is not essential for tumor induction". *Mol. Gen. Genet.* 196; pp. 533.

Rossen, L., Shearman, C.A., Johnston, A.W.A., Downie, J.A. (1985). "The nod D gene of Rhizobium leguminosarum is autoregulatory and in the presence of plant exudates induces the expression of nod ABC genes". *EMBO J.* 4 ; pp. 3369.

Schroder, G., Waffenschmidt, S., Weiler, E.W., Schroder, J. (1984). "The T-region of Ti plasmids codes for an enzyme synthesizing indole-3-acetic acid". *Eur. J. Biochem.* 138; pp. 387.

Scott, K., Hughes, J.E., Gresshoff, P.M., Beringer, J.E., Rolfe, B.G., Shine, J. (1982). "Molecular cloning of Rhizobium trifolii genes involved in symbiotic nitrogen fixation". *J. Mol. Appl. Genet.* 1; pp. 315.

Spaink, H. P., Wijffelman, C. A., Pees, E., Okker, R. J. H., Lugtenberg, B. J. J. (1987). "Rhizobium nodulation gene nodD as a determinant of host specificity". Nature 328 ; pp.337.

Southern, E.M. (1975). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis". J.Mol.Biol.98; pp.503.

Van Haute, E., Joos, H., Maes, M., Warren, G., Van Montagu, M., Schell, J. (1983). "Intergeneric transfer and exchange recombination of restriction fragments cloned in pBR322: a novel strategy for the reversed genetics of the Ti plasmids of Agrobacterium tumefaciens". EMBO J. vol.2, No.3 ; pp.411.

Vanderhoef, L.N., Stahl, C.A. (1975). "Separation of two responses to auxin by means of cytokinin inhibition". P.N.A.S. 72 ; pp.1822.

Vasse, J.M., Truchet, G.L. (1984). "The Rhizobium - legume symbiosis: observation of root infection...". Planta 161 ; pp.487.

Vazquez, M.V. (1988). "Identificación de genes de Rhizobium phaseoli involucrados en la nodulación de Phaseolus vulgaris". Tesis para obtener el grado de maestro en Investigación Biomedica Basica. C. I. F. N., UNAM.

Verma, D.P.S., Maciachlan, G.A., Byrne, H., Ewings, D. (1975). "Regulation and in vitro translation of messenger ribonucleic acid for cellulase from auxin-treated pea epicotyls". J. Biol. Chem. 250; p.1019.

Wacek, T., Brill, W.J. (1976). "Simple, rapid assay for screening nitrogen fixing ability in soybean". Crop. Sc. 16 ; pp.519.

Wang, T.L., Wood, E.A., Brewin, N.J. (1982). "Growth regulators, Rhizobium and nodulation in peas". Planta 155 ; pp.345.

Wang, T.L., Wood, E.A., Brewin, N.J. (1982). "Growth regulators, Rhizobium and nodulation on peas. The cytokinin content of a wild-type and a Ti-containing strain of Rhizobium leguminosarum". Planta 155 ; pp.350.

Warren, G.J., Clark, A.J. (1980). "Sequence-specific recombination of plasmid ColE1". P.N.A.S. vol.77, No.11; pp.6724.

Wightman, F. (1973). "Biosynthesis of auxins in tomato shoots". Biochem. Soc. Symp. 38; pp.247.

Willetts, N., Skurray, R. (1980). "The conjugation system of F-like plasmids". Ann. Rev. Genet. 14 ; pp. 41.

Yamada, T., Palm, C. J. Brooks, B., Kosuge, T. (1985). "Nucleotide sequences of the Pseudomonas savastanoi indoleacetic acid genes show homology with Agrobacterium tumefaciens T-DNA". P.N.A.S. 82; pp.6522.

Zurkowski, W. (1982). J. Bact. 150; pp.999.