

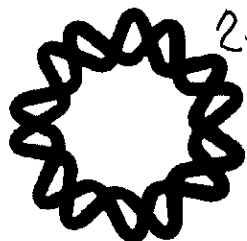


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

12/11/2001

00551



23

299031

Caracterización del gen *nolR* en *Rhizobium etli*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

PRESENTA

SELENE NAPSUCIALY MENDIVIL

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. CARMEN QUINTO HERNANDEZ

CUERNAVACA, MORELOS
NOVIEMBRE DEL 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

I.- Resumen	
II.- Introducción	1
II.1 El fenómeno de simbiosis	2
II.2 Genes de nodulación	4
II.3 Intercambio mutuo de señales	7
II.4 Estructura química y modificaciones del factor Nod y rango de hospedero	10
II.5 Reguladores y regulación de los genes <i>nod</i>	12
II.5.1 El gen <i>nodD</i>	12
II.5.2 NodD y la interacción con flavonoides	13
II.5.3 NodD como determinante de rango de hospedero	14
II.5.4 Regulación de NodD	16
II.5.5 La caja <i>nod</i> y el modelo de la activación transcripcional	17
II.5.6 Otros elementos regulatorios	18
III.- Antecedentes	21
IV.- Objetivos	25
V.- Material y Métodos	26
V.1 Bacterias y plásmidos	26
V.2 Condiciones de crecimiento bacteriano	26
V.3 Métodos de biología molecular	27
V.4 Métodos bioquímicos	33
V.5 Experimentos de nodulación	36
V.6 Inclusión de tejido en resina	37
VI.- Resultados	39
VI.1 Caracterización del gen <i>nolR</i>	39
VI.1.1 Identificación y aislamiento del gen <i>nolR</i> en <i>R. etli</i> , cepa CE3	39
VI.1.2 Clonación y secuenciación del gen <i>nolR</i>	41
VI.1.3 Distribución de <i>nolR</i> en diferentes aislados geográficos de <i>R. etli</i>	44
VI.1.4 Análisis tipo northern del gen <i>nolR</i>	44
VI.2. Mutagénesis del gen <i>nolR</i> de <i>R. etli</i> cepa CE3	48
VI.3 Análisis del fenotipo de la mutante	51
VI.3.1 Cinética de nodulación	51
VI.3.2 Análisis por microscopía de campo claro de cortes de nódulos	52
VI.3.3 Análisis de los factores de nodulación por cromatografía en capa fina (TLC)	59
VI.3.4 Análisis de los factores por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	61

VI.4 Caracterización de la proteína NolR.....	63
VI.4.1 Sobreexpresión y purificación de la proteína de fusión GST-NolR.....	63
VI.4.2 Ensayos de actividad de unión por Southwestern.....	65
VII.- Discusión.....	71
VIII.- Conclusiones.....	82
IX.- Bibliografía.....	83

I.- RESUMEN

En este trabajo presentamos la clonación y la caracterización del gen *nolR* en *Rhizobium etli* cepa CE3, así como un análisis parcial de la función de la proteína NolR.

Los datos obtenidos en este estudio, muestran que en *R. etli* el gen *nolR* se encuentra ampliamente distribuido en diferentes aislados geográficos; sin embargo su presencia en *Rhizobium tropici*, que también nodula frijol, no fue detectada. Para tratar de entender el papel que juega este gen en el proceso de la nodulación, generamos una mutante en *R. etli* CE3, por inserción de un gen de resistencia a espectinomicina y analizamos su fenotipo. La mutante *nolR*⁻ presenta: una disminución en la secreción de los factores de nodulación de ~30%, observado tanto por TLC como por HPLC con respecto a la cepa silvestre. También observamos un ligero retraso en la aparición de los nódulos por cinéticas de nodulación y por análisis histológico usando microscopía de luz. En el análisis histológico, detectamos que la división meristemática de las células del córtex es por zonas, lo que da lugar a una desorganización celular dentro del nódulo.

Por experimentos tipo Southwestern, encontramos que la proteína NolR se une de manera específica a una secuencia consenso, localizada en la región promotora del gen *nodD1*.

Finalmente, proponemos un modelo de regulación de los genes *nod* en *R. etli* CE3, que involucra elementos descritos anteriormente por nuestro grupo, así como los resultados obtenidos en esta tesis.

II.- INTRODUCCIÓN

El acceso al nitrógeno mineral, es una limitante para el crecimiento de las plantas, ya que es uno de los nutrimentos que, se requieren en mayor cantidad, y su disponibilidad en la agricultura tiene una gran influencia sobre la calidad y el rendimiento del producto. En la naturaleza, las plantas adquieren el nitrógeno por asimilación de nitrato y amonio a través de asociación con bacterias, de esta forma han evolucionado las relaciones simbióticas entre algunas plantas y una variedad de microorganismos capaces de llevar a cabo el fenómeno de fijación biológica del nitrógeno, que consiste en la reducción de nitrógeno molecular (N_2) a amonio (NH_3). Existen diversas asociaciones que tienen como consecuencia final la fijación de nitrógeno y, como factor común, poseen la característica de que el microsimbionte tiene que invadir las células más accesibles de la planta e instalarse en ellas. La interacción simbiótica mejor estudiada en donde se fija nitrógeno, se establece entre las bacterias del suelo Gram-negativas, pertenecientes a la familia *Rhizobiaceae*, y plantas superiores de la familia *Leguminosae*. Esta asociación se da con al menos 122 géneros diferentes de la familia de las leguminosas y además con algunos miembros del género *Parasponia*, una planta no leguminosa perteneciente a la familia *Ulmaceae* (119).

La relación entre *Rhizobium* y plantas leguminosas es selectiva, ya que especies individuales de rhizobia tienen distintos rangos de hospedante, permitiendo sólo la nodulación de un grupo particular de plantas. Por ejemplo, *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* nodula chícharo y *Viciae faba*, mientras que *Bradyrhizobium japonicum* nodula soya. Por otro lado, el extremo es la cepa *Rhizobium* sp. NGR234 de amplio rango de hospedero,

que nodula hasta 353 especies de leguminosas representando 122 géneros (92). En estas simbiosis existen diferencias en el proceso de infección, así como en los programas organogénéticos, lo cual se refleja en diversas características como, por ejemplo, en las variaciones de la morfología del nódulo. Sin embargo, también existen similitudes en todas las etapas del desarrollo de la interacción (119).

La importancia del estudio de esta interacción reside en el valor agronómico que tienen muchas plantas leguminosas, entre las que podemos mencionar : frijol y soya. Es este interés, lo que ha llevado a muchos grupos de investigación a estudiar en gran detalle, cómo se regula cada una de las etapas del proceso de fijación biológica de nitrógeno.

II.1 EL FENÓMENO DE SIMBIOSIS.

Rhizobium, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* y *Sinorhizobium* son bacterias del suelo Gram-negativas que se asocian casi exclusivamente a plantas de la familia *Leguminosae* para formar una simbiosis, la cual trae como resultado la formación de un nuevo órgano en la planta, el nódulo, en donde el nitrógeno atmosférico es reducido a amonio. El amonio producido de esta forma es asimilado por la planta, mientras que la bacteria recibe fuentes de carbono producto de la fotosíntesis vegetal. El fenómeno de fijación biológica del nitrógeno, comprende varios estadios (ver figura 1): la bacteria coloniza la superficie de la raíz e induce el curvamiento de las puntas de los pelos radicales. Esto es seguido por la invaginación de la pared celular y la formación de un hilo de infección que crece dentro del pelo radical (figura 1, B y C). El hilo de infección atraviesa las capas celulares externas y el primordio del nódulo es iniciado por la proliferación de las células del córtex de la raíz (figura 1D). Dentro del hilo de infección el

rhizobio se multiplica, pero permanece confinado a la pared celular de la planta. Cuando el primordio se desarrolla a nódulo, las bacterias son liberadas de la punta del hilo de infección por endocitosis y se diferencian a bacteroides cuya forma es la única capaz de fijar nitrógeno atmosférico. En los primeros eventos de esta interacción, se establece un diálogo molecular muy preciso entre el macro y el microsimbionte, en el que compuestos fenólicos llamados flavonoides son excretados por la planta y activan la transcripción de genes bacterianos involucrados en el proceso de nodulación (genes *nod*). Esto se lleva a cabo gracias a la interacción que se establece entre los flavonoides y el gen *nodD*, el cual es un regulador transcripcional de los genes de nodulación inducibles. La expresión de los genes de nodulación trae como resultado la síntesis y secreción de moléculas señal involucradas en el reconocimiento específico entre los simbiontes, llamados Factores de Nodulación (FNs) de los cuales se tratará en los siguientes apartados. (71, 85, 107). (Ver figura 1).

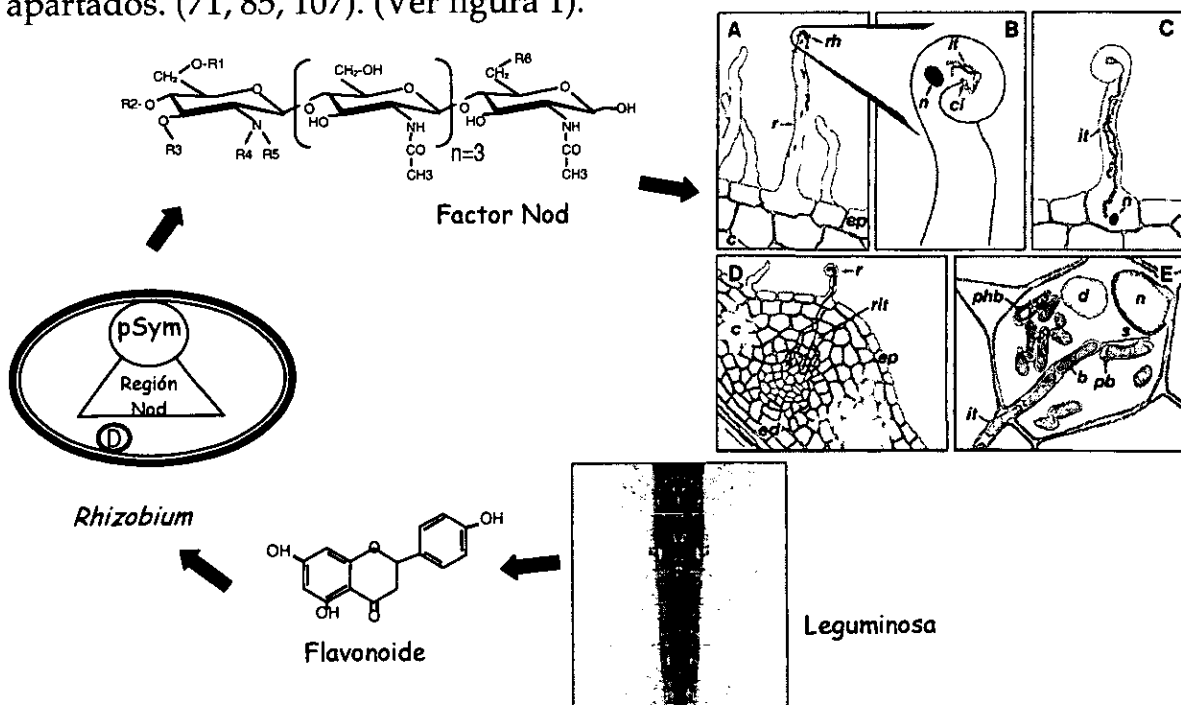


Figura 1. Interacción simbiótica entre *Rhizobium* y leguminosas. A, B, C, D y E eventos secuenciales para la formación del nódulo. *rh*, rhizobia; *r*, pelos radicales; *ci*, centro de infección; *n*, núcleo; *it*, hilos de infección; *rit*, hilo de infección ramificado; *b*, bacteroides; *s*, simbiosoma; *phb*, granulos de poli-β-hidroxitubirato; *pb*, membrana peribacteroidal; *c*, córtex; *d*, vacuola digestiva; *ep*, epidermis; *ed*, endodermis. R1-R6: diversas modificaciones químicas en los Factores Nod.

II.2 GENES DE NODULACIÓN

Los genes de nodulación (genes *nod*) son los genes bacterianos involucrados en cada una de las etapas conducentes al establecimiento del nódulo. Estos genes están localizados generalmente en un plásmido de alto peso molecular, pero en especies como *Rhizobium loti* y géneros como *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*, los genes *nod* están localizados en el cromosoma. Sin embargo, de manera general, comparten la característica de estar organizados como operones, regulados coordinadamente en muchas especies de rhizobia.

Los genes *nod* se clasificaron originalmente en dos grupos: los genes *nod* comunes (*nodABC*) presentes en todos los rhizobia y responsables de la síntesis de la estructura básica del factor de nodulación (62), y los genes *nod* específicos (*nodEFGHL*), encargados de llevar a cabo las diversas modificaciones de que son objeto los factores de nodulación. Además, existen otros genes que contribuyen a la eficiencia de nodulación (*efn*) y los genes involucrados en la regulación de los genes de nodulación (*nodD*, *syrM*, *nolR*, etc.), (23, 39, 63, 82).

El conocimiento que se ha generado en los últimos años en relación a los genes de nodulación, se ha reflejado en el cambio de concepción de estas primeras clasificaciones. Es así como se ha demostrado que los genes *nod* comunes son también determinantes de especificidad, lo cual se ha descrito para el gen *nodC*. Este gen tiene la función de quitina sintasa en todos los rhizobios pero, dependiendo del origen del gen, es el número de unidades de acetil glucosamina que añade para formar el esqueleto de *N-acetil* glucosamina; ésto hace que se sintetizen oligómeros de quitina que varían en longitud, lo que da como resultado diferencias en cuanto a eficiencia y capacidad de nodulación en ciertos huéspedes (57, 58). Es por esta razón que

el concepto original de genes *nod* comunes ha cambiado, ya que dependiendo de la especie de rizobia de que se trate, los FNs presentan características específicas.

En casi todos los rizobios estudiados, los genes *nodABC* forman parte de un solo operón; sin embargo, nuestro grupo encontró hace algunos años que en *Rhizobium etli* el gen *nodA* está separado de los genes *nodBC* por aproximadamente 20 kb (124). Los genes *nodIJ* se localizan corriente abajo de *nodC* y se encuentran en el mismo operón. Se ha descrito que estos genes se parecen a proteínas que secretan polisacáridos en bacterias gram negativas. NodI tiene similitud con proteínas de unión a ATP, de los sistemas de transporte denominados ABC y NodJ tiene una alta similitud con proteínas integrales de membrana (125).

Los genes hospedero-específicos se encuentran presentes sólo en ciertas especies. Dentro de estos genes se pueden mencionar *nod S,H,E,F,Z*, etc. Frecuentemente, mutaciones en estos genes resultan en alteración o extensión del rango de hospedero.

Dentro del grupo de los genes reguladores, que se han descrito en los últimos años, hay varios miembros de la familia de reguladores tipo LysR, entre los que se encuentran *nodD*, *syrM* y el represor *nolR*. También se han descrito otros elementos reguladores como son los genes *nodV* y *nodW*, del tipo de dos componentes, y *nolA* que pertenece a la familia de reguladores MerR; de estos reguladores se hablará con mayor detalle en los siguientes apartados.

También se han estudiado, a fondo, los genes esenciales para la infección de las raíces de las plantas por rizobia, entre los que se encuentran grupos de genes involucrados en la síntesis de la cubierta bacteriana, tales como: genes que codifican para la síntesis de

exopolisacáridos (genes *exo*), lipopolisacáridos (genes *lps*), polisacáridos capsulares o antígenos K y β -glucanos (genes *ndv*). Mutaciones en estos genes alteran el proceso de infección a varios niveles, que incluyen la incapacidad de inducir la formación del hilo de infección, resultando en la formación de nódulos vacíos con un fenotipo Nod⁺ Fix⁻ (121). Algunas de las proteínas codificadas por los genes de nodulación hasta ahora identificados y su posible función se muestran en la Tabla 1.

Proteína	Especie	L cel	Función	Referencia
NodA	Común	Cit	N-acil transferasa	1, 24, 78, 96
NodB	Común	Cit	Deacetilasa	55
NodC	Común	M int	Quitina sintasa	47, 58, 59
NodD	Común	M cit	Activador transcripcional	33, 106, 122
NodE	Rl, Rt, Sm	M cit	Cetoacil sintasa	25, 76, 115
NodF	Rl, Rt, Sm	Cit	P. acarreadora de acilos	25, 46, 76, 97
NodG	Sm		Alcohol deshidrogenasa	25
NodH	Sm		Sulfo transferasa	32, 76, 99
NodIJ	Rl, Rt, Sm, Re, Ac, Bj, Bp	M cit	Secreción de FNs	14, 36, 116, 125
NodK	Bp		Desconocida	27, 110
NodL	Rl, Rt, Sm, Bp	M cit	Aciltransferasa	3, 9
NodM	Rl, Rt, Sm, Bp		Glucosamina sintasa	3, 4
NodN	Rl, Rt, Sm, Bp		Acet-gluc uridil transf.	3, 4, 18
NodO	Rl	Sec	Posiblemente se integra a membrana para formar poros catión selectivos	29
NodP	Sm		ATP-sulfurilasa	68, 76, 99, 108
NodQ	Sm		ATP-sulfurilasa y cin. APS	68, 76, 99, 108
NodS	Re, Rtr, Rf, Bj, NGR, Ac		Metil transferasa	45, 54, 78
NodT	Rl, Rt	M ext	Posiblemente involucrada en la secreción de los FNs	98
NodU	Re, Rtr, Rf, Bj, NGR, Ac		Carbamil transferasa	54
NodV	Bj	M cit	Detector, fam de 2-comp	49
NodW	Bj	Cit	Regulador, fam de 2-comp	49, 69, 104
NodX	Rl*		Acil transferasa	29, 38
NodY	Bj		Desconocida	73
NodZ	Bj		Fucosil transferasa	72, 79, 95, 118
NolA	Bj		Regulador negativo	28, 44, 117
NolB	Rf		Función desconocida	77, 43
NolC	Rf		P. de choque térmico	67
NolE	Rp	Sec	Desconocida	23
NolFGHI	Sm		Posible secreción de FNs	4, 102

NolJ	Rf	Desconocida	11
NolK	Ac	Azúcar epimerasa	79, 126
NolL	Rloti, Re	Acetil transferasa	20, 109
NolMNO	Bj	Desconocida	73
NolP	Rp	Desconocida	23
NolR	Sm	Regulador negativo	22
NolTUV	Rf	Desconocida	5, 43, 77
NolWX	Rf	Posible secreción de FNs	43, 77
NolYZ	Bj	Desconocida	28
SyrB	Sm	Reg. Negativo de SyrM	7
SyrM	Sm	Activador transcripcional	6, 50, 63, 120

Tabla 1. Proteínas codificadas por los algunos genes de nodulación. *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Rl), *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Rt), *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Rp), *S. meliloti* (Sm), *R. tropici* (Rtr), *R. etli* (Re), *R. fredii* (Rf), *Rhizobium* sp. cepa NGR234 (NGR), *B. japonicum* (Bj), *A. caulinodans* (Ac) y *R. leguminosarum* (Rl)*, *R. loti* (Rloti). L cel, localización celular; Cit, Citoplásmica; M int, membrana interna; M cit, membrana citoplásmica; M ext, membrana externa; Sec, secretada.

II.3 INTERCAMBIO MUTUO DE SEÑALES.

La nodulación provoca la colonización de las células de la raíz de las plantas por invasión de las bacterias, y aunque muchas plantas y bacterias sean capaces de asociarse para establecer una simbiosis, sólo ciertas combinaciones de simbioses dan lugar a la formación de nódulos fijadores de nitrógeno. La especificidad entre el hospedero-huésped compatibles, minimiza las oportunidades de infección por patógenos y la formación de asociaciones inefectivas que son perjudiciales para ambos simbioses.

Esta barrera de especificidad está asociada con los compuestos fenólicos llamados flavonoides, en conjunto con la proteína NodD. Los flavonoides son parte del metabolismo secundario de las plantas y son secretados a la rizosfera en conjunto con otros compuestos orgánicos dentro de los que se incluyen : carbohidratos, ácidos orgánicos, vitaminas, etc. Se ha demostrado que los flavonoides (2-fenil-1,4-benzopyrona y sus derivados) son compuestos muy importantes en la simbiosis, ya que inducen

específicamente la expresión de los genes bacterianos requeridos para la nodulación (*nod*, *nol* y *noe*)(88).

La naturaleza y concentración de los compuestos exudados depende de la planta y de su estado de desarrollo y, así mismo, la capacidad de inducir la expresión de los genes de nodulación varía con el tipo de flavonoide y la especie bacteriana de que se trate. En algunos casos, los flavonoides pueden inhibir la expresión de los genes de nodulación, y otros compuestos como las betaínas y ácidos eritrónico y tetrónico pueden actuar como inductores. Las dos betaínas identificadas son trigonelina y estaquidrina, y fueron encontradas como compuestos mayoritarios en exudados de semillas de alfalfa que activan la proteína NodD2 de *S. meliloti*.

Los FNs son lipo-quitoooligosacáridos que constan de una estructura central formada por oligómeros de N-acetil glucosamina, siendo generalmente tetrámeros o pentámeros, "decorados" con diferentes sustituyentes químicos tanto en el extremo reductor como en el no reductor, entre los que se incluyen grupos sulfato, metilo, acetilo, ácido graso con diferentes grados de insaturación, o azúcares modificados, ver figura 2.

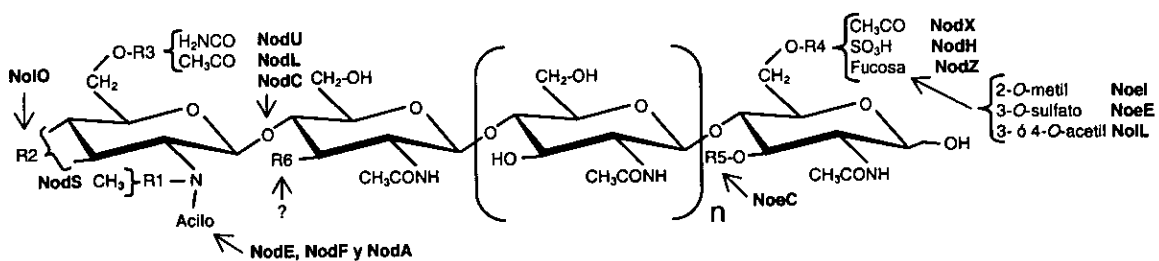


Figura 2. Estructura química del Factor de Nodulación y sus posibles modificaciones. En negritas se indican las proteínas responsables de las modificaciones químicas señaladas sobre el esqueleto.

Los FNs purificados, son capaces de provocar muchas de las respuestas inducidas por la bacteria. Cuando se añaden FNs a los pelos radicales, se da una inducción rápida de flujos iónicos, que precede a la

deformación del pelo radical. Esto es, los influjos de Ca^{2+} aumentan y hay una depolarización de la membrana plasmática transitoria, asociada con los eflujos de Cl^- y K^+ que se suceden en segundos; esto va acompañado por una alcalinización del citoplasma del pelo radical y después de algunos minutos también se presentan oscilaciones de Ca^{2+} en estos pelos (16, 35). Otras de las respuestas observadas al añadir los FNs a los pelos radicales son los rearrreglos de los filamentos de actina y redirección del crecimiento de la punta del pelo radical. Esta serie de eventos se muestra en la figura 3 (no necesariamente en orden cronológico) (16, 17, 31, 34, 119).

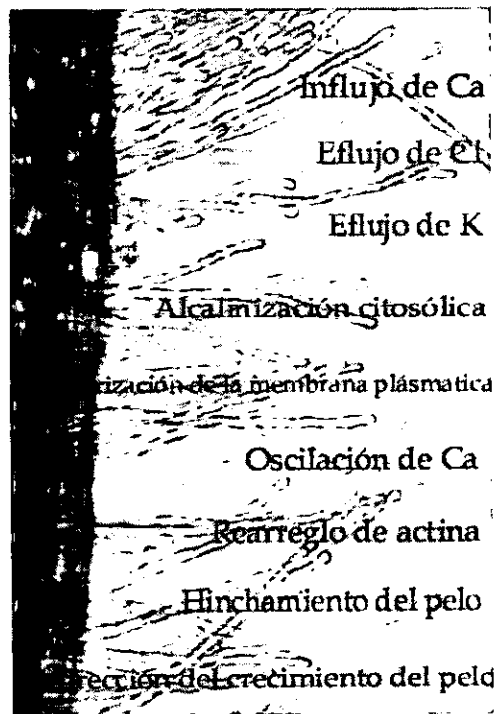


Figura 3. Cambios fisiológicos tempranos detectados en los pelos radicales después del tratamiento con los FNs o de inoculación con rhizobia (119).

II.4. ESTRUCTURA QUÍMICA Y MODIFICACIONES DEL FACTOR Nod Y RANGO DE HOSPEDANTE

La estructura básica de los FNs es común en todos los rhizobia y está determinada por los genes *nodABC*. La proteína NodC, como ya se mencionó con anterioridad, es una quitina sintasa con gran homología con diversas enzimas descritas como β -glucosil transferasas (47). Esta quitina sintasa incorpora GlcNac en oligómeros de quitina y la elongación del oligosacárido se lleva a cabo hacia el extremo no reductor. NodC se encuentra en la membrana citoplásmica y en las fracciones membranales de *R. fredii*, cuando se crece en presencia de inductores (flavonoides) (58). NodB es una deacetilasa que remueve específicamente el grupo acetil del extremo no reductor y requiere para su actividad un oligómero de al menos cuatro residuos de GlcNAc (55). NodA es una N-acil transferasa que utiliza los tetrameros de GlcN deacetilados en su extremo no reductor, para producir los oligómeros de quitina acilados. Cada rhizobio produce un espectro característico de FNs que es único para cada hospedero. Dependiendo del rhizobio, los FNs pueden tener diversas modificaciones en su estructura básica y son muchos los genes involucrados en llevar a cabo tales decoraciones. Así, otra barrera de especificidad en la interacción planta-rhizobio está dada por las decoraciones de que son objeto los FNs y que dependen de la especie del rhizobio de que se trate. Por ejemplo, *nodH* codifica para una sulfotransferasa que transfiere el grupo sulfato al extremo reductor del FNs de *S. meliloti* (32). El grupo sulfato en este caso es indispensable para que esta bacteria nodule a alfalfa, su planta hospedera; mutantes en *nodH* producen FNs no sulfatados que son inactivos sobre alfalfa, pero que son activos sobre la planta no hospedera *Vicia sativa* L. (veza). Por otro lado, muchos rhizobia producen FNs con un grupo fucosa

en el extremo reductor, la fucosilación es mediada por *nodZ* (72, 95, 118). *nodS* es otro gen hospedero específico, que tiene la función de metiltransferasa y que utiliza como sustrato preferentemente los quitooligosacáridos que han sido desacetilados en el extremo no reductor por NodB (45, 78). NodL se encarga de la O-acetilación en el C6 del extremo no reductor del residuo de GlcNAc (9), mientras que *nodX* lo hace en la misma posición pero del extremo reductor (38). Todos los FNs se encuentran N-acilados en el extremo no reductor, pero las N-substituciones pueden variar entre las especies y estar relacionadas con el control de la especificidad de huésped. En la mayoría de las especies esta posición "N" se encuentra acilada con un ácido graso común, como el ácido cis-vaccénico, palmítico o esteárico, mientras que en otros rhizobia se encuentra acilada con un ácido graso poliinsaturado que se sintetiza bajo control de los genes *nodEF* (8,46). NodF es homólogo a una proteína transportadora de acilos y NodE tiene homología con O-cetoacil sintasas. Estos genes constituyen uno de los mayores determinantes de especificidad entre *R.l.bv. viciae* y *trifolii* (46).

La cepa *Rhizobium* sp. NGR234 produce una familia de FNs, los cuales son pentámeros de quitina mono N-acilados con una variedad de posibles sustituciones entre las que se incluyen FNs sulfatados y no sulfatados. Se piensa que ésta puede ser la explicación para tener un amplio rango de hospedero ya que esta especie es capaz de nodular 353 especies de leguminosas.

II.5 REGULADORES TRANSCRIPCIONALES Y REGULACIÓN DE LOS GENES NOD

II.5.1 EL GEN *nodD*

El activador transcripcional de los genes de nodulación es el gen *nodD* y está presente en todos los rhizobia, en algunos casos como una sola copia y en otros casos como una familia multigénica. Con base en la homología de la secuencia, éste ha sido clasificado como un miembro de la familia de los reguladores transcripcionales tipo LysR. Todas las proteínas que pertenecen a esta familia requieren de un compuesto inductor para la activación. Aunque estas proteínas intervienen en procesos celulares muy diversos muestran algunas características comunes como son: peso molecular promedio de 32 a 36 kDa, un motivo hélice-vuelta-hélice de unión a ADN en su extremo N-terminal, y su transcripción frecuentemente es divergente a la transcripción de los genes a los cuales controla (106, 112). Con base en estudios de proteínas NodD híbridas, se ha propuesto que la especificidad de cada proteína NodD se localiza a nivel de la secuencia de aminoácidos. Se ha podido establecer que dependiendo del flavonoide que reconozca la parte C-terminal de la proteína NodD silvestre, es el flavonoide por el que muestra especificidad la proteína híbrida, construida a partir de la silvestre. Esto indica que la especificidad de la señal está localizada primariamente en la parte C-terminal de la proteína, la cual está menos conservada que la región N-terminal. En su región N-terminal se encuentra un dominio de unión a ADN y una secuencia llamada módulo receptor que se ha propuesto como un dominio de interacción proteína-proteína. Los extremos carboxilo de estas proteínas muestran semejanza con los receptores de esteroides en animales, los cuales se sabe que interactúan con algunos ligandos flavonoides. Sin embargo, algunas de las mutaciones que modifican la

especificidad para el flavonoide mapean en la región N-terminal. De esta manera, se postula que la especificidad al flavonoide en realidad depende de la estructura terciaria de la proteína NodD (121).

Las proteínas NodD's de varios rhizobios son funcionalmente diferentes en su respuesta a diversos grupos de flavonoides y en su capacidad para activar a los genes *nod*. La estructura de una proteína NodD específica de algún rhizobio, determina cuales flavonoides actúan como inductores de los genes *nod*. Se propone que quizás los alelos múltiples de *nodD* en ciertas especies, permiten el reconocimiento de los diversos inductores presentes en la rizosfera, lo cual optimiza la asociación entre los simbioses.

Indudablemente *nodD* y sus alelos modulan de manera importante el nivel de especificidad de hospedero. NodD tiene un doble papel en las primeras etapas de la simbiosis, ya que actúa como un detector de la señal de la planta (flavonoides) y también como el regulador transcripcional de los genes *nod* inducibles (12).

II.5.2. NodD Y LA INTERACCIÓN CON FLAVONOIDEOS

En *R. leguminosarum* bv *viciae* la proteína NodD está localizada en la membrana citoplásmica bacteriana, probablemente insertada sólo en la membrana interna. En cambio en *S. meliloti*, cantidades substanciales de NodD1 han sido localizadas en el citosol, aunque se sabe que migra hacia la membrana citoplásmica cuando se agregan los flavonoides adecuados. Por análisis de computadora, se ha predicho una α -hélice hidrofóbica para la supuesta parte de NodD integrada a la membrana; ésta parte contiene 3 y 4 residuos de prolina para NodD de *R.l.* bv *viciae* y NodD1 de *S. meliloti*, respectivamente. Es bien conocido que los residuos de prolina rompen las α -

hélices y que se encuentran presentes en muchas proteínas de membrana que funcionan como subunidades de receptores o transportadores. Estas observaciones sugieren que la interacción *in vivo* entre NodD y los flavonoides ocurre en la membrana citoplásmica interna. Sin embargo, no se ha demostrado la unión directa de flavonoides a NodD debido a dificultades técnicas, ya que los flavonoides se pegan a todo tipo de material incluyendo las proteínas. Diversos resultados sugieren fuertemente que NodD funciona como un receptor específico para los flavonoides. Estos resultados se han obtenido en: mutantes en genes *nodD* que afectan la capacidad de autoregular y/o activar otros genes *nod* en presencia de los flavonoides inductores (13, 52, 75). También se ha hecho un análisis de la transcripción de genes *nod* inducibles, en un fondo isogénico con genes *nodD* de varias fuentes que responden de manera diferente. Debido a que los flavonoides son requeridos para la activación de la proteína NodD, se cree que inducen un cambio conformacional en la proteína; esto es apoyado por el hecho de que es posible construir mutantes e híbridos de alelos *nodD*, los cuales pueden activar la transcripción en ausencia de flavonoides (mutantes *nodD* FITA, por *Flavonoid Independent Activation*).

II.5.3 NodD COMO DETERMINANTE DE RANGO DE HOSPEDERO

El reconocimiento específico de flavonoides por parte de la proteína NodD endógena se relaciona con la amplitud del rango de hospedero. Por ejemplo, *S. meliloti*, *R.l. bv. viciae* y *trifolii* son rizobias de rango de hospedero restringido y sus proteínas NodD's sólo responden a algunos flavonoides, mientras que la proteína NodD de *Rhizobium sp* NGR234 de amplio rango de hospedero responde a un mayor espectro de compuestos inductores.

Existe una buena cantidad de evidencias genéticas que han permitido establecer que los genes *nodD* son determinantes del rango de hospedero por su especificidad a los flavonoides. Por ejemplo: 1) Algunas mutaciones en *nodD* no pueden ser complementadas por un *nodD* de otra especie. Así el gen *nodD1* de *S. meliloti* no complementa una mutación en *nodD* de NGR234 para nodular siratro, esto es debido a la incapacidad de *nodD1* de responder a los inductores que secreta siratro. 2) La transferencia del gen *nodD* altera el rango de hospedero. La transferencia del gen *nodD1* de *Rhizobium* NGR234 hacia *S. meliloti* (que sólo nodula alfalfa) da como resultado que este rhizobia sea ahora capaz de nodular siratro. 3) Algunas mutaciones puntuales en el gen *nodD* de *R.l. bv. trifolii* puede extender el rango de hospedero a especies de *Parasponia* que no son leguminosas. Estos experimentos indican que las distintas proteínas NodD tienen diferente especificidad por los inductores y por consecuencia influyen en el rango de hospedero para cada rhizobia (121).

Todos los rhizobia estudiados a la fecha tienen al menos una copia del gen *nodD* y la inactivación del mismo confiere un fenotipo Nod⁻. *R. etli*, *S. meliloti* y *R. leguminosarum* *bv phaseoli* poseen 3 copias del gen *nodD*, mientras que en *R. tropici* CIAT 899 se han identificado 5 copias del mismo gen.

A la fecha no es claro el significado de las reiteraciones del gen *nodD* en lo que se refiere al control de la especificidad de huésped, ya que no existe correlación entre el número de genes *nodD* y la amplitud del rango de hospedero. Esto se puede ejemplificar con el caso de *R. l. bv phaseoli*, que tiene rango de hospedero restringido y tiene 3 copias del gen, mientras que *Rhizobium* *sp* NGR234 posee dos copias, de las cuales sólo una está involucrada en la inducción de los genes de nodulación (121).

II.5.4. REGULACIÓN DE NodD

La regulación y el nivel de expresión de los genes *nodD* tiene gran variación entre especies y aún entre cepas de la misma especie. Algunos genes *nodD* se activan autógenamente, otros requieren de activadores como SyrM (6) o bien requieren los compuestos inductores de las plantas. Como ya se mencionó existen *nodD*'s que se reprimen autógenamente (83), otros que requieren de represores como NolR (64) o bien que se reprimen por la concentración de nitrógeno (30, 127). A continuación se describen algunos ejemplos: el gen *nodD*, único en *R.l. bv trifolii* y en *bv viciae* regula negativamente su propia transcripción. En *B. japonicum*, la tasa de transcripción de *nodD1* es elevada por la proteína NodD1 y ciertos flavonoides, independientemente de otros genes *nod*. En *S. meliloti* la expresión de *nodD3* y *syrM*, otro regulador positivo miembro de la familia LysR, está involucrado en una vía regulatoria compleja : el producto del gen *syrM* activa la expresión de *nodD3*, el cual a su vez activa la expresión de *syrM* (120). Los dos genes constituyen un circuito regulador positivo de amplificación propia. Por otro lado, también en *S. meliloti*, NodD1 y NodD2 son activados específicamente por compuestos de la planta, los cuales a su vez tienen poco efecto sobre la interacción *nodD3-syrM*. En *S. meliloti* en vida libre, no hay expresión de *syrM* y *nodD3*, sin embargo cuando estos genes están presentes en un plásmido multicopia, las proteínas SyrM y NodD3 se encuentran en concentraciones suficientes como para inducir altos niveles de la expresión de los genes *nodABC*, en ausencia del inductor. Esto sugiere que uno o ambos genes podrían estar reprimidos en vida libre. Por otro lado, es interesante que SyrM también regule la síntesis de genes *exo*, indicando que podría estar regulando coordinadamente tanto el metabolismo de

exopolisacáridos como la síntesis de los factores Nod, ambos involucrados en el proceso de infección (121).

II.5.5 LA CAJA *nod* Y EL MODELO DE LA ACTIVACIÓN TRANSCRIPCIONAL

En rhizobia, los genes *nod* están organizados en varios operones, localizados en el cromosoma o en el plásmido simbiótico. La región reguladora 5' de los genes *nod* inducibles comprende: 1) una secuencia de 47 pb altamente conservada, denominada caja *nod* (100); 2) el motivo AT(T)AG hacia abajo de la caja *nod* (114); y 3) una secuencia operadora donde se une el represor NolR, identificada sólo en algunos rhizobia (60, 64).

El modelo de la activación transcripcional de los genes de nodulación plantea que los flavonoides entran al citoplasma bacteriano, donde se unen a la proteína NodD y la activan a través de un cambio conformacional; la proteína NodD activada se une a las cajas de nodulación, induciéndose la transcripción de los genes de nodulación de manera coordinada.

La unión específica de NodD a la caja *nod* ha sido muy bien estudiada *in vitro* (41, 48, 51, 64). Algunos estudios han demostrado que la proteína NodD se une sólo a un lado de la doble hélice de ADN y provoca que ésta se doble sobre sí misma (40). La región de ADN protegida por NodD correspondiente a la caja *nod* es idéntica en presencia o ausencia de flavonoides; sin embargo, para *S. meliloti* AK41 y *A. caulinodans* se ha reportado que NodD tiene una mayor afinidad por la caja *nod* en presencia del inductor (48, 64).

En *Rhizobium sp* la caja *nod* está compuesta por tres partes muy conservadas, mientras que en *B. japonicum* la caja *nod* se divide en 4 regiones también muy conservadas. Se ha reportado la presencia de dos repetidos

invertidos con la secuencia ATCN₉GAT dentro de todas las cajas *nod* conocidas; ver figura 4 (48). Tal estructura favorece la hipótesis de que NodD se une como un tetrámero a la caja *nod*, lo cual ha sido también sugerido por estudios en mutantes con remociones en la caja *nod* (128). Esto es apoyado por la presencia de un módulo receptor en la región N-terminal de NodD el cual podría estar involucrado en la multimerización de la proteína (61, 75). CysB y Nahr son otros dos ejemplos de miembros de la familia LysR que se unen a sus sitios específicos en el ADN como proteínas tetráméricas (81, 105).

R. leg	AT	AAC	CATTCCATA	GAT	GATTGCC	AAC	CAAACAATC	AAE	TTTACCA	AAC	TTTGGGATC	ACT	TATAGAA
R. tri	CG	AAC	CACGCTGTA	GAT	GATTCCG	AAC	CAAACAATC	AAE	TTTACCA	AAC	TTTGGGAGT	GCT	TATTAGA
R. mel	GC	AAC	CATATGACA	GAT	GATCGTT	AAC	CAAACAATC	AAE	TTTACCA	AAC	TTGCAGAT	GCT	ATTAGAG
R. etli	GC	AAC	CATTGGACG	GAT	GATTTCC	AAC	CAAACAAT	AAE	TTTACCA	GCT	TATACCAGT	GCC	ATTAGAA
B. jap	CT	AAC	CATCCTGTC	GAT	GTGTTCT	AAC	CAAACAATC	AAE	TTTACCA	AAC	TGGGGAGG	TTG	GATAGCA
A. caul	CC	AAC	GATCAAGTG	GAT	TGGCTGT	ATT	CGTAATTG	GAA	TTGACCG	GTA	GAATGATG	TGC	ATAATTC
Consensus	Y	AAC	CAY...YR	GAT	G...Y	AAC	.AAACAATC	AAE	TTTACCA	AAC	Y		

Figura 4. Comparación de las secuencias de seis cajas *nod* localizadas río arriba de los genes *nod* comunes en *R. leguminosarum* bv. *viciae* (R. leg), *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (R. tri), *S. meliloti* (S. mel), *R. etli* (R. etli), *B. japonicum* (B. jap), *A. caulinodans* (A. caul). La secuencia de los repetidos invertidos ATCN₉GAT se resalta en negritas. Y, pirimidina; R, purina; *, base arbitraria.

II.5.6 OTROS ELEMENTOS REGULADORES

Los circuitos reguladores que se han estudiado a la fecha para la regulación de la expresión de los genes *nod*, son de gran complejidad. En este apartado se describirán elementos reguladores encontrados en algunos rhizobia. Por ejemplo, el gen *nolR* ha sido identificado únicamente en *S. meliloti* (22) y más recientemente en *R. leguminosarum* biovar *viciae* (60), como un represor de la expresión de los genes de nodulación. En *S. meliloti* se encontró que es un factor que actúa en *trans* reprimiendo la expresión de *nodABC* ya que se une al promotor de *nodD1*, el cual se sobrelapa con el promotor de *nodABC* en *S. meliloti*. La proteína NolR contiene un motivo hélice-vuelta-hélice de unión a ADN y es un miembro de la familia de

reguladores tipo LysR. En antecedentes se mencionará con mayor detalle el papel de este gen en la nodulación.

Los genes *nodVW* son miembros de la familia de reguladores de respuesta de dos componentes, que se han descrito en *Bradyrhizobium japonicum* y son necesarios para la nodulación de "cowpea", "mung bean" y siratro, pero no para la nodulación de soya. De acuerdo al análisis de las secuencias de estos genes, *nodV* es una cinasa detectora, que responde a un estímulo ambiental aún no identificado y *nodW* es un regulador de respuesta que regula positivamente la expresión de uno o varios genes desconocidos, involucrados en el proceso de nodulación (49). Uno de estos genes podría ser el gen *nodZ*, que se regula de manera independiente a NodD y, además, es necesario para la nodulación eficiente de siratro (118). Recientemente se ha demostrado que el sistema de reguladores de dos componentes *nodVW*, está involucrado en la activación de la expresión de los genes *nod* por isoflavonoides (69). En este estudio, los autores reportan que *nodW* puede ser fosforilado *in vitro* por *nodV* y que esta fosforilación es inducida por genisteína, el inductor de la expresión de los genes *nod* en *B. japonicum* (69).

Otro gen regulador que ha sido ampliamente estudiado es el gen *nolA*; este gen tiene un papel importante en la nodulación específica de genotipos de soya, ya que es capaz de extender el rango de hospedero de *B. japonicum* serogrupo 123, a ciertos genotipos de soya que normalmente no pueden ser nodulados por esta cepa. El análisis de la secuencia del gen *nolA*, mostró un motivo hélice-vuelta-hélice de unión a ADN en la región N-terminal, de la proteína similar a los dominios conservados de unión a ADN de los reguladores transcripcionales de la familia MerR (*Mercury Resistance Genes*) (101). Posteriormente, se demostró que mutantes en *nolA* afectan de manera importante la nodulación y fijación de nitrógeno en "cowpea"; sin

embargo, esta mutante no tiene ningún efecto sobre la nodulación de soya. Estudios de microscopía de nódulos infectados con una mutante en *nolA* mostraron que los bacteroides tienen una morfología atípica. Estos resultados indican que *nolA* no sólo juega un papel importante en los estados tempranos de la infección, sino también durante el desarrollo del bacteroide y su mantenimiento dentro de la célula (44). Recientemente, se ha reportado que el gen *nolA* codifica para tres proteínas funcionalmente distintas y se ha establecido que la expresión de Nola₂ y Nola₃ requieren la presencia de Nola₁, mientras que Nola₁ ó Nola₃ es necesaria para la nodulación específica de genotipo (70).

Por otro lado el gen *nolC* de *Rhizobium fredii* fue identificado por primera vez como un regulador negativo de la nodulación de soya específica del cultivar McCall (66). Sin embargo, investigaciones posteriores revelaron que *nolC* también afecta la nodulación de otras plantas de soya como el cultivar Peking, donde tiene efectos pleiótricos y actúa como un regulador negativo para la nodulación específica de varias especies de *Erythrina*. La secuencia nucleotídica de *nolC* tiene una alta homología con *dnaJ*, la cual codifica para una proteína de choque térmico en *Escherichia coli*. La expresión de *nolC* es constitutiva y estudios histológicos confirman que su expresión no está regulada temporalmente, sino que se mantiene durante el desarrollo del nódulo incluyendo el estado de preinfección (67).

A la luz de todos los genes reguladores que se han descrito en la interacción planta-rhizobio en los últimos años, resulta muy evidente que la regulación de los genes de nodulación es compleja y específica para cada uno de los rhizobios.

III.- ANTECEDENTES

En nuestro grupo existe un gran interés por estudiar la regulación de la expresión de los genes de nodulación y, en un primer enfoque, en identificar los elementos que componen los circuitos reguladores que tienen lugar en nuestro modelo *Rhizobium etli* cepa CE3.

El gen *nolR* fue descrito por primera vez en el fondo genético de *Sinorhizobium meliloti*; se localiza en el cromosoma, en una sola copia y se encontró que es un factor que actúa en *trans* reprimiendo la expresión de *nodABC*, por unirse al promotor de *nodD1* que se sobrelapa con el promotor de *nodABC*. Ensayos de protección con ADNasa I sugieren que NolR compite con la ARN polimerasa por su sitio de unión y controla la transcripción tanto de *nodD1* como de los genes comunes *nodABC*. Ver figura 5.

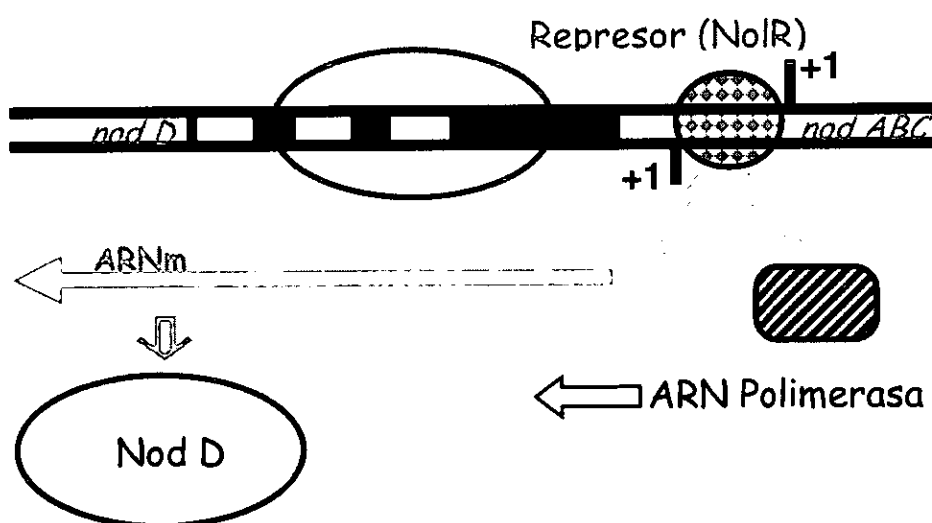


Figura 5. Modelo para la regulación de genes *nod* comunes en *S. meliloti*, propuesto por Kondorosi et al. (1989).

La secuencia nucleotídica de NolR es de 594 pb, codifica para una proteína de ~13.3 kDa y contiene un motivo hélice-vuelta-hélice (HTH), de unión a ADN, presenta alta homología con los motivos HTH de NodD,

SyrM y NhaR, todos ellos miembros de la familia de reguladores bacterianos tipo LysR (63, 64).

Este regulador reprime la expresión de los genes con funciones comunes, al unirse específicamente a los promotores de los genes *nodABC* y *nodM* involucrados en la síntesis del esqueleto de los FNs, por lo que cambia los niveles de expresión de los genes comunes mientras los niveles de expresión de los genes *nod* hospedero específicos, involucrados en las modificaciones de los FNs no varían debido a que NolR no reconoce secuencias consenso y por lo tanto no reprime su expresión. En este sentido, se ha planteado que el papel de NolR podría ser el de modular las funciones entre los genes *nod* comunes y los hospedero-específicos para inducir la producción de los FNs en concentraciones idóneas que den lugar a una nodulación óptima del hospedero. Se ha demostrado experimentalmente que la forma activa del represor se une de forma dimérica a la secuencia consenso (A/T)TTAG-N(9)-A(T/A) que ha sido localizada en los promotores de *nodD1*, *nodD2*, *nodD3*, *nodABC*, *nodM* y *nolR* en *S. meliloti* y por similitud de secuencias se han identificado en otros rizobias (22, 60). La localización de esta secuencia en la región promotora de *nolR* sugiere que éste es capaz de autoregularse (22).

Las mutantes generadas en el gen *nolR* de *S. meliloti* y *R. leguminosarum* bv *viciae* tienen como fenotipo un retraso ligero de 1 o 2 días en la nodulación (60, 64). Se ha estudiado la secreción de factores en estas mutantes por ensayos de TLC y se ha observado que en una cepa *nolR*⁻ la secreción de los FNs aumenta; sin embargo, esto sólo se ha visto cuando los autores usan cepas que han sido modificadas en el laboratorio para que sobreproduzcan FNs. Cuando se analizan los FNs de una cepa no sobreproductora *nolR*⁻, la secreción de los FNs disminuye con respecto a la

cepa no sobreproductora *nolR*⁺. En este estudio, los autores reportan que *NolR* induce la síntesis preferencial de FNs con ácidos grasos insaturados de 16 carbonos, también usando cepas sobreproductoras.

En otra cepa de *S. meliloti*, la cepa 1021, se encontró que *NolR* no era funcional debido a una mutación puntual en la región C- terminal. La mutación se localizó en la posición 519 y fue debida a un cambio del residuo de isoleucina por asparagina: esto modificó la secuencia de aa, la cual aumentó 50 residuos y el peso de la proteína deducida fue de ~18.8 kDa. Se proponen varias explicaciones para la no funcionalidad de la proteína: 1) que la región C- terminal afectada puede estar involucrada en el reconocimiento del sitio de unión de *NolR*, 2) que la mutación altera la conformación de la proteína, lo cual inhibe la unión a la secuencia blanco; y 3) que esta región podría estar involucrada en la dimerización de la proteína, lo cual es esencial para la unión de *NolR* al ADN (21).

Resulta muy interesante explorar el escenario de la regulación de los genes *nod* en nuestro sistema, ya que sabemos muy poco de los elementos reguladores que se encuentran involucrados. Dentro de estos elementos reguladores podemos mencionar que existen tres copias del gen *nodD*, de las cuales *nodD1* induce elevados niveles de la expresión de los genes *nod* en ausencia del inductor, *nodD2* activa la expresión de los genes *nod* en presencia del inductor, y *nodD3* induce altos niveles de expresión de los genes *nod* pero responde poco a la presencia del inductor (26).

En cuanto a la participación de elementos reguladores negativos, una de las primeras preguntas son: ¿qué elementos reguladores se encuentran presentes en *R. etli*? Para responder a esto, en el laboratorio usamos diferentes sondas heterólogas de genes reguladores reportados en

otros modelos. Una de las sondas utilizadas fue el gen *nolR* de *S. meliloti*, con la que encontramos una señal de hibridación, como se muestra en el apartado de resultados.

IV.- OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar a nivel molecular la regulación de la expresión de los genes de nodulación en *Rhizobium etli*. Aislamiento y Caracterización del gen *nolR* de *R. etli*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterización del gen *nolR*.

1.- Aislar y Caracterizar físicamente el gen *nolR* mediante tamizados en el banco genómico de *R. etli*.

2.- Mutagenizar el gen *nolR*.

3.- Estudiar el fenotipo de la mutante *nolR* durante la simbiosis con *Phaseolus vulgaris*.

A) Analizar las cinéticas de nodulación.

B) Analizar la secreción de factores por TLC.

C) Comparar los perfiles de elución de las cepas silvestre y mutante *nolR*⁻, purificados por HPLC.

D) Analizar histológicamente los nódulos inducidos a diferentes tiempos por la mutante *nolR*⁻ de *R. etli* por microscopía de campo claro.

- Caracterización de la Proteína NolR.

4.- Generar, Sobreexpresar y Purificar una proteína de fusión GST-NolR.

5.- Analizar la actividad de unión de NolR a ADN por Southwestern.

V.- MATERIAL Y MÉTODOS

V. 1. BACTERIAS Y PLÁSMIDOS

En la siguiente tabla se muestran las cepas bacterianas y los plásmidos que se han utilizado en el presente trabajo.

CEPA BACTERIANA O PLÁSMIDO	CARACTERÍSTICAS RELEVANTES	REFERENCIA
1.-Cepas Bacterianas		
<i>Rhizobium etli</i>		
CE3	Silvestre, Sm ^R , Nal ^R , Nod ⁺ , Fix ⁺ , derivada de CFN42.	Noel et al (1984)
CFN2001	Derivada de CFN42, curada de los plásmidos p42a y p42d. Rif ^R , Nod ⁺ , Fix ⁺ .	Palacios et al (1983)
TAL 182	Silvestre, aislado de Hawaii, Sp ^R , Nal ^R .	Piñero et al (1988)
NITRAGIN 8251	Silvestre, aislado de E.U., Tc ^R , Nal ^R .	Piñero et al (1988)
BRASIL-5	Silvestre, aislado de Brasil, Nal ^R .	Piñero et al (1988)
F14 (CFN285)	Silvestre, aislado de México, Gm ^R , Nal ^R .	Flores et al (1987)
VIKING-1	Silvestre, aislado de Belice, Sm ^R , Nal ^R .	Piñero et al (1988)
CFN1	Silvestre, aislado de México, Nal ^R .	Piñero et al (1988)
CIAT 894	Silvestre, aislado de Colombia, Sm ^R , Nal ^R .	Piñero et al (1988)
CIAT 895	Silvestre, aislado de Colombia, Sm ^R , Nal ^R .	Piñero et al (1988)
KIM-5	Silvestre, aislado de Dakota del Norte, E.U.	Josephson and Pepper (1984)
<i>Rhizobium leg by viciae</i>		
VF39	Sm ^R	Hynes et al (1988)
<i>Rhizobium tropici</i>		
CIAT 899	Silvestre, Nod ⁺ , Fix ⁺ , Rif ^R , Nal ^R , Cm ^R .	Martínez et al (1991)
<i>Escherichia coli</i>		
XL1-Blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, SupE44, relA1, lac, [F' proAB, lacI Z M15, Tn10 (Tc ^R)].	
BL21	F' ompT r _B m _B (DE3).	Novagen
2.- Plásmidos		
pSK ⁻	Amp ^R , LacZ, ColE1, fl ⁺ .	Stratagene
pGEX 4-T2	Amp ^R .	
pJQ200SK	Vehículo suicida, Gm ^R , sacB, Lac ⁺ .	Quandt et al (1993)
pRK2013	Vehículo ayudador, Nm ^R .	Figurski et al (1979)
pHP45	Amp ^R , Sm ^R /Sp ^R .	Prentki et al (1984)
pSK:nolR	pSK con nolR de <i>R. etli</i> clonado en el sitio EcoRI, Amp ^R , Sm ^R /Sp ^R .	Este trabajo
pSK:nolR Sp	pSK con nolR Sp/Sm, Amp ^R , Sm ^R /Sp ^R .	Este trabajo
pJQnolR Sp	pJQ con nolR Sp/Sm, Gm ^R , Sm ^R /Sp ^R .	Este trabajo

V. 2. CONDICIONES DE CRECIMIENTO BACTERIANO

Las condiciones para el crecimiento de todas las cepas de *Rhizobium* fueron las siguientes : se inocularon en medio PY (peptona de caseína 5%, extracto de

levadura 3%), añadiéndose CaCl_2 0.7M y el antibiótico adecuado, después se incubaron a 30°C por 72 hrs.

Las condiciones de crecimiento para las cepas de *Escherichia coli* fueron las siguientes : se inocularon en LB (bacto triptona 1%, extracto de levadura bacto 0.5%, NaCl 0.5%) con el antibiótico adecuado y se incubaron a 37°C por 24 hrs.

V. 3. MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

A) PREPARACIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Las células competentes de *E. coli* (diversas cepas) se prepararon usando cloruro de calcio de acuerdo a la técnica descrita por Sambrook et al., 1989. La solución en donde se resuspenden las células lleva: 50mM de CaCl_2 y 14% de glicerol. La transformación se realizó congelando y descongelando las células tratadas con calcio y la incubación se llevó a cabo por una hora a 37°C en medio LB, finalmente las células se plaquearon en medio selectivo.

B) EXTRACCIÓN DE ADN PLAMIDÍCO A BAJA ESCALA

Se utilizó la técnica de lisis alcalina como se describe en Sambrook et al (1989), para obtener ADN de plásmido y llevar a cabo las clonaciones de ADN que se describen en este trabajo.

C) PURIFICACIÓN DE ADN DE RHIZOBIUM

El método empleado para purificar ADN de *Rhizobium* se ha estandarizado en nuestro laboratorio y en éste se utilizó pronasa (5 mg/ml), para romper las células junto con SDS 10%, y después se realizaron 2 extracciones con fenol-cloroformo para eliminar los detritus, y finalmente el ADN se precipitó con

etanol. Con esta metodología se purificó ADN de *Rhizobium* y después se digirió con diversas enzimas de restricción para utilizarse en análisis posteriores. Todos los ADN de interés fueron visualizados en geles de azarosa, teñidos con bromuro de etidio, después de haberse llevado a cabo la electroforesis como se describe en Sambrook et al 1989.

D) ANÁLISIS DE ADN POR HIBRIDACIÓN TIPO SOUTHERN

El principio de esta técnica es básicamente transferir el ADN previamente digerido a un soporte sólido (por ejemplo membrana de nylon) y ponerlo en contacto con ADN marcado radioactivamente. La técnica fue descrita por Southern en 1975. En todas las hibridaciones realizadas en este trabajo se utilizó el isótopo ^{32}P para marcar las sondas de interés. Las condiciones en que se llevaron a cabo estas hibridaciones fueron a alta astringencia (incubación a 65°C toda la noche y lavados con SSC 0.2X, SDS 0.1%).

E) ANÁLISIS DE ARN POR HIBRIDACIÓN TIPO NORTHERN

El principio es igual a la técnica anterior, sólo que aquí lo que se transfiere a la membrana es ARN, de manera que la interacción que se analiza es ARN/ADN, utilizando también isótopos radioactivos.

F) GENERACIÓN DE UNA PROTEÍNA DE FUSIÓN

Con el objeto de tener proteína NolR purificada para llevar a cabo los ensayos de interacción ADN-proteína (Southwestern), se generó una proteína de fusión con Glutación S-transferasa, para lo cual se diseñaron oligonucleótidos con sitios de corte para *Bam*HI (TAGGAAGGATCCAATATGGAAACC) y *Xho*I (TCAGCGCTCGAGTCAGGCTGCGG) que nos permitieron, amplificar por PCR la secuencia codificante completa de *nolR* y subclonar el fragmento en estos

mismos sitios (*Bam*HI y *Xho*I) en el vector pGEX 4T-2. Una vez obtenida la construcción se secuenció para corroborar que el marco de lectura no se hubiera perdido.

G) CONJUGACIÓN TIPO CRUZA TRIPARENTAL

Las cruza triparentales se llevaron a cabo mezclando las cepas de interés en una proporción de 1:1:0.1 (células donadoras, células receptoras y células portadoras del plásmido ayudador). La mezcla se plaqueó en cajas con medio PY y las cajas se incubaron a 30°C durante 12 hrs. Posteriormente se recuperaron todas las bacterias en crecimiento y se hicieron diluciones desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁶, que a su vez se plaquearon en medio selectivo.

H) REEMPLAZAMIENTO GÉNICO

Para la mutagénesis de *nolR* se usó la técnica descrita por Quandt y Hynes (1993). El vector pJQ200SK permite reemplazar un gen silvestre por uno mutado en muchas bacterias Gram-negativas. Estos vectores se basan en el origen de replicación (*ori*) P15A y poseen el gen *sacB* de *Bacillus subtilis*, cuya expresión es inducible por sacarosa, lo que resulta letal para bacterias Gram-negativas (como es el caso de *Rhizobium*). Este vector también tiene un marcador de resistencia a gentamicina y el sistema *lacZ*, lo cual facilita la selección de fragmentos clonados. Además, estos vehículos llevan la región *mob* del plásmido de amplio rango RP4, lo que les permite ser transferidos por conjugación a un gran número de bacterias Gram-negativas; debido a que estos vehículos solo se pueden replicar en enterobacterias, funcionan como vectores suicidas. Por poseer estas características, estos vehículos son muy útiles para la mutagénesis dirigida de genes de interés, ya que permiten la selección directa de las dobles recombinantes.

Para la mutagénesis de *nolR* de *Rhizobium etli*, se usó un sitio único de *MscI* que deja extremos romos para la introducción del cassette de resistencia a espectinomicina proveniente del vehículo pHP45 (ver figura 6). El plásmido pHP45 fue digerido con *SmaI* que también deja extremos romos y, dado que este plásmido contiene el mismo sitio de clonación múltiple a cada extremo del gen de resistencia a espectinomicina, fue posible sacar el cassette de 2.1kb en un solo paso y subclonarlo en el vehículo pSK:*nolR*, previamente digerido con *MscI* de manera que la ligación fue en extremos romos. De esta forma se obtuvo la clona pSK:*nolR*ΔSp, la cual fué digerida con las enzimas *NotI* y *SalI* para liberar el inserto de aprox. 2.7 kb, que contiene el gen *nolR* interrumpido con el gen de resistencia a espectinomicina. Dicho inserto fue posteriormente ligado en los mismos sitios del vehículo pJQ200SK, resultando en el plásmido pJQ*nolR*ΔSp, el cual fue utilizado para el reemplazamiento génico. Para esto, el vehículo fue movilizado a *R. etli* y se seleccionaron las clonas que eran Nal^RSp^RGm^S y que crecían en sacarosa 10% (ver figura 7). Se seleccionaron 19 colonias que crecieron en Nal₂₀^{*} Sp₁₀₀^{*} y que no crecieron o crecieron muy poco en Gm₃₀^{*}. De aquí, a su vez, seleccionamos 13 colonias que fueron posteriormente analizadas por Southern. (Las concentraciones de los antibióticos usados fueron: Nal₂₀^{*}, Ac. nalidíxico 20μg/ml; Sp₁₀₀^{*}, espectinomicina 100μg/ml; Gm₃₀^{*}, gentamicina 30μg/ml).

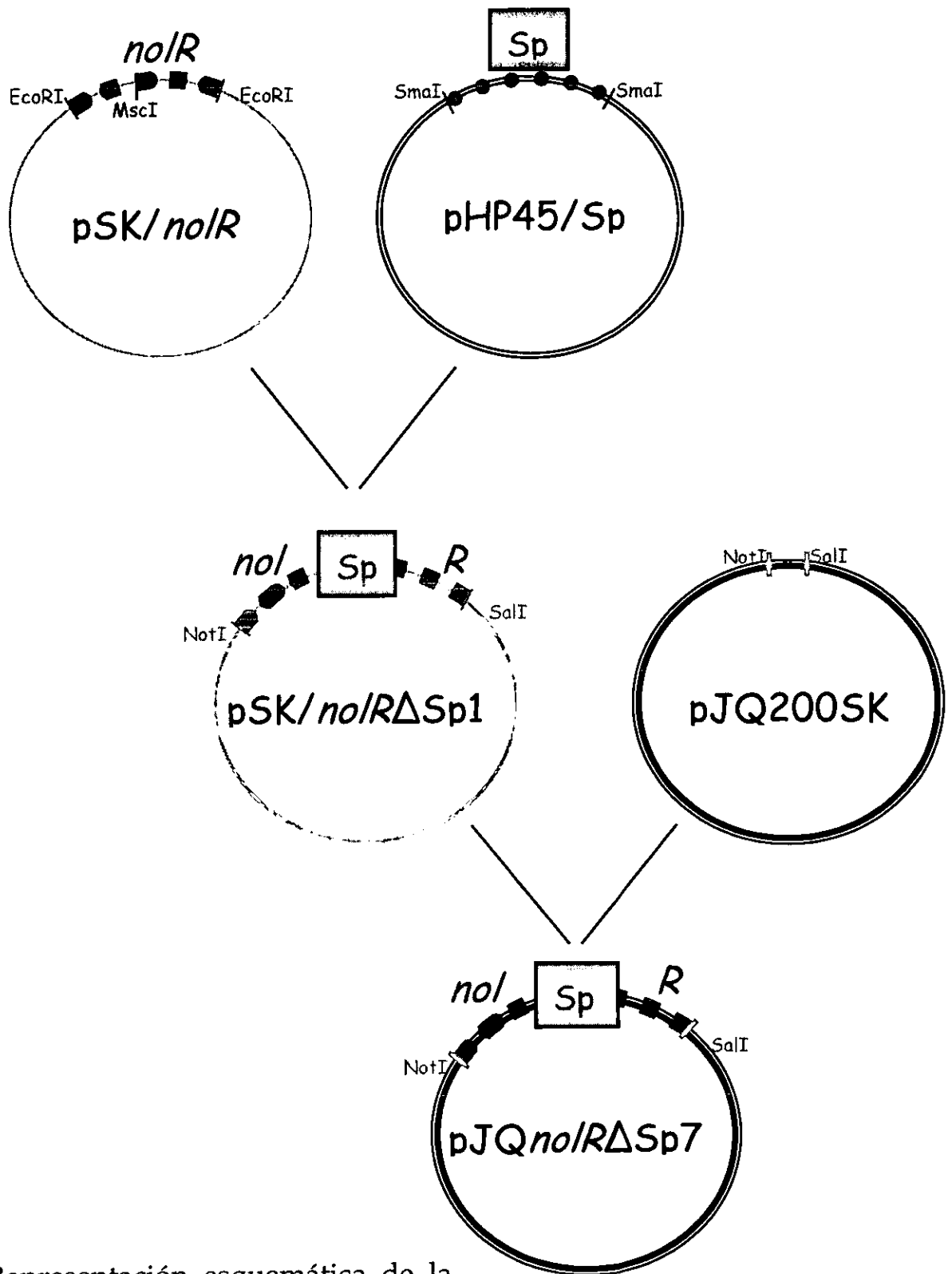


Figura 6. Representación esquemática de la construcción de los plásmidos *pSKnoIRΔSp17* y *pJQnoIRΔSp73*.

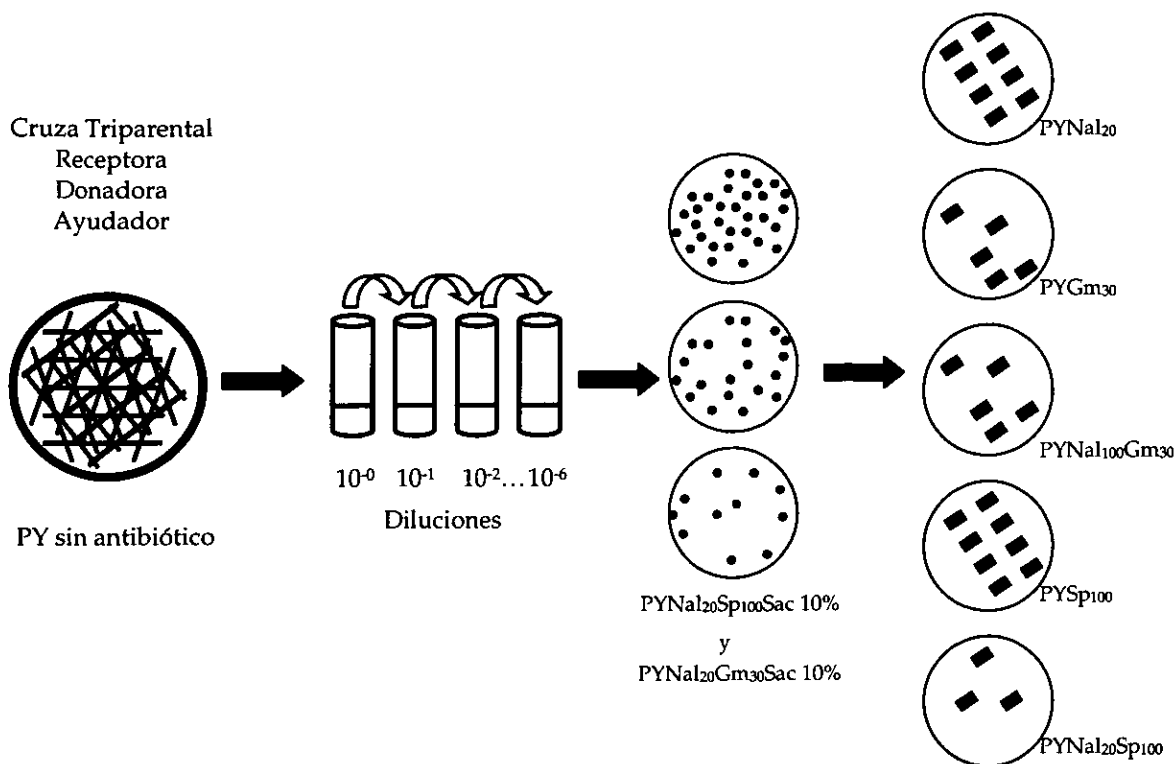


Figura 7. Estrategia de selección en la cruce triparental llevada a cabo para la doble recombinación del gen *noIR* interrumpido por el cassette de resistencia a espectinomicina en el genoma de *R. etli* cepa CE3.

I) MARCAJE DE SONDAS CON DIGOXIGENINA

Para el marcaje de sondas con digoxigenina, se utilizó el estuche "DIG High Prime DNA Labeling" (Boehringer). La reacción de incorporación del nucleótido dUTP-11-DIG se llevó a cabo a 37°C por 24 hrs según las recomendaciones del fabricante. Después se desnaturalizó la enzima ADN polimerasa Klenow y se precipitó el ADN con isopropanol y RPE (0.1 mg de ADN de esperma de salmón, EDTA 10mM, NH_4Ac 2.5 mM); este paso fue muy importante para eliminar la marca no incorporada. Finalmente, la pastilla se resuspendió en amortiguador H (Hepes.NaOH pH 7.9 10mM, NaCl 200 mM, MgCl_2 10mM, EDTA 0.1mM, DTT 1mM, leche 0.25%). Las sondas se pueden guardar a 4°C hasta usarse, pero hay que agregar azida de sodio 10% para evitar contaminaciones.

V. 4. MÉTODOS BIOQUÍMICOS

A) ELECTROFORESIS Y ELECTROTRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS

La electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) se realizó básicamente como se describe en Ausubel et al., 1989. Después de separar las proteínas por este método, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa utilizando una cámara de transferencia semiseca (marca BioRad). El tiempo de transferencia fue de una hora, con una corriente constante de 150 miliamperios, utilizando un acetato para aislar la superficie de los electrodos que no se encontraba en contacto con el gel.

B) SOBREEXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN GST-NOLR

Se probaron diferentes condiciones de inducción para establecer las que fueran óptimas para la sobreexpresión de nuestra proteína. Se hicieron curvas de inducción a diferentes concentraciones de IPTG (10, 20, 40, 60 y 100 mM) y a diferentes tiempos de incubación (1, 2, 3, y 4 hrs) a 30°C.

Para purificar la proteína, partimos de un cultivo de 100 ml. El cultivo se incubó por 2 hrs a 37°C con agitación vigorosa, posteriormente se indujo la sobreexpresión de la proteína con las condiciones establecidas previamente: 1mM de IPTG y 3 hrs de incubación a 30°C; después las células fueron colectadas por centrifugación y resuspendidas en 20 ml de amortiguador PBS (NaCl 137mM, KCl 2.7mM, Na₂HPO₄ 4.3mM, KH₂PO₄ 1.4 mM). Las células se rompieron por sonicación (Sonicador 400, marca Branson), usando 4 pulsos de 4 min a 20 volts. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante por centrifugación a 14,000 rpm a 4°C y se filtró por gravedad en una jeringa con un tapón de algodón. Este paso es importante para recuperar el extracto sin trazas de material insoluble, evitando así que se tape la columna de purificación en un paso posterior.

La resina utilizada para purificar la proteína de fusión fue la Glutación Sefarosa 4B (Amersham Pharmacia), la cual fue empaquetada en una columna para llevar a cabo la purificación. La columna fue equilibrada con 20 volúmenes de PBS, después se pasaron 20 ml del extracto total que ya teníamos preparado y, posteriormente, se realizó el lavado de la columna con 20 volúmenes de PBS. Todos estos pasos se llevaron a cabo a 4⁰C; sin embargo, las eluciones se realizaron a temperatura ambiente. La primera elución fue con 5 volúmenes de glutación reducido 10 mM, 100mM NaCl, 50mM Tris pH 8. La segunda elución fue con 5 volúmenes de SDS 2%, 100mM NaCl, 50mM Tris pH 8.

C) SOUTHWESTERN

El principio de esta técnica es inmovilizar la proteína de interés a una membrana e incubarla con el ADN específico marcado por algún método (84). En nuestro caso, marcamos el ADN de interés con digoxigenina; el resultado se obtiene revelando con un anticuerpo antidigoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina. Después de separar las proteínas de interés por SDS-PAGE, éstas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se inició el proceso de desnaturalización- renaturalización por incubación con guanidina 6M por una hora, siguiendo incubaciones de 10 min con guanidina 5M, 4M, etc. hasta incubar con TBST (30 mM Tris-HCl pH 8, 150mM NaCl y 0.1% Tritón X-100) los últimos 10 min. Posteriormente, la membrana fue bloqueada durante una hora a temperatura ambiente con 5% de leche descremada en polvo (Carnation) en TBST para después dejar hibridando toda la noche a 4⁰C con el ADN previamente marcado. La sonda se retiró y se hicieron 3 lavados de 10 minutos cada uno con el mismo amortiguador. Enseguida, se incubó por una hora con el anticuerpo antidigoxigenina (conjugado a fosfatasa alcalina, adquirido de Boehringer) diluído 1:5000 en TBST; se hicieron también 3 lavados por 10 minutos con TBST y

la membrana se reveló con los reactivos para fosfatasa alcalina: NBT y BCIP diluídos en solución AP (100mM Tris-HCl pH 9.5, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂) según las recomendaciones del fabricante (Boehringer).

D) DETECCIÓN DE LOS FNs POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Las bacterias se crecieron en medio B- durante 24 hrs y se diluyeron a un valor de 0.1 de D. O. a 600 nm, inoculando en 1 ml de medio B-. Para inducir la síntesis de los factores de nodulación, se adicionó 1.5 μ M de naringenina, añadiendo además 0.5 μ Ci de *D*-[1-¹⁴C]-glucosamina hidroclicorada (50 μ Ci/mmol, Amersham). Los cultivos se incubaron a 30°C durante el tiempo requerido del experimento. La extracción de los metabolitos Nod se realizó con *n*-butanol saturado con agua, como lo describe Spaink et al., 1992. Esto consiste en centrifugar el medio de cultivo, el sobrenadante que se obtiene se separa de la pastilla celular. A este sobrenadante se le adiciona medio volúmen de *n*-butanol saturado con agua para extraer los FNs secretados al medio. Esto se mezcló y se dejó reposar para separar la fase butanólica que contiene los FNs de la fase acuosa. El butanol se concentró a sequedad por evaporación y las muestras secas se resuspendieron en 20 μ l de *n*-butanol. Las muestras se separaron mediante cromatografía en capa fina (TLC) como describe Spaink et al., 1992, aplicando 5 μ l de cada muestra. Se utilizaron placas de sílica C18 de fase reversa (ODS: 100% octadecyl silanization, adquirido de Sigma). Las placas se corrieron usando una cámara saturada con acetonitrilo/agua (1:1, v/v).

La identificación de los FNs marcados radioactivamente, se realizó exponiendo las placas de 24-72 hrs con pantallas hipersensibles para equipo *Molecular Dynamics PhosphorImager* y se analizaron en computadora con *software Image Quant*.

E) PURIFICACIÓN DE LOS FNs MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Para la purificación de los FNs, los cultivos se crecieron en medio B⁻ con agitación a 30°C, partiendo de 0.1 de D.O. a 600 nm, hasta una absorbancia de 0.5-0.6 a la misma longitud de onda. Posteriormente, los cultivos se agitaron durante 12 hrs con 400 ml de *n*-butanol por cada litro de cultivo. La fase butanólica se colectó y se secó en un rotavapor haciendo vacío, manteniendo la muestra a 58°C. Los FNs se resuspendieron en una solución de acetonitrilo al 60% toda la noche y posteriormente se diluyeron hasta quedar al 45%. Esta mezcla se prepurificó haciéndola pasar por una columna de octadecil (J. T. Baker) y se eluyó con 1 ml de acetonitrilo al 45% para lavar el material no adherido a la columna. La mezcla se eluyó con concentraciones crecientes de acetonitrilo al 50, 60 y 80 %. Estas muestras prepurificadas se pasaron por HPLC usando una columna Pharmacia Super Pac Pep-S (5 mm, 4 mm x 250mm) con el siguiente protocolo: (1) 5 min de elución isocrática con acetonitrilo al 20%; (2) 30 min de elución isocrática con acetonitrilo al 30%; (3) 30 min de elución isocrática con acetonitrilo al 40%; (4) 15 min de elución isocrática con acetonitrilo al 60%; y (5) un gradiente lineal durante 10 min de acetonitrilo 60-100 %. La elución por el HPLC se realizó con un flujo de 0.7 ml/min y se detectó a 206 nm haciendo un barrido de longitudes de onda con un detector de arreglo de diodos.

V. 5. EXPERIMENTOS DE NODULACIÓN

Los experimentos de nodulación se hicieron con semillas de frijol variedad negro jamapa, usando macetas grandes. Las semillas se esterilizaron con etanol 100%, con cloro 20% y después se lavaron con agua hasta que el olor del cloro desapareció. Esto se lleva a cabo en condiciones de esterilidad para evitar contaminaciones. Las semillas se colocaron después en charolas previamente

esterilizadas, las cuales se mantuvieron por 2 días a 30°C para permitir la germinación de las semillas. Una vez que las semillas germinaron, se transfirieron a las macetas rellenas con vermiculita previamente esterilizadas; se colocaron 5 frijoles germinados en cada maceta y se utilizó una maceta por cada tiempo en los diferentes tratamientos. Se analizaron 35 plantas por condición y se realizaron un total de 4 experimentos de nodulación.

V. 6. INCLUSIÓN DE TEJIDO EN RESINA

A) PREPARACIÓN Y FIJACIÓN DE TEJIDO

Se colectó tejido de la parte superior de las raíces, de plantas inoculadas con la cepa silvestre CE3 o con la mutante en el gen *nolR* en los días 4, 5, 6, y 8 después de inoculación. El tejido se colectó y se fijó con: paraformaldehído 4%, glutaraldehído 1% y buffer fosfatos 0.1M. Los viales conteniendo el tejido se incubaron en agitación suave y finalmente se guardaron a 4°C hasta su inclusión en la resina L. R. White. Esta resina tiene la ventaja de que no utiliza solventes muy tóxicos como es el caso de la Parafina.

Después del proceso de fijación, se realizaron dos lavados con amortiguador fosfatos (Na_2HPO_4 , KHPO_4), con el propósito de eliminar toda traza del fijador. La deshidratación del tejido se llevó a cabo utilizando concentraciones crecientes de etanol: 10, 30, 50, 70, 96 y 100%.

B) IMPREGNACIÓN EN LA RESINA

A partir de aquí se realizó lo que es propiamente la impregnación del tejido en la resina. Después del proceso de deshidratación, el tejido se incubó en una mezcla 1:1 etanol/LRW, por una hora; enseguida se realizó el cambio por la resina pura, con la cual se hicieron 2 cambios más; esto también se llevó a cabo a 4°C, en movimiento y con tiempos de incubación de 1 y 2 hrs. Después de este

proceso, el tejido ya estaba listo para incluirlo en la misma resina. El siguiente paso fue transferir el tejido a los moldes (cápsulas de gelatina), añadiéndoles la resina LRW hasta llenar la cápsula, cada una con su respectiva etiqueta; después de incluir el tejido en la resina, se dejó polimerizando a 55°C por 12 hrs. Teniendo el tejido incluido en la resina, éste se puede conservar por largos períodos de tiempo antes de continuar con el procesamiento.

C) MONTAJE Y TINCIÓN DE LOS CORTES

Se hicieron cortes de 1 y 2 μm con el ultramicrotomo Leica Ultracut R, los cuales se colocaron en los portaobjetos, que se trataron previamente con poly-L-lisina que permite la adhesión del corte al portaobjetos. Posteriormente, se realizó la tinción con Azur B (azur B 0.2%, bicarbonato 1%); este colorante tiñe preferencialmente los núcleos. Finalmente se montaron los cortes utilizando la resina Polymount.

Los cortes se observaron en el microscopio Axioscope Zeiss con los objetivos 10X y 20X y las fotografías se tomaron en el microscopio invertido Nikon con los objetivos 10X y 40X, utilizando una película 100 Gold Kodak.

VI.-RESULTADOS

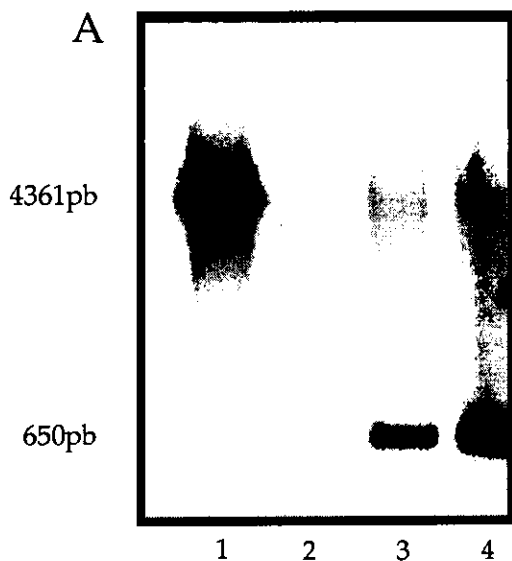
VI.1. CARACTERIZACIÓN DEL GEN *nolR*.

VI.1.1 IDENTIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DEL GEN *nolR* EN *R. etli*, CEPA CE3.

El primer objetivo a cumplir fue aislar el gen *nolR* de *Rhizobium etli* CE3 (*nolR_{Re}*). Kiss y cols. (1998), reportaron la presencia de secuencias homólogas a *nolR* de *S. meliloti* (*nolR_{Sm}*), en varias especies de la familia *Rhizobiaceae*.

Utilizando como sonda el gen *nolR_{Sm}* llevamos a cabo experimentos tipo Southern sobre ADN genómico de *R. etli*, encontrando una señal de hibridación con un fragmento de ~0.65 kb. Estos resultados los obtuvimos tanto con la cepa silvestre CE3, como con la cepa 2001 (curada del plásmido simbiótico) (figura 8, panel A), lo cual indica que este gen no se localiza en el pSym.

Con este resultado se procedió a la búsqueda del gen en un banco genómico de *R. etli*, usando la técnica de hibridación en colonia. De este experimento obtuvimos 6 colonias que hibridaban con la sonda usada (figura 8, panel B). Estas 6 clonas se analizaron por análisis de restricción y análisis tipo Southern. Se concluyó que cuatro fueron falsas positivas y dos fueron positivas corroboradas, por Southern. La sonda utilizada para todos estos experimentos fue el gen *nolR_{Sm}* amplificado por PCR.



B

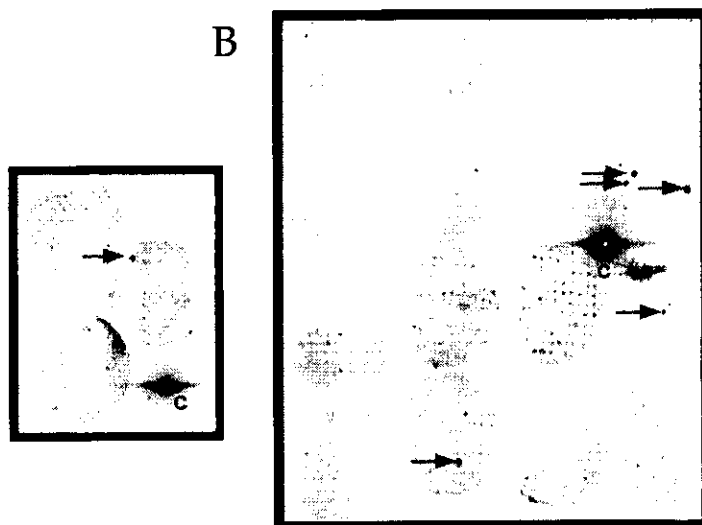


Figura 8. Identificación y aislamiento del gen *nolR* de *R. etli*, por análisis de hibridación tipo Southern y de hibridación en colonia. **A)** Análisis de Southern de ADN's genómicos de *R. etli*, digeridos con Eco RI. Se utilizó una sonda heteróloga de *nolR* de *S. meliloti* (*nolR_{Sm}*). 1: *S. meliloti* (Rm41), 2: MPM, 3: *R. etli* (CE3), 4: *R. etli* 2001 (CE3 pSym-). **B)** Hibridación en colonia a partir de una librería genómica de *R. etli* cepa CE3, la sonda utilizada fue la misma que en A. Las flechas indican las colonias positivas; C es un control positivo de hibridación (ADN de *nolR_{Sm}*).

VI.1.2. CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN *nolR*.

Los fragmentos de ~0.65 kb identificados por Southern, de las 2 clonas obtenidas del banco genómico de *R. etli*, se aislaron y se subclonaron en el vector pSK para secuenciar el gen. Al analizar las secuencias obtenidas de las dos clonas, encontramos que eran la misma secuencia y que las dos contenían el gen *nolR* completo. Obtuvimos secuencia nucleotídica de más de ~100 pb tanto hacia el 5' y como hacia el 3' no traducible del gen.

En la figura 9 se muestra la secuencia nucleotídica completa del gen *nolR_{Re}*. Dentro de esta secuencia, encontramos algunas secuencias consenso como son la secuencia de unión a ribosomas Shine-Delgarno, el codón de inicio, la región que codifica para el motivo HTH de unión a ADN característicos de los reguladores tipo LysR, el codón de término en donde se encuentran tres codones de término juntos y los probables elementos -10 y -35. En la región 5' también está presente una secuencia con identidad muy alta con la secuencia consenso de unión a NolR reportada en *nolR_{Sm}*.

La secuencia nucleotídica obtenida fue en total de 650 pb y muestra un marco de lectura abierto (ORF) de 317 pb. El producto de traducción posible a partir de este ORF es una proteína de 105 residuos de aminoácidos con un peso molecular predicho de 11.5 kDa y con un punto isoeléctrico de 10.2. Esta secuencia se analizó posteriormente utilizando el programa de Gene Works para hacer las comparaciones contra las secuencias del banco de datos. Encontramos una alta identidad a nivel de aminoácidos con las proteínas NolR reportadas de *R. leguminosarum* y *S. meliloti* del 95% y 72%, respectivamente (figura 10, panel A). El dendograma que se muestra en la figura 10, panel B, muestra que la proteína NolR de *R. etli* (NolR_{Re}), está más cercanamente relacionada con

NolR de *R. leguminosarum* (NolR_{RI}), que con la proteína NolR de *S. meliloti* (NolR_{Sm}).

```

GAATTCGAAA CGCTCGCTGT GGATTCCGAT CACATTTGTT CAAACATATC
TAAAATAGCA TACTCGATAC CTTAAATTTA GGTATATAC AATCTTCGAG
CCCAGTTGCT AATTTTGCCG CGGGCTCCGG CAGACAGCCC TTACCAGATA
GATGATGTAC GTTTCGCAT TAGGAAGATA ACAATATGGA AACCCCAAT
TTGGCTGACC ACACGAATGT GGCGGCAGCA CTATTGTCAG CCATGGCCAA
TCCCAAAGA TTGCTGATCC TGTGCAGCCT GGTAAGAGGC GAAGTCGCCG
TCGGAGTGCT CGCCACACAA GTCGGCCTT AGCCAGTCGG CGCTTTCACA
GCACCTTTCG AAAGTGCAGC CGCAGAAGCT GGTCAAGACC CGGCGCGACG
CCCAGACCAT CTAATATTCA GTACATCCAG TCGGTCATGA AGATCCTGGC
GACGCTCGAA GACATCTACC TTGTTCCGAG CAGAAACAGA TCCGCAGCCT
GATGATAGCG CTGACATGAC CGTCAGCCGT GCCCGGTGCC GCACGGGAAT
CCTCCCGGAA GCCTCGGCAA CGATATTTCA GCACGTGAAC CTTAATGGCA
CCGACCGGCA AATCTGGCCG ATTTGCGGGT TGTGTCTTTT GCGAATTCCT
GCAGCGGGGG GATCCACTTA GTTCTAGAAG CGGCCGCGCG GGTGGAGCTC
AGCTTTTTGG TCCCTT

```

Figura 9. Secuencia nucleotídica del gen *nolR* de *R. etli*. Las secuencias en negritas muestran la secuencia Shine-Delgarno, el codón de inicio y el codón de término. Las secuencias con letra más grande indican los elementos -35 y -10 respectivamente. La secuencia subrayada indica el posible sitio de unión de NolR. La secuencia en itálicas y negritas indica la región que codifica para el motivo HTH característico de la familia de reguladores tipo LysR.

A

NbIR <i>S.melloti</i>	MNFRMEHTMQ PLPPEKHEDA EIAAGFLSAM ANPKRLLILD SLVKEEMAVG
NbIR <i>R.etli</i>	ME-----TPNLADHT NVAAALLSAM ANPKRLLILC SLVKGEVAVG
NbIR <i>R.leg</i>	ME-----TSDLADHT NVAAALLSAM ANPKRLLILC SLVKGEVAVG
Consenso	ME-----TP.LADHT NVAAALLSAM ANPKRLLILC SLVKGEVAVG

Motivo HTH

NbIR <i>S.melloti</i>	ALAHKVGLSQ SALSQHLSKL RAQNLVSTRR DAQTIYSSS SDAVLKILGA
NbIR <i>R.etli</i>	VLATQVGLSQ SALSQHLSKL RAQKLVKTRR DAQTIYSSST SESVMKILAT
NbIR <i>R.leg</i>	VLATQVGLSQ SALSQHLSKL RAQKLVKTRR DAQTIYSSST SEPMKILAT
Consenso	VLATQVGLSQ SALSQHLSKL RAQKLVKTRR DAQTIYSSST SE.VMKILAT

NbIR <i>S.melloti</i>	LSDIYGDDTD AVEEKPLVRK SA
NbIR <i>R.etli</i>	LEDIYLV PSR N-----RS AA
NbIR <i>R.leg</i>	LEDIYLVQNR N-----RS AA
Consenso	LEDIYLV . . R N-----RS AA

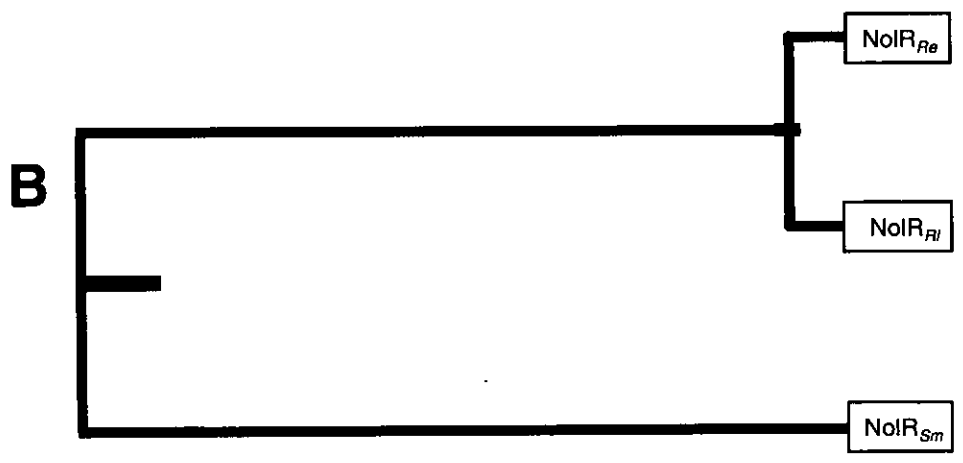


Figura 10. Comparación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas NoIR reportados a la fecha. **A)** Alineamiento a nivel aa de las proteínas NoIR. La proteína NoIR de *R. etli* (NoIR_{Re}) muestra una identidad del 95% y 72% con las secuencias NoIR de *R. leguminosarum* (NoIR_{Rl}) y *S. meliloti* (NoIR_{Sm}), respectivamente. **B)** Dendograma que agrupa las secuencias de las proteínas NoIR de *R. etli*, *R. leguminosarum* y *S. meliloti*. Este análisis muestra que la proteína NoIR_{Re} está más cercanamente relacionada con NoIR_{Rl} que con la proteína NoIR_{Sm}.

VI.1.3. DISTRIBUCIÓN DE *nolR* EN DIFERENTES AISLADOS GEOGRÁFICOS DE *R. etli*.

Con el objeto de determinar si *nolR* estaba presente en otros aislados de *R. etli* y no era una característica exclusiva de la cepa CE3, se realizó un análisis tipo Southern, utilizando ADN de 11 aislados geográficos diferentes. Las cepas probadas fueron aislados hechos por diferentes grupos de investigación en Hawaii, Estados Unidos, Brasil, Belice, Colombia y México (42, 56, 89). También analizamos las especies de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* (VF39), como referencia ya que se sabe que el gen *nolR* está presente en este rhizobio (60) y *Rhizobium tropici* (CIAT 899), para determinar la presencia de *nolR* en esta especie que también nodula frijol.

El resultado de este análisis muestra que efectivamente el gen *nolR* se encuentra presente en los diferentes aislados geográficos de *R. etli*, ya que encontramos secuencias homólogas, en todas las cepas probadas de esta especie, utilizando como sonda el gen *nolR* completo (figura 11, carriles 1-11). Es interesante que en *R. tropici* no hay ninguna señal de hibridación con nuestra sonda, como se puede apreciar en el carril 13, de la figura 11.

VI.1.4. ANÁLISIS TIPO NORTHERN DEL GEN *nolR*

Dentro de los objetivos para caracterizar el gen *nolR* consideramos analizar el tamaño del transcrito de este gen, además nos pareció interesante poder analizar si el inductor de los genes de nodulación (naringenina) provocaba algún efecto sobre la transcripción del ARN mensajero de *nolR*.

El resultado de este análisis se muestra en la figura 12. En el carril 1 se separó el ARN total extraído de *R. etli* CE3 sin inductor y en el carril 2 en presencia del inductor. Como puede observarse, encontramos prácticamente la misma intensidad en la señal de hibridación en las dos condiciones, que corresponden con el peso molecular esperado para un transcrito monocistrónico de ~470 pb.

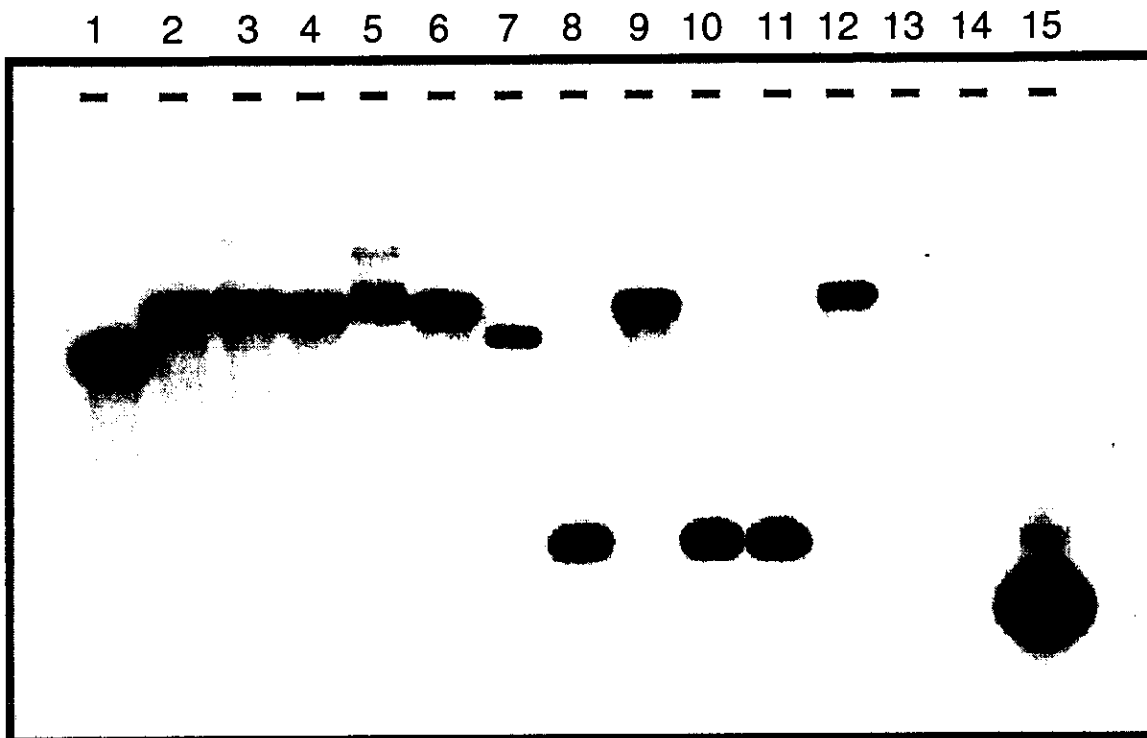


Figura 11. Análisis de hibridación tipo Southern de ADN's genómicos de 11 aislados geográficos diferentes de *R. etli*. Los ADN's totales fueron digeridos con Eco RI. La sonda utilizada fue el gen completo *nolR* de *R. etli* CE3. En los carriles 1-13 se muestran, 1: Tal 182^a, 2: Nitragin 8251^b, 3: Brasil 5^c, 4: F14 (CFN286)^d, 5: Viking^e, 6: CFN1^d, 7: CIAT 894^f, 8: CIAT 895^f, 9: KIM 5^b, 10: CE3^d, 11: 2001 (CE3 pSym-)^d, 12: *R. leg. bv. viciae* (VF39), 13: *R. tropici* (CIAT 899), carril 14: Marcador de peso molecular, 15: Control positivo de la hibridación, región codificante del gen *nolR* amplificado por PCR.

Origen: Hawaia; E.U.^b; Brasil^c; México^d; Belice^e; Colombia^f.

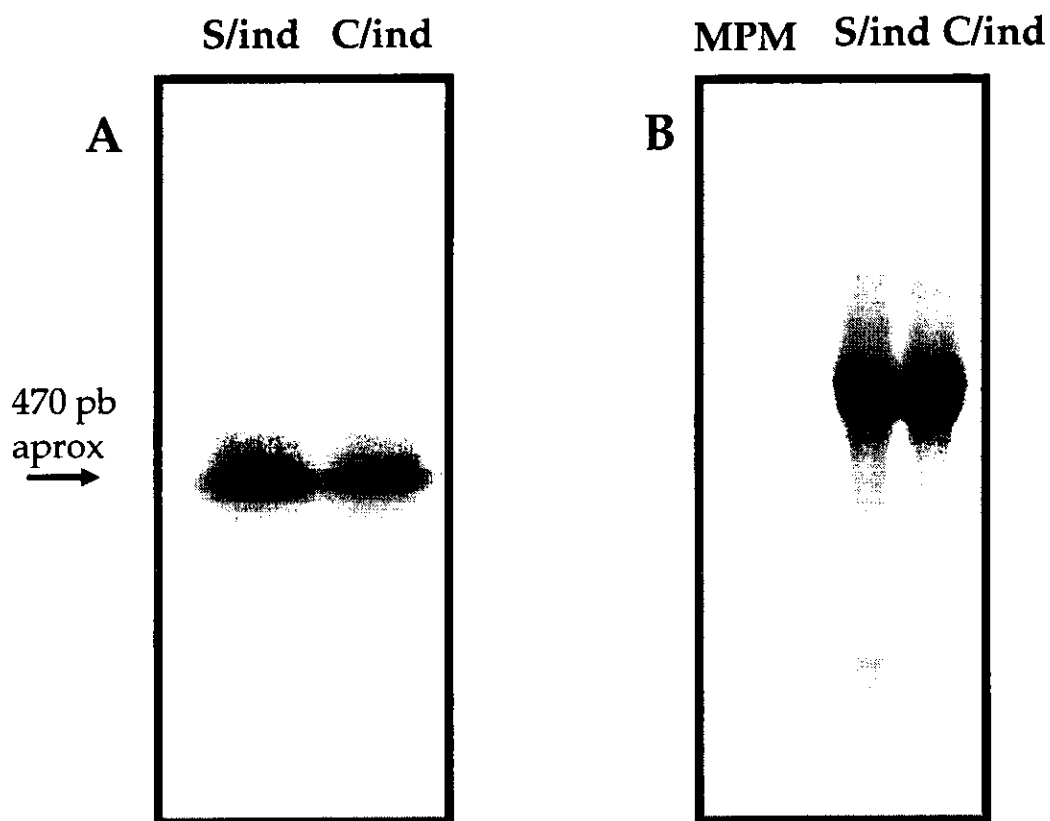


Figura 12. Análisis del ARN mensajero de *nolR*. **A:** Hibridación tipo northern de ARN's totales de *R. etli* cepa CE3; como sonda se utilizó el gen *nolR* completo de la misma cepa. (Figura amplificada). **B:** Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. S/ind: sin inductor, C/ind: con inductor, MPM: marcador de peso molecular.

VI.2. MUTAGÉNESIS DEL GEN *nolR* DE *R. etli* CEPA CE3

Para la mutagénesis del gen *nolR*, por inserción de un cassette de espectinomicina, se eligió el sitio interno *MscI*; se utilizó este sitio, ya que se localiza en la región media del motivo HTH de la secuencia nucleotídica del gen *nolR*.

La estrategia seguida se describe en la figura 6 de material y métodos, y la menciono brevemente: primero se liberó el cassette de espectinomicina del vector pHP45, al digerir este vector con la enzima *SmaI*, por otro lado el plásmido pSK conteniendo al gen *nolR*, se linearizó con la enzima *MscI*. El inserto del cassette de espectinomicina, se clonó en el pSK*nolR*, en el sitio *MscI* en extremos no cohesivos. De esta forma, se obtuvo la construcción pSK*nolR*ΔSp17. Después se purificó el fragmento *NotI-SalI*, que corresponde al gen *nolR* interrumpido por el gen de resistencia a espectinomicina y se subclonó en los sitios *NotI* y *SalI* del vehículo suicida pJQ200SK, de tal manera que al final se obtuvo la construcción pJQ*nolR*ΔSp73.

Para obtener el reemplazamiento del gen *nolR* silvestre por el gen interrumpido, se siguió el protocolo descrito en material y métodos. Como resultado de esto se seleccionaron 19 colonias bacterianas que crecieron en Nal₂₀ Sp₁₀₀ y sacarosa 10%, y que no crecieron o crecieron muy poco en Gm₃₀. Se realizó una segunda selección creciendo en los antibióticos por separado; en la figura 7 de material y métodos se muestra la estrategia de selección de las mutantes. Después de la segunda selección, se tomaron 13 colonias que se analizaron por Southern, para la comprobación de los eventos de doble recombinación. En la figura 13 se muestra el análisis de 5 clonas de las 13 posibles mutantes. El panel A muestra el resultado de la hibridación de las 5 clonas digeridas con *EcoRI* e hibridadas con *nolR*. El

carril 2-2 corresponde a la clona 2-2 que da señal solamente con una banda de un peso molecular aproximado de 2.7 kb, que corresponde con el peso molecular esperado del gen *nolR* interrumpido por el cassette de espectinomicina. Cuando se hibrida contra el cassette de espectinomicina (panel B), se obtiene la misma señal como esperábamos, ya que los sitios *EcoRI* se encuentran flanqueando el gen *nolR*. Cuando se hibrida contra un fragmento interno del vector pJQ200SK no obtenemos señal de hibridación, lo cual indica que el vector ya se ha escindido del genoma bacteriano. Los controles, tanto positivos como negativos son mostrados para cada uno de los experimentos. Las clonas 2-28, 2-20, 2-8 y 2-9 son recombinantes sencillas, ya que contienen ambos genes: el gen silvestre de aproximadamente 0.6 kb y el gen interrumpido de aproximadamente 2.7 kb, que se aprecia en la hibridación contra *nolR*. La clona 19 es una recombinante sencilla que utilizamos como control.

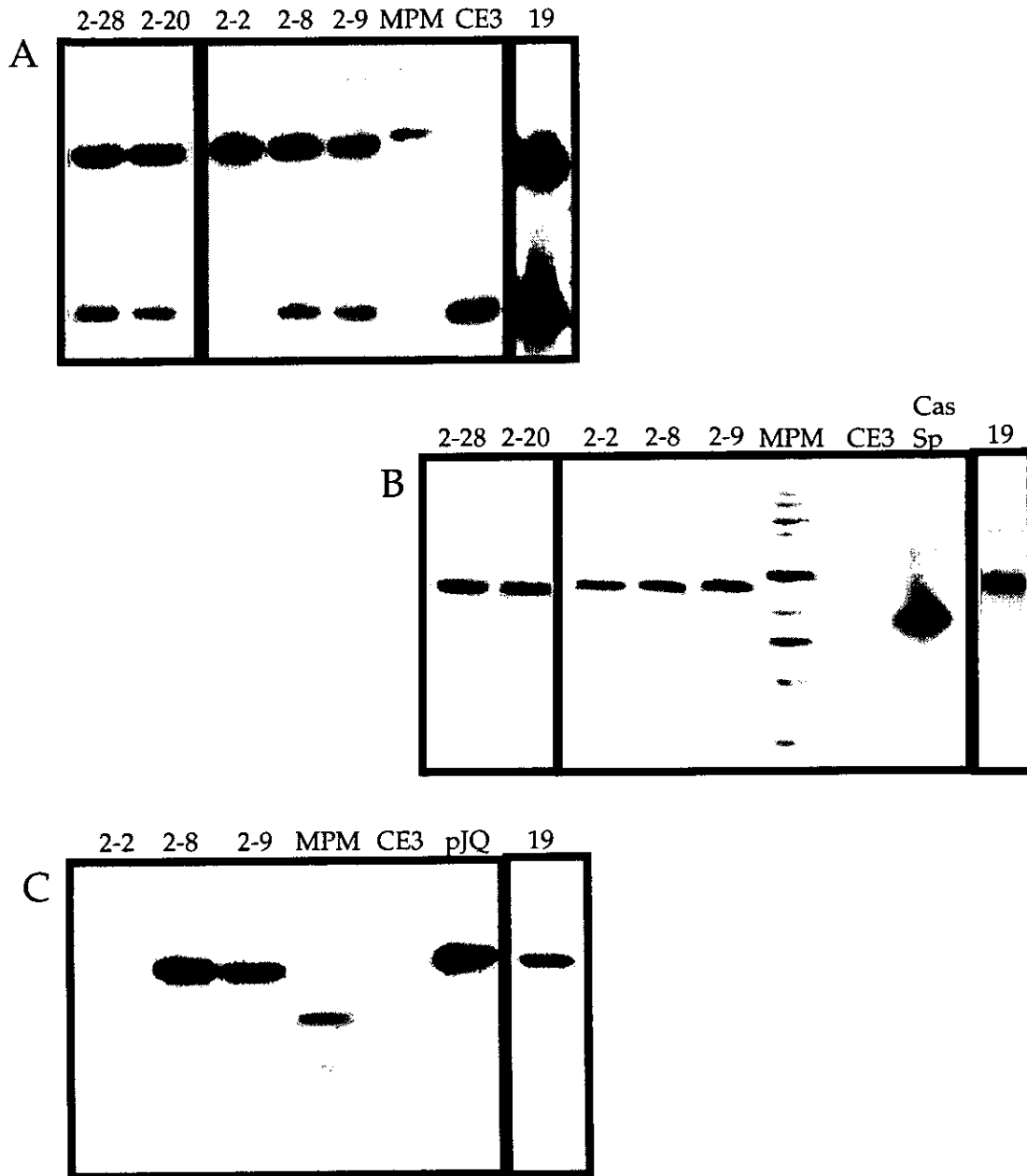


Figura 13. Diferentes análisis de hibridación tipo Southern de ADN's genómicos de 5 posibles mutantes en *nolR*. **A:** La sonda utilizada fue el gen *nolR* completo de *R. etli*, todas las cepas utilizadas se digirieron con Eco RI. **B:** El cassette de espectinomicina fue usado como sonda, todas las cepas se digirieron con Eco RI. **C:** Un fragmento interno del pJQ200 (FipJQ) fue usado como sonda, todas las cepas se digirieron con Hind III.

VI.3 ANÁLISIS DEL FENOTIPO DE LA MUTANTE.

VI.3.1. CINÉTICA DE NODULACIÓN.

Existen reportes de que una mutante *nolR*⁻ en *S. meliloti* (64) afecta el proceso de nodulación, por lo que quisimos analizar mediante cinéticas de nodulación el fenotipo de la mutante *nolR* de *R. etli* (*nolR*^{-Re}). En estos ensayos, utilizamos plantas de *P. vulgaris* inoculadas con la cepa silvestre CE3 y con la cepa mutante *nolR*^{-Re}; como control se utilizaron plantas sin inocular. Las cinéticas se llevaron a cabo desde los 5 días hasta los 23 días después de la inoculación o días postinoculación (dpi), y se colectó material en los días 5, 7, 9, 12, 15, 19 y 23. En cada tiempo se colectaron 5 plantas y se contaron los nódulos de cada planta, para después calcular el promedio. De los 5 valores obtenidos en cada tiempo, fue necesario eliminar el valor más alto y el valor más bajo para reducir las desviaciones estándar, que en este tipo de experimentos suelen ser elevadas, debido a la influencia de los factores ambientales, que algunas veces no se pueden controlar enteramente. El promedio del número de nódulos de 3 plantas se graficó en función de los días después de la inoculación (figura 14).

Como puede observarse en la figura 14, encontramos algunas diferencias durante los primeros 15 dpi. A los 5 dpi, encontramos nódulos claramente visibles en las raíces de las plantas inoculadas con la cepa silvestre, mientras que en las plantas inoculadas con la mutante, sólo se distinguen pequeñas protuberancias, las cuales no consideramos como nódulos en este estudio (figuras 14 y 15-1). A los 7 y los 15 dpi, no se aprecian grandes diferencias en cuanto al promedio de nódulos por planta; sin embargo, a los 12 días se observa una diferencia significativa, como se muestra en la figura 14. A los 20 y 25 dpi no se distinguen diferencias en el número promedio de nódulos. En la figura 15 (1 y 2) se observan

diferencias en el desarrollo de los nódulos de las plantas inoculadas con la mutante *nolR_{Re}*, en comparación con la silvestre CE3. Los nódulos a los 6 días son visibles en la silvestre pero no en la mutante y a los 9 y 12 dpi son más pequeños en las plantas inoculadas con la mutante *nolR_{Re}* que en las inoculadas con la silvestre . La diferencia en el desarrollo de los nódulos fue notorio en todos los tiempos analizados. Es importante mencionar que a los 19 días, los nódulos inducidos por la silvestre tenían un color rosa fuerte, al igual que los nódulos inducidos por la mutante; sin embargo no realizamos experimentos de reducción de acetileno para analizar la fijación de nitrógeno en estos nódulos.

VI.3.2. ANÁLISIS POR MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO DE CORTES DE NÓDULOS.

En función de los resultados obtenidos en la cinética de nodulación esto es, la diferencia a nivel macroscópico en el desarrollo de los nódulos inducidos por la cepa mutante *nolR_{Re}* en comparación con la cepa silvestre, nos pareció interesante poder estudiar a nivel microscópico posibles diferencias en los nódulos inducidos por una y otra cepa.

Para esto llevamos a cabo un estudio comparativo por microscopía de luz sobre cortes de 1 y 2 μm de primordios o nódulos, colectados a 4, 5, 6 y 8 dpi con la mutante o con la silvestre. El proceso de preparación, fijación, impregnación y observación de los tejidos se llevo a cabo como se describe en material y métodos.

En la figura 16-1 se muestran las micrografías de secciones longitudinales de nódulos colectados a 4 y 5 dpi. En A y C se muestran los cortes correspondientes a los nódulos obtenidos con la cepa silvestre CE3. En B y D se muestran los cortes correspondientes a los nódulos inducidos

por la cepa mutante *nolR^{-Re}*. En A, se observan divisiones celulares múltiples en comparación con el corte del nódulo mostrado en B, en donde se ve que hay menos división meristemática en el córtex, como si la infección fuera más corta. En D hay una desorganización celular en comparación con C, donde se observa un arreglo más uniforme de las células del córtex en división. En D, se puede observar que las divisiones celulares se dan por zonas como se indica con las flechas, ésto no sucede en C.

En la figura 16-2 se muestran las micrografías de los nódulos en los días 6 y 8 dpi. Para el día 6, en los nódulos inducidos con la mutante (panel B), se observan células de diferentes tamaños (ver flechas), que se ven heterogéneas. Para el día 8, los cortes en los nódulos inducidos con la silvestre, lo mismo que con la mutante (comparar nódulo izquierdo del panel C, con el nódulo del panel D), se observan muy parecidos. En las micrografías C y D se muestran las regiones centrales de nódulos inducidos con la silvestre y con la mutante *nolR^{-Re}*, respectivamente; se observan las células infectadas y los bacteroides dentro de ellas (ver flechas). Aunque parece haber diferencias en las regiones de estos nódulos mostradas en las micrografías, no se pueden comparar ya que el plano del corte es diferente para cada nódulo.

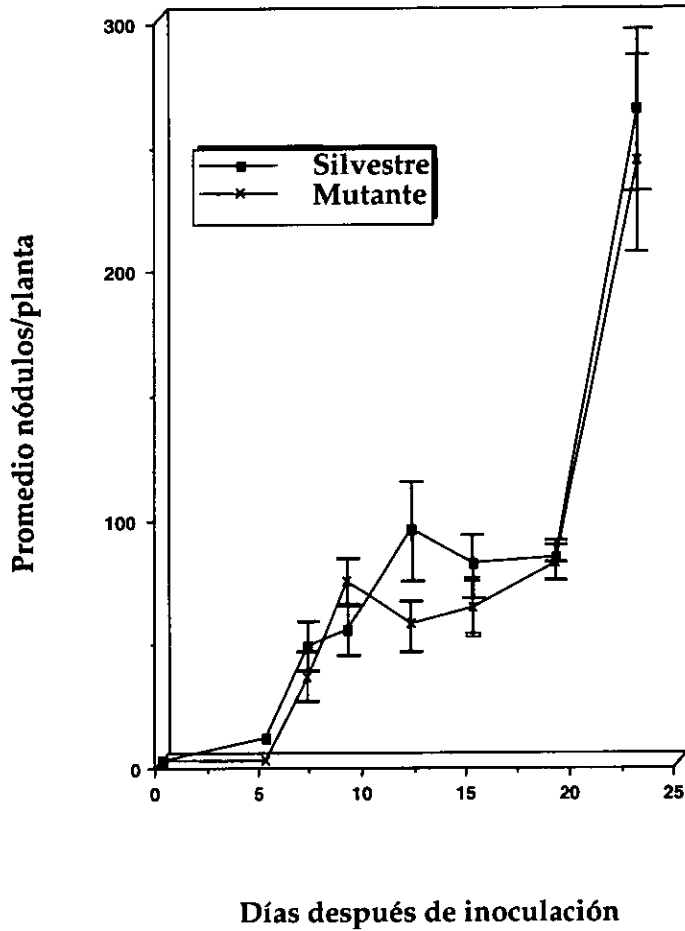


Figura 14. Cinética de nodulación de la cepa mutante $nolR_{Re}^-$ en raíces de *P. vulgaris*. Los datos mostrados corresponden a un solo experimento cuantificando los nódulos de 3 plantas.

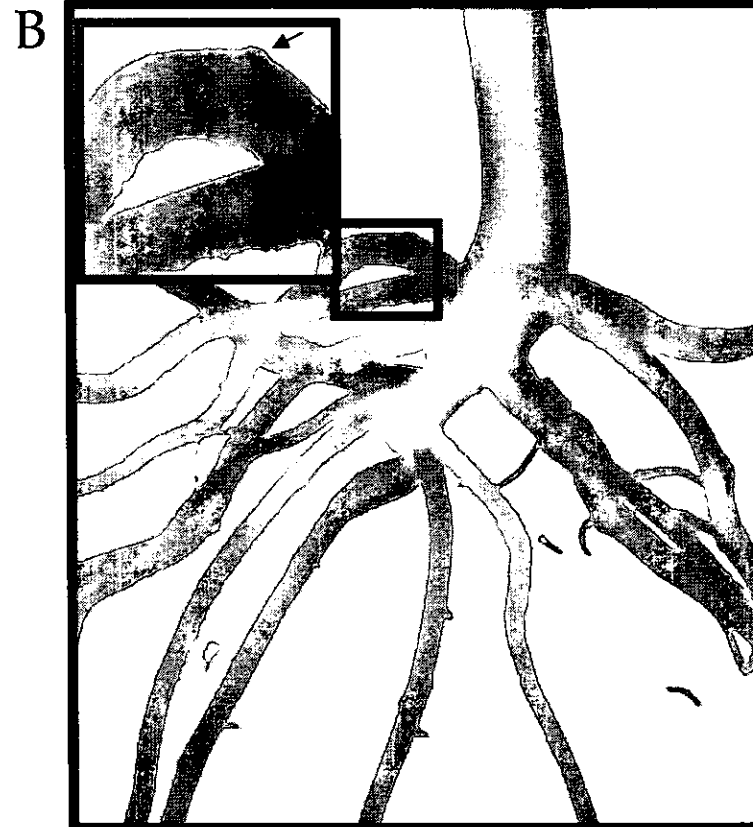
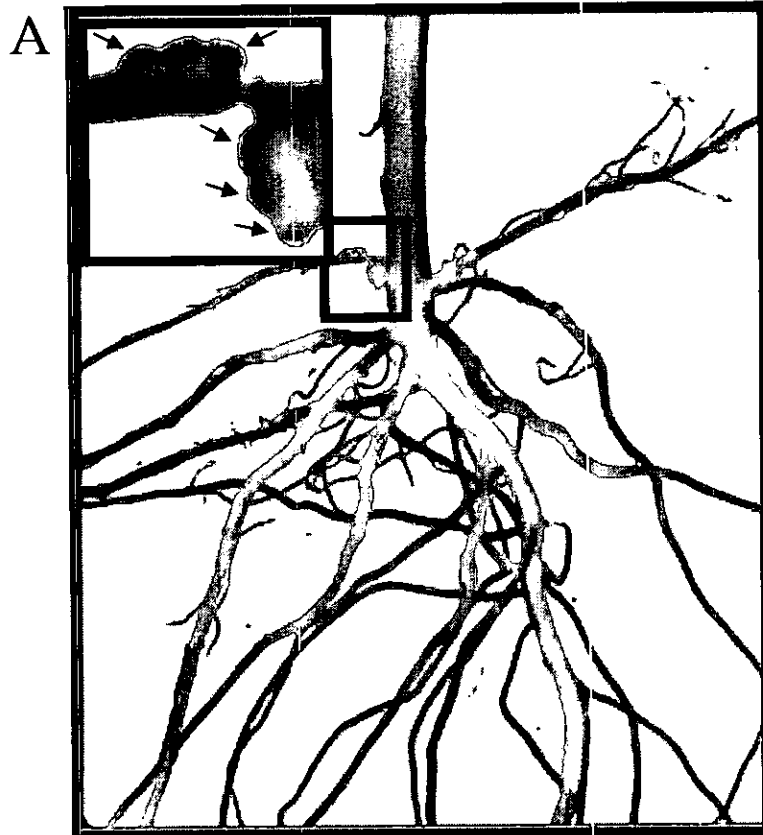


Figura 15-1. Nódulos formados en raíces de *P. vulgaris*, 6 días después de haber sido inoculadas o días postinoculación (dpi), en **A**: con la cepa CE3 y en **B**: con la cepa nolR_{Re}. En los recuadros se muestra un acercamiento de la raíz. Las flechas indican en **A** los nódulos y en **B** la protuberancia.

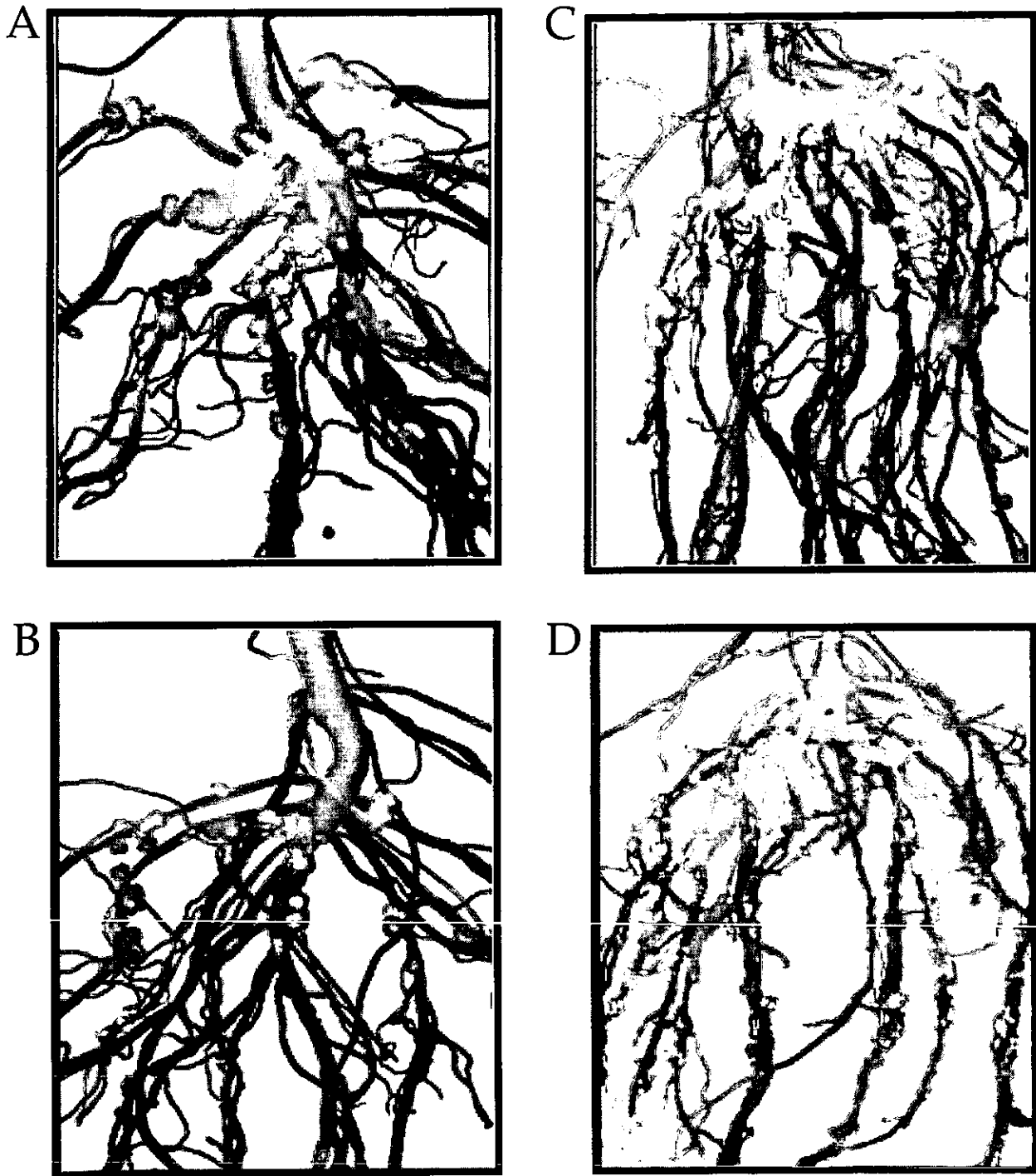


Figura 15-2. Nódulos formados en raíces de *P. vulgaris*. A y C: Plantas inoculadas con la cepa CE3, monitoreadas a los 9 y 12 dpi respectivamente. B y D: Plantas inoculadas con la cepa nolR_{Re} monitoreadas a los 9 y 12 dpi respectivamente.

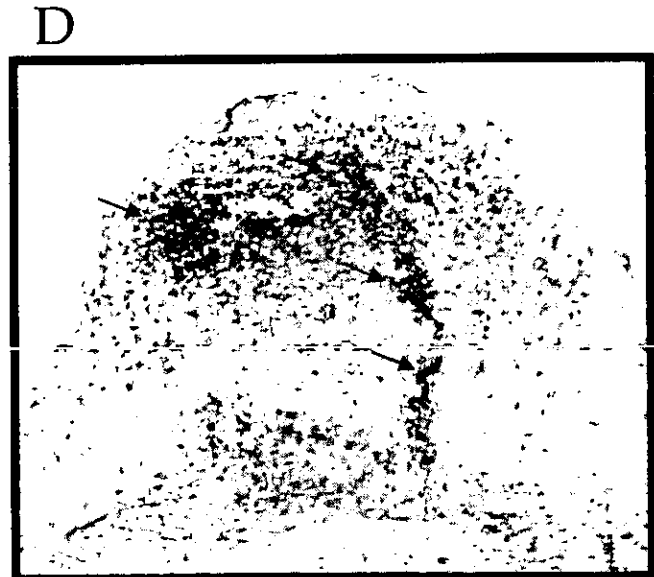
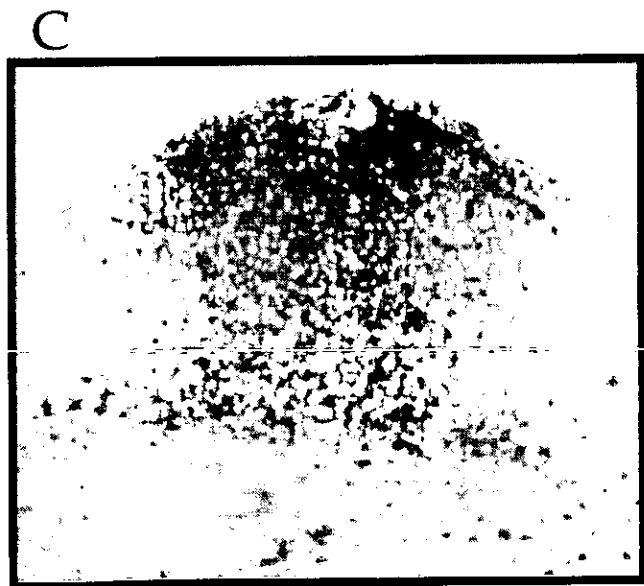
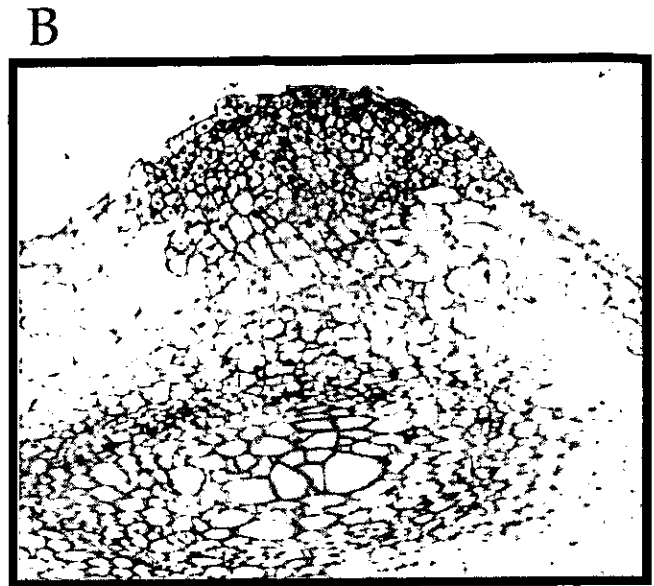
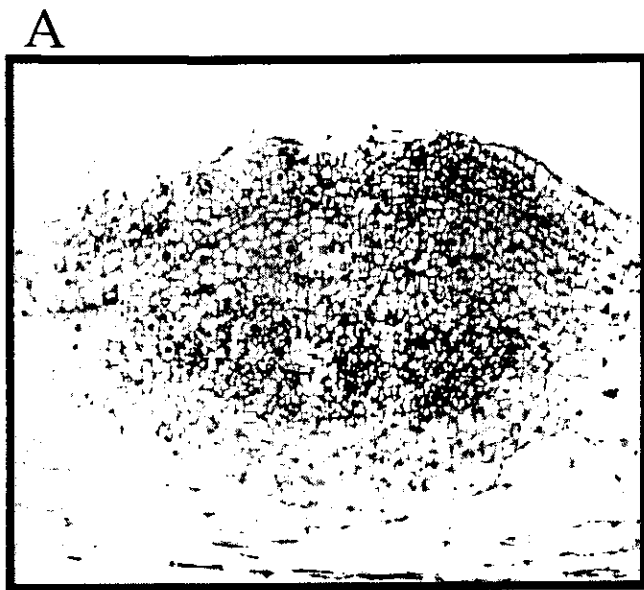


Figura 16-1. A y C: Micrografías de nódulos de *P. vulgaris* infectados con la cepa CE3; 4 y 5 dpi respectivamente. B y D: Micrografías de nódulos de *P. vulgaris* infectados con la cepa nolR_{Re}; 4 y 5 dpi respectivamente. Las flechas en D indican las zonas de división intensa.

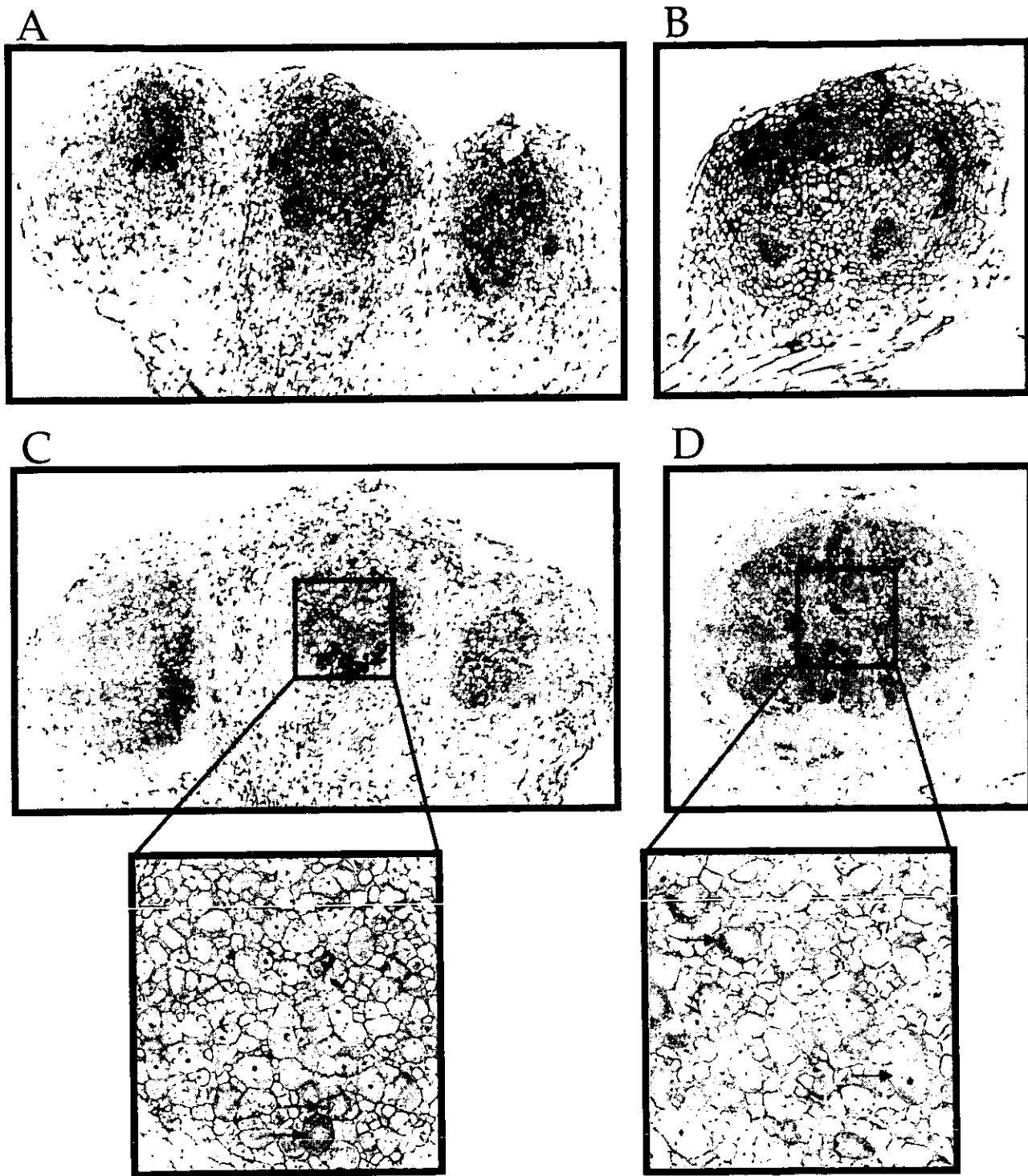


Figura 16-2. A y C: Micrografías de nódulos de *P. vulgaris* infectados con la cepa CE3; 6 y 8 dpi respectivamente. B y D: Micrografías de nódulos de frijol infectados con la cepa nolR_{Re}; 6 y 8 dpi respectivamente. Las flechas en B indican las células de tamaño diferente.

VI.3.3. ANÁLISIS DE LOS FACTORES DE NODULACIÓN POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC).

En base a reportes previos en *S. meliloti*, en donde se describe que *NolR* ejerce un efecto sobre la transcripción de los genes de nodulación comunes, encargados de sintetizar el esqueleto de los factores Nod (22), decidimos analizar la secreción de los factores de nodulación, por TLC en la mutante *nolR*_{Re}, tal y como se describe en material y métodos. Estos experimentos se llevaron a cabo utilizando *D*-(*l*-¹⁴C)-glucosamina como precursor radioactivo de los factores Nod y en presencia o ausencia de naringenina, como inductor de la transcripción de los genes de nodulación. En la figura 17 se muestran los resultados obtenidos por TLC de los FNs secretados tanto por la cepa silvestre como por la cepa mutante *nolR*_{Re}. A las 8 hrs (panel A), 17 hrs (panel B) y 24 hrs (panel C) de crecimiento, fue clara la disminución de los factores secretados por la mutante *nolR*_{Re} comparado con los factores producidos por la silvestre CE3. Estos resultados también se analizaron graficando la intensidad de cada una de las señales radioactivas en píxeles, contra los centímetros que abarcaba la señal radioactiva. Estos resultados se muestran en los recuadros de la parte inferior de los paneles A, B y C (figura 17). Y muestran también una disminución en la intensidad de la señal de aproximadamente entre 21 y 38 % lo cual sugiere que la cepa mutante *nolR*_{Re} secreta alrededor de un 30% menos de FNs que la cepa silvestre CE3. Estos experimentos se llevaron a cabo por triplicado para cada tiempo.

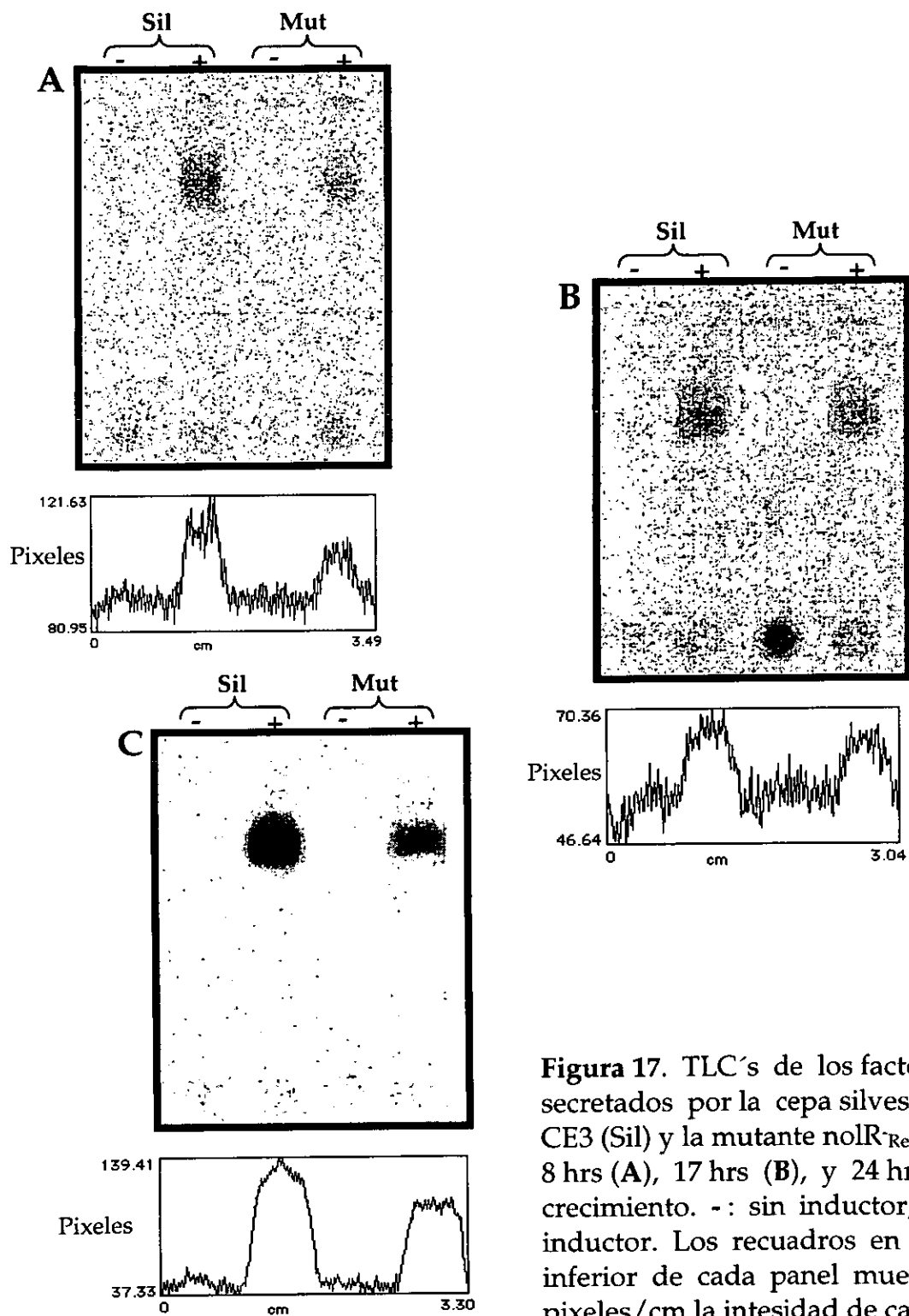


Figura 17. TLC's de los factores Nod secretados por la cepa silvestre *R. etli* CE3 (Sil) y la mutante *noIR_{Re}* (Mut). A 8 hrs (A), 17 hrs (B), y 24 hrs (C) de crecimiento. -: sin inductor, +: con inductor. Los recuadros en la parte inferior de cada panel muestran en pixeles/cm la intensidad de cada señal obtenida por TLC.

VI.3.4. ANÁLISIS DE LOS FACTORES POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.

Tomando en consideración que existe el antecedente en *S. meliloti* de que una mutante en el gen *noIR* induce cambios cualitativos de los FNs decidimos estudiar si había alguna diferencia con respecto al perfil de los FNs secretados por la mutante *noIR_{Re}* versus la silvestre CE3. Para esto, se purificaron FNs tanto de la cepa silvestre como de la cepa mutante por HPLC, siguiendo el protocolo descrito en material y métodos.

Como se puede observar en la figura 18 (paneles A y B), no encontramos diferencias significativas en los perfiles de elución con respecto a la velocidad de retención, secretados por las cepas silvestre y la cepa mutante *noIR_{Re}*; los picos obtenidos corresponden a los FNs típicos secretados por *R. etli* silvestre (14). Sin embargo, se observa una disminución en la cantidad total de los factores secretados por la mutante *noIR_{Re}*, lo cual también se observó en los experimentos de TLC, lo que se discutirá en la siguiente sección.

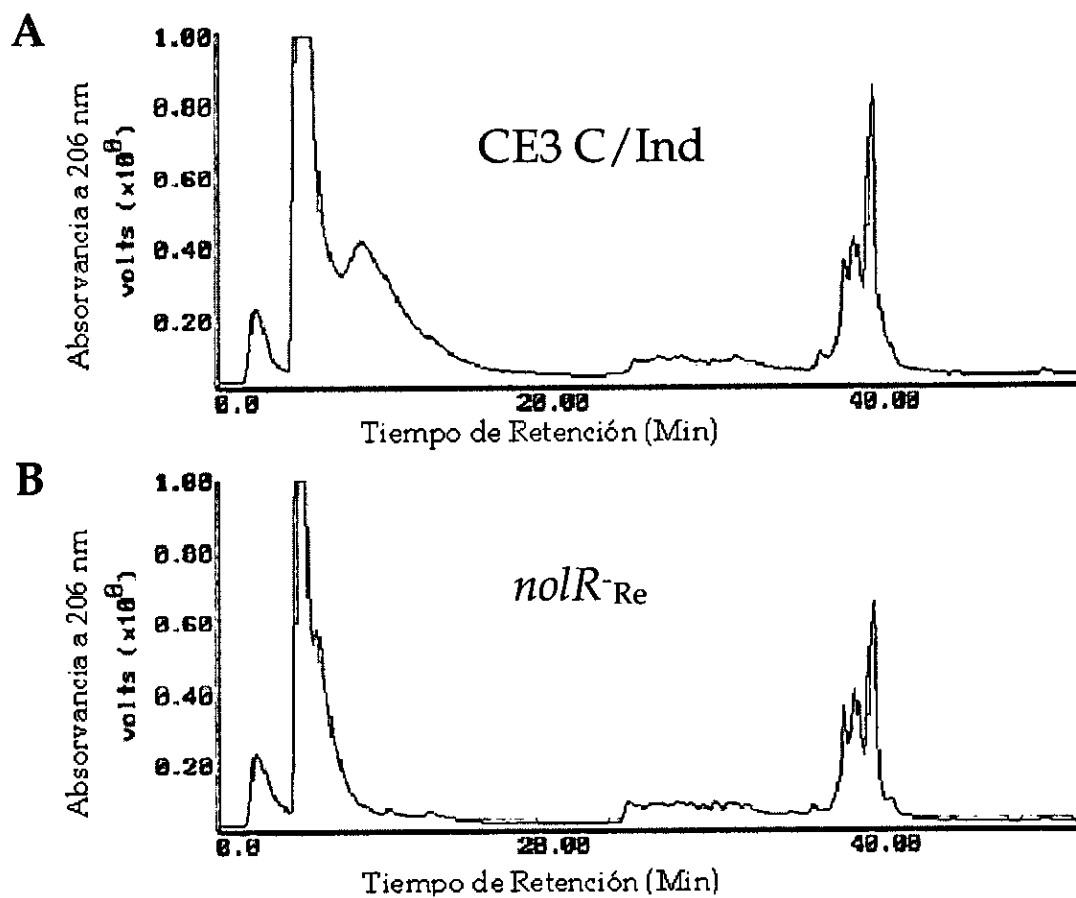


Figura 18. Cromatograma de HPLC. **A:** Factores Nod de la cepa CE3 con inductor. **B:** Factores Nod de la cepa mutante *nolR*^{-Re} con inductor.

VI.4. CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA NOLR

VI.4.1. SOBREENPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN GST-NOLR.

Uno de los intereses centrales del trabajo ha sido estudiar la función de la proteína NolR en *R. etli*. Dado que NolR es una proteína reguladora, no se esperaba que se encontrara presente en concentraciones elevadas, por lo que decidimos sobreexpresarla en *Escherichia coli*, para obtener proteína suficiente para llevar a cabo diferentes ensayos. Las estrategias para la sobreexpresión y purificación de NolR se detallan en material y métodos.

En la figura 19 se muestra el análisis de la sobreexpresión y purificación de la proteína GST-NolR por SDS-PAGE (ver material y métodos). En el panel A, se muestra la sobreexpresión de la proteína de fusión GST-NolR. Como se puede apreciar, NolR no se sobreexpresa fuertemente (carriles 1 y 2), comparado con la sobreexpresión de la proteína GST (carriles 3 y 4). En el panel B se muestran los pasos de purificación de la proteína GST-NolR. El carril 1 es el marcador de peso molecular (MPM), el carril 2 es el extracto proteico total, el carril 3 es la elución con glutatión reducido 10 mM y el carril 4 es la elución con SDS 2%. Como puede observarse, estas eluciones despegan bastante proteína de fusión, lo que es indicativo de que la GST-NolR se une muy bien a la resina de purificación. Esto nos permitió obtener un rendimiento de 60 µg de proteína por 100 ml de cultivo, que fue suficiente para llevar a cabo todos los ensayos de Southwestern.

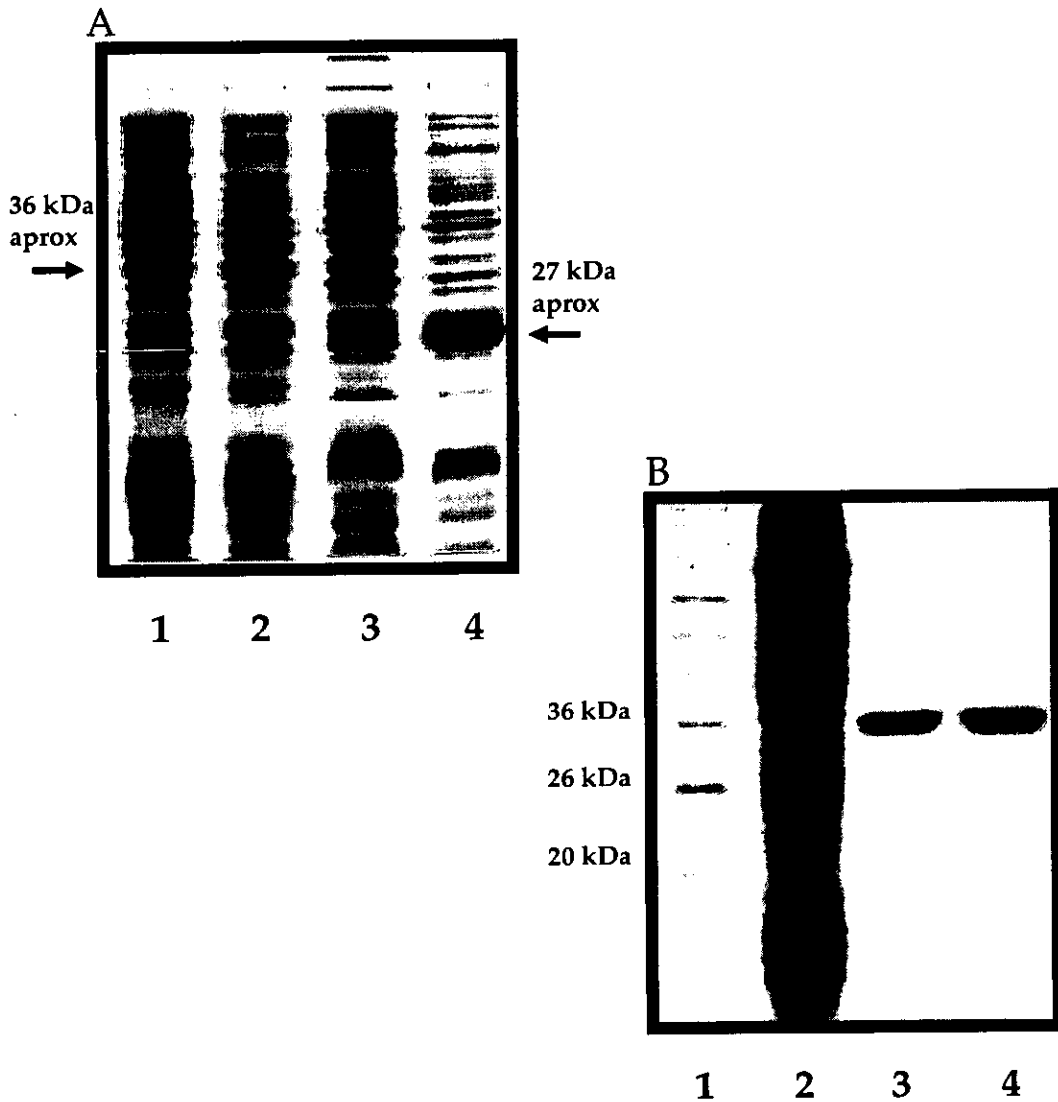


Figura 19. Sobreexpresión y purificación de la proteína de fusión GST-NolR analizada por SDS-PAGE. **A:** Análisis de la sobreexpresión de la proteína de fusión GST-NolR (1; GST-NolR no inducida, 2; GST-NolR inducida con IPTG), como control positivo se muestra la sobreexpresión de GST (3; GST no inducida, 4; GST inducida con IPTG). **B:** Análisis de los pasos de la purificación de GST-NolR, 1) Marcador de peso molecular, 2) Extracto crudo, 3) Elución con glutatión reducido 10 mM, 4) Elución con SDS 2%.

VI.4.2. ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE UNIÓN POR SOUTHWESTERN.

Dado que se ha propuesto que $NolR_{Sm}$ reconoce secuencias consenso en el ADN, decidimos estudiar si $NolR_{Re}$ es capaz de reconocer estos sitios; estos experimentos se realizaron mediante la técnica de Southwestern. Esta técnica nos permite estudiar *in vitro* las interacciones proteína-ADN (ver material y métodos).

Para llevar a cabo experimentos de este tipo, se utilizaron las muestras de la proteína eluída con glutatión reducido (ver figura 18, panel B); como sonda se utilizó un producto de PCR de 460 pb, que lleva el sitio probable de unión específico para $NolR$, localizado en la región promotora del gen *nolE*. En *R. etli*, corriente abajo de *nolE* se encuentra el gen *nodD1* presumiblemente formando parte del mismo operón (ver figura 20).

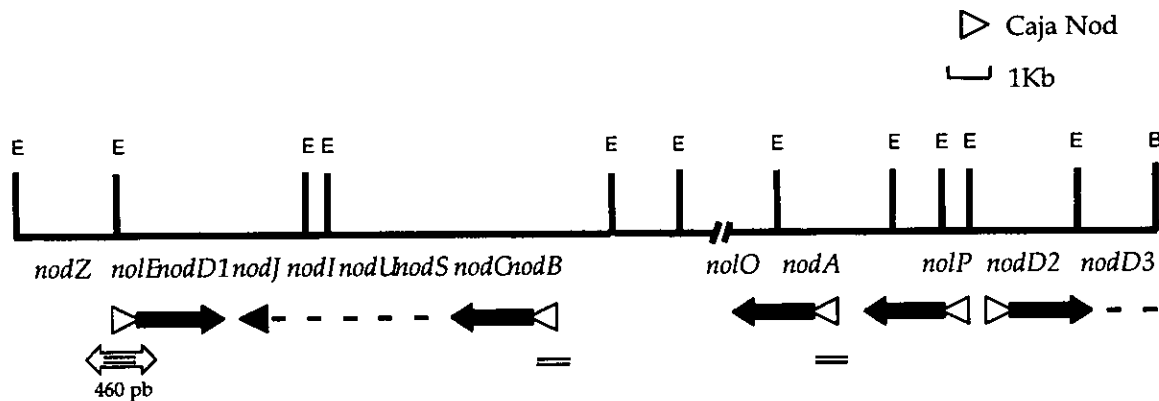


Figura 20. Región simbiótica en el pSym de *Rhizobium etli*. La flecha con dirección en ambos sentidos indica la localización de la región del ADN utilizada en los experimentos de Southwestern. La doble raya indica el sitio donde se localiza la secuencia consenso de unión de $NolR$.

En *R. etli*, existen por lo menos 3 secuencias consenso de unión de $NolR$ (ver figura 21), localizadas en las regiones promotoras de los genes *nolE*, *nodA* y *nodBC* (ver figura 20). Para los experimentos de Southwestern decidimos utilizar la secuencia consenso del gen *nolE* ubicada en un fragmento de 460 pb, ya que podíamos obtener fácilmente el fragmento mediante amplificación por PCR.

<i>nodA</i>	ATTAGAAGCGCCCCAA
<i>nodB</i>	ATTAGACGAGCATCTT
<i>nodE</i>	AATAGATTTACCAAT
Secuencia consenso	(A/T)TTAG-N(9)-A(T/A)

Figura 21. Secuencias probables de unión de NolR encontradas en *R. etli* (60)

No encontramos ninguna de éstas secuencias “consenso” en las regiones promotoras de los genes *nodD2* y *nodD3* de *R. leg. bv phaseoli* que comparte muchas similitudes con *R. etli*. En *R. etli* no se hizo esta búsqueda ya que todavía no esta disponible la secuencia del pSym que se esta llevando a cabo en el CIFN-UNAM.

Los resultados de los ensayos de Southwestern se muestran en las figuras 22 y 23.

En el panel A de la figura 22, se muestra el experimento de Southwestern utilizando como sonda el producto de PCR de 460 pb y analizando distintas fracciones de la purificación de la proteína GST-NolR, que se muestran en el panel B teñidas con el colorante azul de Coomassie. En A se observa claramente una señal de una proteína de aprox. 36 kDa; este tamaño corresponde con el peso molecular de la proteína GST-NolR. En el panel C de la misma figura, se muestra el experimento de Southwestern utilizando ahora como sonda un “oligo” sintetizado de 16 pb, que corresponde al sitio exacto que se propone, reconoce NolR para unirse al ADN. En el panel D, se muestra la proteína GST-NolR purificada

teñida con Azul de Coomassie. Como se puede ver también en este experimento se observa la señal de la proteína de 36 kDa. Estos resultados nos indican que existe una interacción entre la proteína GST-NolR y las secuencias "consenso" probadas.

Para corroborar que la interacción entre la proteína y el ADN es específica, llevamos a cabo ensayos de competencia, utilizando la misma técnica. El objetivo con estos ensayos es competir el ADN marcado con el mismo ADN pero sin marcar (frío), de manera tal que el ADN frío desplace al ADN marcado. En la figura 23, paneles A, B y C, se muestra el resultado de los experimentos tipo Southwestern: las 3 sondas utilizadas para cada uno de estos ensayos se marcaron bajo las mismas condiciones y usamos para ello 1.2 μg de ADN. En los paneles B y C se observa una disminución de la intensidad de la señal, dependiendo de cuanto ADN se ha agregado. Las sondas utilizadas en los ensayos de los paneles C y D, después de haber sido marcadas se incubaron por 1 hr con .9 μg y 1.2 μg del mismo ADN pero sin marcar. En el panel D se muestran las proteínas probadas en A, B y C teñidas con Azul de Coomassie. Para asegurarnos que nuestra sonda reconocía solamente a NolR utilizamos como control la proteína GST purificada. Como puede observarse en los paneles A, B y C, la proteína GST no da ninguna señal por lo que proponemos que la proteína reconocida es NolR.

Para probar que la señal del anticuerpo anti-digoxigenina era específica para el ADN marcado, se llevó a cabo otro experimento control para esto se utilizó una membrana que no se incubó con ADN. El anticuerpo no dio ninguna señal, lo cual indica que la señal que reconoce es específica para el ADN marcado. Por otro lado, un último control que hicimos, fue competir el ADN específico con ADN inespecífico y llevar a

cabo el experimento, el resultado obtenido es que la señal no se compite, con ADN inespecífico (datos no mostrados).

Todos estos experimentos en su conjunto demuestran que existe una interacción de NoIR con los ADN's que llevan las secuencias consenso utilizados en este estudio, siendo esta interacción altamente específica.

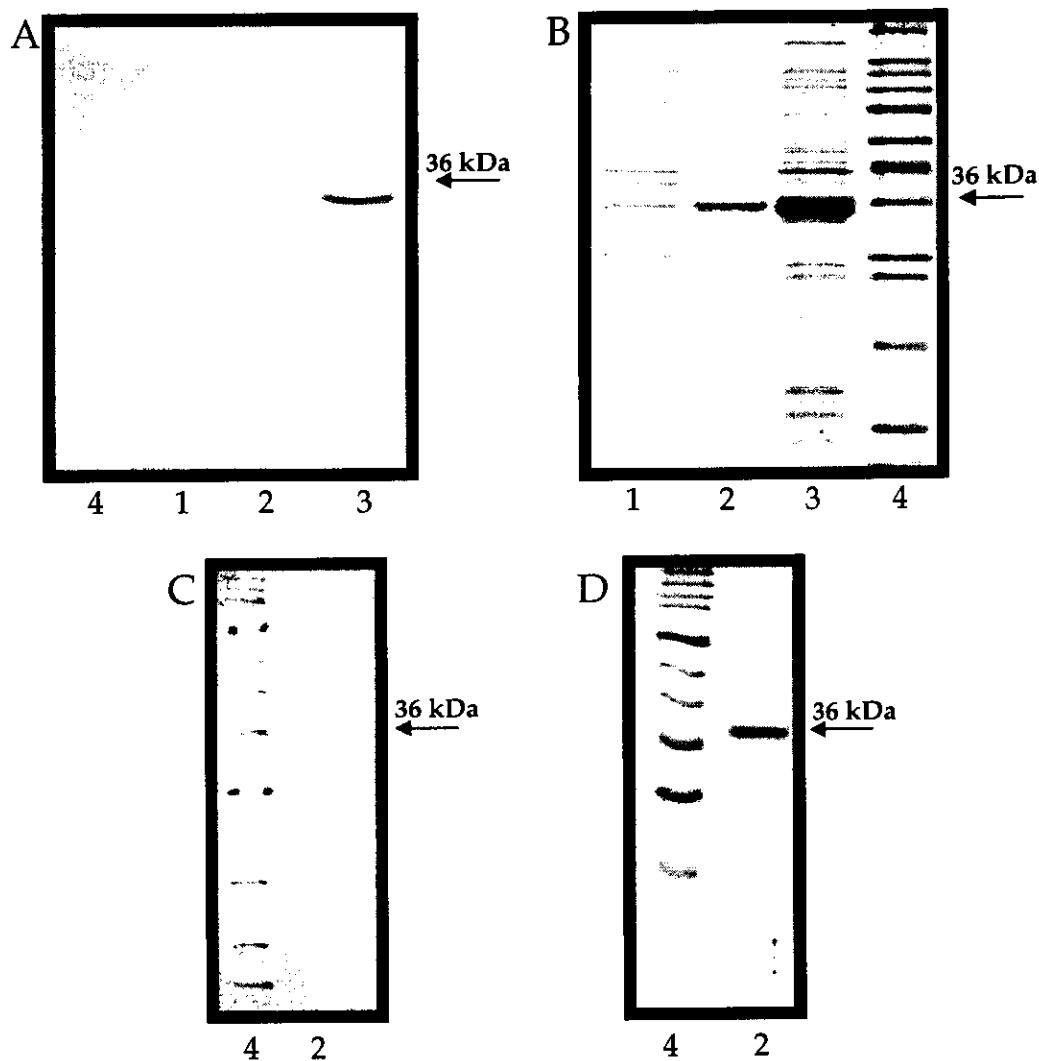


Figura 22. Análisis de la interacción de GST-NolR con ADN específico. **A:** Experimento tipo Southwestern utilizando las muestras de la purificación de GST-NolR hibridadas contra una región de 460 pb que lleva el sitio de unión para NolR. **C:** Southwestern utilizando la GST-NolR hibridada contra un oligo de 16 pb que conforma el sitio exacto de unión para NolR. **B y D:** Tinción con azul de Coomassie de las proteínas utilizadas en los ensayos de A y C. 1) extracto crudo, 2) elución con glutatión, 3) elución con SDS 2%, 4) Marcador de peso molecular.

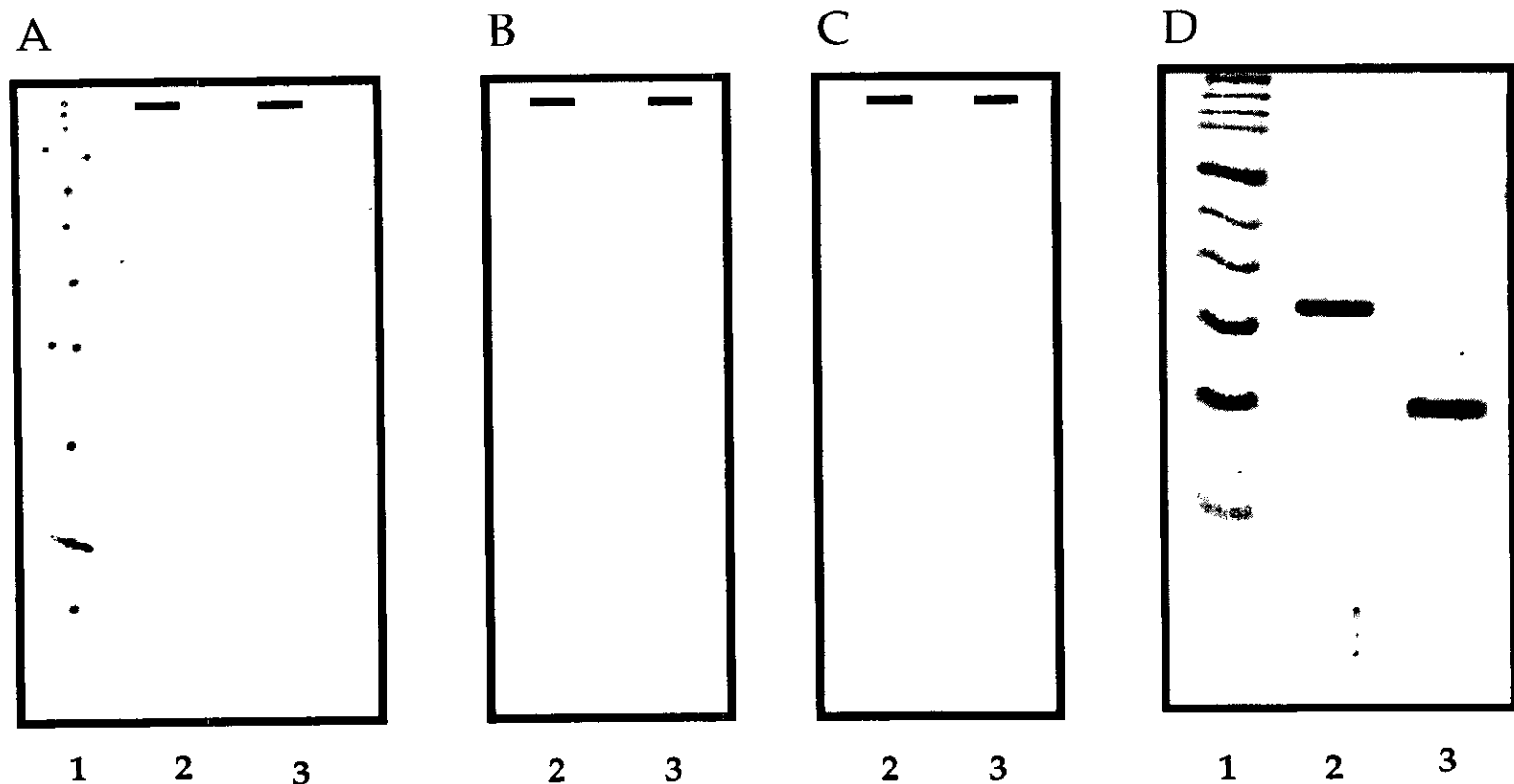


Figura 23. Ensayo de Competencia. **A, B y C:** Southwesterns, utilizando 1.2 μg de ADN marcado con dUTP-11-DIG. En **B y C:** utilizando además 0.9 μg y 1.2 μg de ADN no marcado o frío respectivamente, para competir el ADN marcado. **D:** Tinción con azul de Coomassie de las proteínas utilizadas en los ensayos de **A, B y C.** 1) Marcador de peso molecular, 2) GST-NolR, 3) GST. La sonda utilizada fue la región promotora del gen *nolE* amplificada por PCR con un tamaño de 460 pb.

VII.- DISCUSIÓN

NolR es un gen que ha sido estudiado intensamente en *S. meliloti* (*nolR_{Sm}*) y se ha descrito como el represor de los genes de nodulación que junto con otros elementos reguladores de *S. meliloti*, como los genes *nodD*'s y *syrM*, llevan a cabo una red compleja de regulación, para dar lugar a una nodulación óptima en su planta hospedera: alfalfa.

El estudiar los genes reguladores presentes en *R. etli* CE3 ha sido un interés general del grupo: esto nos llevó a iniciar el estudio del gen *nolR*, como un primer enfoque para disectar los circuitos reguladores en esta especie. En el presente trabajo, mostramos la caracterización estructural y funcional del gen *nolR* y la caracterización parcial de la función de la proteína NolR en *R. etli*.

Utilizando una sonda heteróloga del gen *nolR_{Sm}*, detectamos y aislamos el gen de *R. etli*. Al hacer el análisis de la secuencia, encontramos varias secuencias consenso características como: el sitio de unión a ribosomas (Shine-Delgarno) en la región 5' no traducible, 7 pb hacia arriba del codón de inicio. Su ubicación en el cromosoma y su secuencia nucleotídica es prácticamente la misma que en el gen *nolR* de *R. leg. bv. viciae*, lo cual se ve reflejado en el análisis de la secuencia a nivel de aminoácidos que muestra una alta identidad del 95% con la proteína NolR de *R. leg. bv viciae*, y del 72% con la proteína NolR de *S. meliloti* (22, 60).

Otra característica que comparten los genes *nolR* en sus regiones promotoras es la presencia de una secuencia consenso de unión a NolR (22, 60). En el caso de *S. meliloti*, se ha demostrado que NolR se une a esta región para autorregularse. Esta región también la encontramos en *R. etli*,

lo cual sugiere que muy probablemente *nolR_{Re}* sea también capaz de autorregularse; sin embargo, necesitan realizarse los experimentos que comprueben o descarten esta posibilidad. También encontramos que en la región 3', de los genes *nolR* de *R. leg. bv. viciae* y *R. etli*, el codón de termino se repite 3 veces, lo cual no sucede en el caso de *S. meliloti*.

Para tratar de entender el papel que juega este gen en el proceso de la nodulación, nos abocamos a la generación de una mutante y posteriormente analizamos su fenotipo mediante varios criterios.

Generamos una mutante en el gen *nolR* por inserción de un cassette de espectinomicina y la analizamos para corroborar la selección de la doble recombinante. Durante la selección de la mutante, encontramos eventos de recombinación sencilla, lo cual es normal durante los experimentos donde se desean seleccionar dobles recombinantes (93). La obtención de la mutante se confirmó por análisis tipo Southern donde se observó un aumento en el peso molecular del fragmento correspondiente al gen *nolR* interrumpido por el gen de resistencia a espectinomicina (figura 13), así como por la adquisición de resistencia al antibiótico espectinomicina.

Anteriormente se reportaron mutantes en este gen por inserción de un transposón en *S. meliloti* (64) y por inserción de un cassette de kanamicina en *R. leg. bv. viciae* (60) y se observó que estas mutantes confieren un retraso de un día o dos en la nodulación sobre la planta hospedera.

Con base en estos reportes, decidimos estudiar del fenotipo de la mutante *nolR_{Re}* llevando a cabo cinéticas de nodulación; en estos ensayos encontramos un ligero retraso de un día en la aparición de los nódulos en

las plantas inoculadas con la mutante *nolR_{Re}*, comparado con las plantas inoculadas con la silvestre (figura 15-1), esto concuerda con lo observado en las mutantes de *R. leg. bv viciae* y *S. meliloti*, sin embargo en nuestro caso la diferencia en el número promedio de nódulos por planta no fue significativa para todos los tiempos analizados (figura 14), como lo reportan en *S. meliloti* (64) y en *R. leg. bv viciae* (60).

Los resultados observados a nivel macroscópico, de retraso en el desarrollo de los nódulos inducidos por la mutante *nolR_{Re}* con respecto a los inducidos por la silvestre, nos llevaron a analizar posibles diferencias a nivel microscópico en los nódulos inducidos por ambas. La manera de abordar esta parte del trabajo, fue mediante el estudio por microscopía de luz de cortes de nódulos. Lo que observamos es que hay diferencias significativas en los primeros tres tiempos analizados (4, 5 y 6 días); esto es, un retraso en el desarrollo de los nódulos inducidos por la mutante *nolR_{Re}*, que también ya habíamos observado en las cinéticas de nodulación (ver figuras 15-1 y 15-2). Otras diferencias son en cuanto a la organización celular (16-1 y 16-2): la mutante muestra desorganización celular, ya que hay división muy intensa sólo en algunas zonas del nódulo, lo que propicia la heterogeneidad de las células con respecto a la silvestre. Estos resultados indican que *nolR* tiene un papel importante no sólo en los estados tempranos de la infección, sino también durante el desarrollo de los nódulos.

En *S. meliloti* se describió que *NolR* tiene efecto sobre la transcripción de los genes de nodulación comunes, encargados de sintetizar el esqueleto de los factores Nod (22) por esto, decidimos analizar la secreción de los FNs de la mutante *nolR_{Re}* mediante ensayos de TLC.

Partiendo del mismo número de bacterias para inocular nuestros cultivos, encontramos que la cepa mutante produce un 30% menos de los FNs que la cepa silvestre (figura 17). Esto no concuerda con lo reportado por Cren y cols. (1995) en *S. meliloti*, y por Kiss y cols. (1998) en *R. leg. bv. viciae*, ya que lo que se observa en estos casos es que las mutantes en *nolR* secretan significativamente más FNs que la cepa silvestre. Sin embargo, es importante hacer notar que estos estudios se llevaron a cabo en cepas sobreproductoras de los FNs, ya que en las cepas silvestres no sobreproductoras no era posible detectar los FNs. No obstante, Cren y cols. (1995), muestran un análisis de TLC en la cepa mutante no sobreproductora de los FNs y se observa una disminución de los FNs con respecto a la silvestre. Esto último coincide con nuestros resultados. El uso de cepas sobreproductoras y no sobreproductoras de los FNs podría ser lo que establece las diferencias en estos resultados. Los niveles o concentraciones exactas de FNs, influyen directamente para una nodulación óptima, ya que secretando mayor cantidad de factor Nod se retrasa la nodulación (64, 60), pero también disminuyendo la secreción del factor Nod se observa el mismo fenotipo (este estudio). La diferencia entre los resultados reportados en *S. meliloti* y los obtenidos en este estudio en *R. etli*, con respecto a la cantidad de FNs, se pueden explicar en base a que la regulación en *R. etli* es diferente que en *S. meliloti*. En la parte última de discusión, se planteará un modelo para la regulación de los genes *nod* de *R. etli*, con base en los resultados obtenidos en este estudio y en otros previos obtenidos en el laboratorio.

En *S. meliloti* se sugiere que la ausencia de *nolR* está afectando cualitativamente las mezclas de los FNs en la cepa mutante y que induce la

síntesis preferencial de FNs con ácidos grasos insaturados de 16 C; esto lo proponen en función de los cambios que observan en la movilidad relativa (R_f) de los FNs analizados por TLC, aunque no los purifican, lo cual sería un enfoque más directo para abordar esta cuestión. Dado este antecedente, decidimos investigar en *R. etli* si podría haber cambios en el perfil de los FNs secretados por la mutante versus la silvestre; para ello purificamos los FNs por HPLC (figura 18), de las dos cepas y los comparamos. El resultado de este análisis nos muestra que no hay diferencias significativas en cuanto a los perfiles de elución de los FNs secretados por la cepa mutante versus los FNs secretados por la cepa silvestre; esta es otra diferencia importante que encontramos en nuestro sistema con respecto a lo reportado en *S. meliloti*. En este estudio, pudimos observar también que el porcentaje de FNs secretados por la mutante *nolR*- de *R. etli* disminuye con respecto a la silvestre como lo observamos en los ensayos de TLC.

Con respecto al análisis del transcrito de *nolR* de *R. etli* en presencia y ausencia de naringenina (inductor), encontramos que no hay diferencias en la transcripción en estas condiciones (figura 12), lo que nos indica que este gen no está siendo regulado por naringenina. Es importante mencionar que intentamos purificar la proteína NolR de extractos proteicos totales con el objetivo de caracterizarla. Sin embargo, no se pudo purificar y pensamos en la posibilidad de que no se estuviese expresando, por lo que los análisis tipo northern nos proporcionarían información sobre si había transcrito detectable o no. La información que obtuvimos de estos experimentos fue que el mensajero de *nolR* sí se transcribe, por lo que era muy probable que la proteína se estuviera traduciendo y que al tratarse de un regulador negativo se estuviese haciendo muy poca proteína que no

era posible purificar por métodos convencionales. Cabe mencionar que análisis tipo northern del gen *nolR* no se habían reportado anteriormente. El tamaño obtenido del fragmento que hibrida es de ~470 pb, que concuerda con el tamaño esperado para un mensajero monocistrónico.

Para analizar la ubicuidad del gen *nolR* en la especie de *R. etli*, nos abocamos a investigar si estaba presente en otros aislados de esta especie. Así, exploramos 11 aislados de *R. etli* provenientes de sitios geográficos diferentes y encontramos, por hibridación tipo Southern, secuencias homólogas a este gen, usando como sonda el gen *nolR* de la cepa CE3 (figura 11). Estos resultados indican que este gen se encuentra distribuido ampliamente en esta especie; sin embargo, se requieren estudios más detallados para saber si la proteína NolR es funcional en estos aislados. Estos resultados nos permiten sugerir que la presencia de este gen puede ser también otra de las características que sirven para identificar esta especie, como las reportadas por Segovia et al. (1993). Entre estas características se incluyen: reiteraciones de los genes estructurales de la nitrogenasa (94); la organización de los genes de nodulación comunes como dos unidades transcripcionales separadas, *nodA* y *nodBC* (124); la presencia del gen de inhibición de polisacáridos, *psi* (10); y la secuencia del gen 16s (111). Con este mismo enfoque, analizamos también la presencia de este gen en *Rhizobium tropici* cepa CIAT 899 y no encontramos secuencias homólogas a *nolR* en esta especie. Consideramos que ésta es también una diferencia significativa entre *R. tropici* y *R. etli*, las cuales son dos especies que nodulan frijol y podría ser otro criterio para identificarlas como especies.

Lo que sin duda es evidente es que, en *R. etli* y en *R. tropici* la regulación de los genes de nodulación es diferente. *R. etli* contiene tres copias del gen *nodD*, el gen *nolR*, y probablemente *syrM* (80); mientras que *R. tropici* posee cinco copias del gen *nodD*, de las cuales sólo *nodD1* es capaz de activar la transcripción de los genes de nodulación (123), y no se ha descrito a la fecha la presencia de reguladores como *nolR*, *syrM*, *nolA*, etc. en esta especie.

El interés por analizar si la proteína NolR es capaz de unirse a secuencias específicas de ADN, nos llevó a sobreexpresarla en *E. coli*, generando para ello una proteína de fusión con glutatión S-transferasa. Esto nos permitió purificar suficiente proteína, para llevar a cabo estudios que nos permitieran analizar su posible función.

En *S. meliloti* se ha estudiado la interacción de NolR con ADN específico, por ensayos de retardamiento de geles; nosotros estudiamos esta interacción mediante la técnica llamada Southwestern (ver material y métodos), la cual fue estandarizada para el estudio de NolR en nuestro laboratorio. Los resultados que obtuvimos utilizando esta nueva estrategia concuerdan con los reportados por Kondorosi y cols. (1989); encontramos que existe una interacción entre la proteína GST-NolR con un ADN que lleva la secuencia consenso de unión a esta proteína. Lo que observamos en *R. etli*, es que la proteína NolR se une a la región promotora del gen *nolE*, que lleva una secuencia consenso de unión de NolR y además lleva una caja de nodulación en un fragmento de 460 pb (figuras 22 y 23). Esta misma interacción la observamos utilizando un "oligo" sintetizado de 16 pb que es el sitio específico de unión propuesto para NolR y esta secuencia está localizada en el promotor de *nolE*. Estos resultados muestran que la

proteína NolR interacciona con este sitio específicamente y sugieren fuertemente que la proteína NolR de *R. etli* tiene un papel similar al reportado para NolR de *S. meliloti* cepa AK41.

En *S. meliloti* se sabe que NolR se une a los promotores de los genes *nodDs*, *nodABC* y *nodM*, los cuales están involucrados en la regulación muy fina de la expresión de los genes *nod* y en la síntesis del esqueleto de los FNs, respectivamente. En este trabajo, encontramos que en *R. etli*, NolR se une a una región consenso localizada en la región promotora del gen *nodD1*, el cual se encuentra corriente abajo del promotor de *nolE*, probablemente formando parte del mismo operón. Suponemos que la acción del represor NolR es sobre el gen *nodD1* (ver figura 20). Considero oportuno mencionar que la función de la proteína NolE en *R. etli* no se conoce a la fecha, pero se ha propuesto que podría ser secretada (23).

Con el propósito de integrar los resultados obtenidos en esta tesis en un modelo de regulación de los genes *nod* en *R. etli*, proponemos en la figura 24 un circuito regulador que nos permite explicar hipotéticamente datos previos y resultados de este trabajo.

En *R. etli*, como se ha mencionado, existen tres copias del gen *nodD*, de las cuales se sabe que: *nodD1* no se activa por flavonoides, *nodD2* se activa por flavonoides y *nodD3* se activa muy poco por flavonoides (26). En esta tesis, demostramos la presencia del gen *nolR* en *R. etli* y existen reportes que sugieren fuertemente que también se encuentra presente el gen *syrM* (80).

Ubicando en el escenario cada uno de los actores de este modelo, planteamos lo siguiente:

En *R. etli* podrían estar presentes dos vías reguladoras (1: flechas azules, 2: flechas rojas y verdes) que al actuar en conjunto modularan finamente los niveles de expresión de los genes de nodulación, de manera que se favoreciera la secreción de los FNs a niveles idóneos para asegurar una nodulación óptima, en la planta hospedera, en este caso frijol.

Es importante mencionar que se ha propuesto que la proteína NodD actúa como multímeros (48, 61, 75, 128). Basados en esta propuesta, es que planteamos este modelo regulador.

Analizando las vías por separado, la vía 1 (flechas azules), estaría dada por la respuesta de la proteína NodD2 al flavonoide, al igual que la proteína NodD3, que sabemos responde al flavonoide a nivel más bajo. Esto traería como consecuencia que estas dos proteínas NodDs se activaran y, en conjunto con NodD1 (ver vía 2), formarían los multímeros en la proporción adecuada (planteamos hipotéticamente que interactúan 2 moléculas de NodD2 con una molécula de NodD1 y una molécula de NodD3), y se unieran a las cajas *nod* localizadas en las regiones promotoras de los genes *nodA* y *nodBC*, lo que daría lugar a la transcripción de estos genes que finalmente sintetizarían los FNs.

La vía 2, estaría dada por la unión de *nolR* en la región promotora del gen *nodD1* (lo cual se demuestra en este trabajo), que estaría reprimiendo la síntesis de NodD1 (flecha roja), de manera que los niveles de esta proteína en este estado sean bajos pero óptimos para la interacción entre las proteínas NodDs (2 y 3). En ausencia de *NolR* (flechas verdes), los niveles de NodD1 se elevarían, de manera que en lugar de estarse formando multímeros de NodD1, NodD2 y NodD3 en la proporción adecuada, se estuvieran formando multímeros con una mayor proporción de NodD1 (flechas verdes B); esto induciría probablemente un cambio

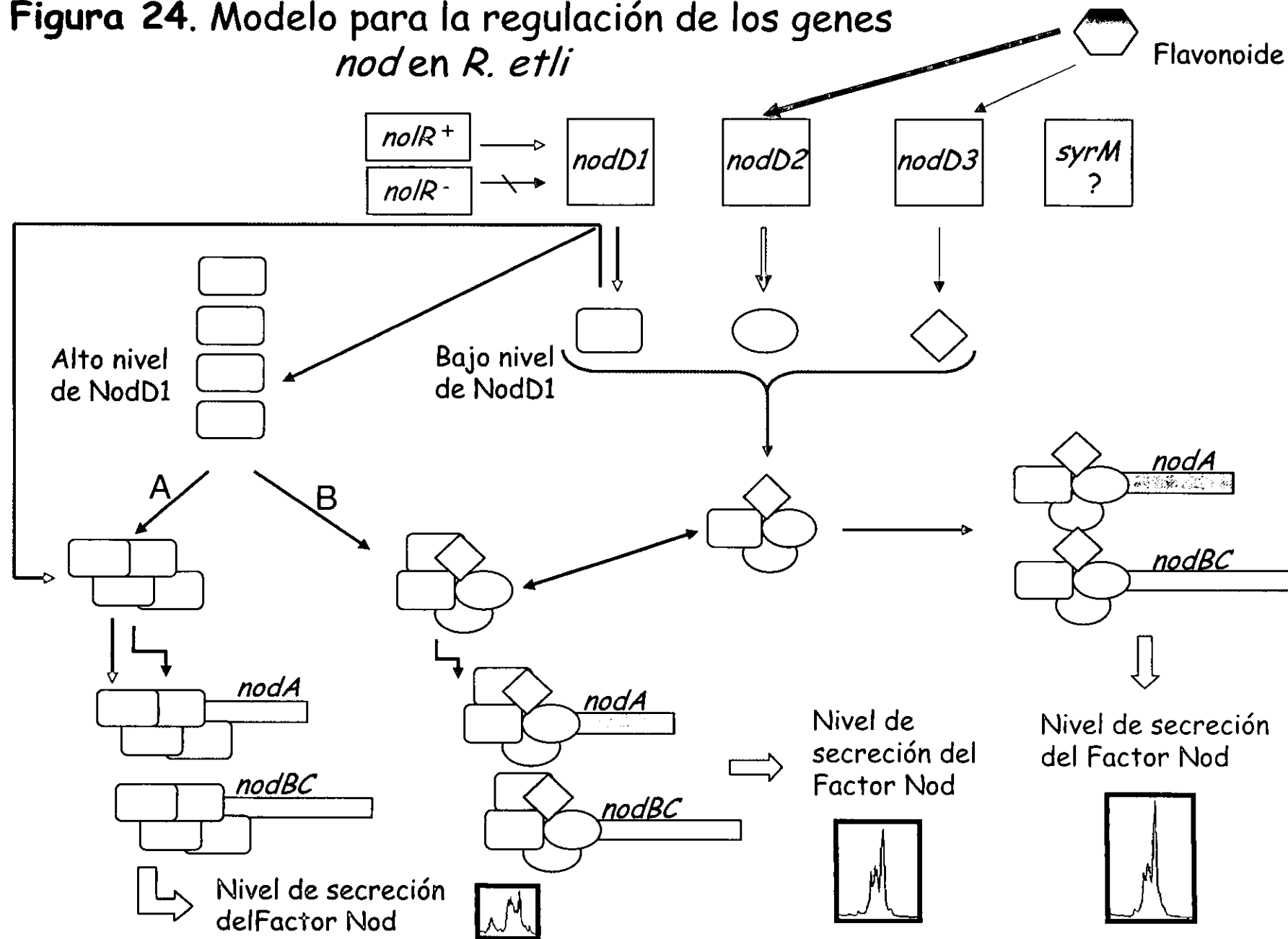
conformacional en el multímero, lo que bajaría su afinidad por las cajas *nod* y a su vez traería, como consecuencia, que los niveles de expresión de *nodA* y *nodBC* bajaran y, por ende, se disminuyera la cantidad de los FNs secretados, como lo observamos en los experimentos presentados en este estudio.

Otra posibilidad es que las altas concentraciones de NodD1 (flechas verdes A), dieran lugar a la formación de multímeros con sólo moléculas de NodD1 que también podrían estar compitiendo por las cajas *nod* con los multímeros formados con las tres proteínas NodDs. Esto finalmente traería como consecuencia, también una disminución en la secreción de los FNs (ver nivel de los FNs).

Es muy importante mencionar que existen datos en el laboratorio, desde hace algunos años, que indican que cultivos de *R. etli* en ausencia de inductor secretan un nivel basal de FNs (14), lo cual podría atribuirse a la funcionalidad de la vía 2 descrita en este modelo (flechas rojas).

En un estudio reciente de análisis de proteoma, llevado a cabo en *S. meliloti* y en la mutante en *nolR* de *S. meliloti*, Chen y cols. (2000) sugieren que NolR podría jugar un papel regulador general, ya que encuentran que por lo menos 52 proteínas varían en su patrón de expresión. Analizando la secuencia parcial de algunas de ellas, encontraron identidad con proteínas involucradas en el ciclo de ácidos tricarbóxicos (TCA), en la síntesis de proteínas, en la respuesta a estrés oxidativo, en el crecimiento celular y en funciones de mantenimiento. Estos datos sugieren que NolR podría responder a factores ambientales para modular el metabolismo intracelular, sin embargo, es necesario realizar estudios detallados para poder atribuir a NolR estas funciones.

Figura 24. Modelo para la regulación de los genes *nod* en *R. etli*



VIII.- CONCLUSIONES

1. El gen *nolR* esta presente en el fondo genético de *Rhizobium etli* cepa CE3.
2. El gen *nolR* está ampliamente distribuído en la especie *R. etli* y no se encuentra presente en *R. tropici*.
3. El ARN mensajero de *nolR* en *R. etli* es monocistrónico y su transcripción no es afectada por el inductor naringenina.
4. Una mutante *nolR*⁻ presenta un fenotipo de ligero retraso en la aparición de los nódulos y a nivel microscópico una desorganización celular en los tiempos iniciales de la nodulación.
5. Una mutante *nolR*⁻ secreta ~30% menos de Factor de Nodulación.
6. La proteína NolR se une específicamente a una secuencia consenso en la región promotora de los genes *nolE-nodD1*.

IX.- BIBLIOGRAFÍA

1. **Atkinson, E.M., Palcic, M.M., Hindsgaul, O. and S.R. Long.** 1994. Biosynthesis of *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide Nod factors: NodA is required for an N-acyltransferase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 8418-8422.
2. **Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and K. Struhl.** (Ed) 1989. *Current Protocols in Molecular Biology.* New York: John Wiley and Sons.
3. **Baev, N. and A. Kondorosi.** 1992. Nucleotide sequence of the *Rhizobium meliloti nodL* gene located in locus n5 of the *nod* regulon. *Plant Mol. Biol.* 18: 843-846.
4. **Baev, N., Endre, G., Petrovics, G., Bánfalvi, Z. and A. Kondorosi.** 1991. Six nodulation genes of *nod* box locus 4 in *Rhizobium meliloti* are involved in nodulation signal production: *nodM* codes for D-glucosamine synthetase. *Mol. Gen. gen.* 228: 113-124.
5. **Balatti, P. A., Kovács, L.G., Krishnan, H.B. and S.G. Pueppke.** 1995. *Rhizobium* sp. NGR234 contains a functional copy of the soybean cultivar specificity locus, *nodXWBTUV*. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 8: 693-699.
6. **Barnett, M.J. and S. R. Long.** 1990. DNA sequence and translational product of a new nodulation-regulatory locus: *SyrM* has sequence similarity to NodD proteins. *J. Bacteriol.* 172: 3695-3700.
7. **Barnett, M.J. and S. R. Long.** 1997. Identification and characterization of a gene on *Rhizobium meliloti* pSyma, *syrB*, that negatively affects *syrM* expression. *Mol. Plant_Microbe Interac.* 10: 550-559.
8. **Bloemberg, G. V., Kamst, E., Harteveld, M., Van der Drift, K.M.G.M., Haverkamp, J., Thomas-Oates, E., Lugtenberg, B.J.J. and H.P. Spaink.** 1995b. A central domain of *Rhizobium* NodE protein mediates host specificity by determining the hydrophobicity of fatty acyl moieties of nodulation factors. *Mol. Microbiol.* 16: 1123-1136.
9. **Bloemberg, G.V., Lagas, R.M., Van Leewen, S., Van der Marel, A., Van boom, J.H., Lugtenberg, J.J. and H.P. Spaink.** 1995a. Substrate specificity and kinetic studies on nodulation protein NodL of *Rhizobium leguminosarum*. *Biochemistry.* 34: 12712-12720.
10. **Borthakur, D., Downie, J.A., Johnston, A.W.B. and J.W. Lamb.** 1985. *psi*, a plasmid-linked *Rhizobium phaseoli* gene that inhibits exopolysaccharide production and which is required for symbiotic nitrogen fixation. *Mol. Gen. Genet.* 200: 278-282.
11. **Boundy-Mills, K.L., Kossak, R.M., Tully, R.E. Pueppke, S.G., Lohrke, S. and M.J. Sadowsky.** 1994. Induction of the *Rhizobium fredii nod* box-independent nodulation gene *nodJ* requires a functional *nodD1* gene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7: 305-308.
12. **Broughton, W. J. and X. Perret.** 1999. Genealogy of legume-*Rhizobium* symbioses. *Curr. Op. in Plant Biol.* 2: 305-311.
13. **Burn, J., Rossen, L., and A.W.B. Johnston.** 1987. Four classes of mutations in the *nodD* gene of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* that affects its ability to autoregulated and/or activated other *nod* genes in the presence of flavonoid inducers. *Genes Dev.* 1: 456-464.

14. **Cárdenas, L., Domínguez, J., Pérez, H., Sánchez, F., Hepler, P.K. and C. Quinto.** 1996. The role of *nodI* and *nodJ* genes in the transport of Nod metabolitos in *Rhizobium etli*. *Gene*. 173: 183-187.
15. **Cárdenas, L., Domínguez, J., Quinto, C., López-Lara, I., Lugtenberg, B.J.J., Spaink, H.P., Rademaker, G.J., Haverkamp, J. and J.E. Thomas-Oates.** 1995. Isolation, chemical structure and biological activity of the lipo-oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium etli*. *Plan. Mol. Biol.* 29: 453-464.
16. **Cárdenas, L., Holdaway-Clarke, T. L., Sánchez, F., Quinto, C., Feijó, J.A., Kunkel, J.G. and P. Hepler.** 2000. Ion Changes in legume root hairs responding to Nod factors. *Plant Physiol.* 123: 443-451.
17. **Cárdenas, L., Vidali, L., Domínguez, J., Pérez, H., Sánchez, F., Hepler, P.K. and C. Quinto.** 1998. Rearrangement of actin microfilaments in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Plant Physiol.* 116: 871-877.
18. **Carlson, R.W., Price, N.P.J., and G. Stacey.** 1994. The biosynthesis of rhizobial lipo-oligosaccharide nodulation signal molecules. *Mol. Plant-microbe interact.* 7: 684-695.
19. **Chen, H., Higgins, J., Kondorosi, E., Kondorosi, A., Djordjevic, M.A., Weinman, J.J. and B.J. Rolfe.** 2000. Identification of *nolR*-regulated proteins in *Sinorhizobium meliloti* using proteome analysis. *Electrophoresis.* 21: 3823-3832.
20. **Corvera, A., Promé, D., Promé, J.C., Martínez-Romero. E. and D. Romero.** 1999. The *nolL* gene from *Rhizobium etli* determines nodulation efficiency by mediating the acetylation of the fucosyl residue in the nodulation factor. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 12: 236-246.
21. **Cren, M., Kondorosi, A. and E. Kondorosi.** 1994. An insertional point mutation inactivates *NolR* repressor in *Rhizobium meliloti* 1021. *J. Bacteriol.* 176 (2): 518-519.
22. **Cren, M., Kondorosi, A. and E. Kondorosi.** 1995. *NolR* controls expression of the *Rhizobium meliloti* nodulation genes involved in the core Nod factor synthesis. *Mol Microbiol.* 15: 733-747.
23. **Davis, E.O. and A. W. B. Johnston.** 1990. Analysis of the three *nodD* genes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*; *nodD1* is preceded by *nolE*, a gene whose product is secreted from the cytoplasm. *Mol. Microbiol.* 4: 921-932.
24. **Debellé, F., Plazanet, C., Roche, P., Pujol, C., Savagnac, A., Rosenberg, C., Promé, J.C. and J. Dénarié.** 1996. The *NodA* proteins of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium tropici* specify the N-acylation of Nod factors by different fatty acids. *Mol. Microbiol.* 22: 303-314.
25. **Demont, N. Debellé, F., Aurelle, H., Denarié, J. and J.C. Promé.** 1993. Role of the *Rhizobium meliloti nodF* and *nodE* genes in the biosynthesis of lipo-oligosaccharidic nodulation factors. *J. Biol. Chem.* 268: 20134-20142.
26. **Díaz, R.** 1996. Caracterización funcional de los genes reguladores *nodD* en *Rhizobium etli*, como aportación para futuras investigaciones. Tesis de licenciatura. Universidad Veracruzana.
27. **Dobert, R.C., Breil, B.T. and E.W. Triplett.** 1994. DNA sequence of the common nodulation genes of *Bradyrhizobium elkanii* and their phylogenetic relationship to those of other nodulating bacteria. *Mol. Plan-Microbe Interac.* 7: 564-572.

28. **Dockendorff, T. C.,** Sanjuan, J., Grob, P. and G. Stacey. 1994. NolA represses nod gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Plant-Microbe interact.* 7: 596-602.
29. **Downie, J.A.,** Davies, A.E., Sutton, J.M., Dean, G., Ghelani, S., Lea, E.J.A., Wilson, K.E. and J.L. Firmin. 1994. The roles of *nodX* and *nodO* in host specific nodulation of peas and vetch by *Rhizobium leguminosarum*. En: Kiss, G.B. and G. Endre (eds). 1994. Proceedings of the 1st European Nitrogen Fixation Conference and the Workshop on "Safe Application of genetically modified microorganisms in the Environment". Officina Press, Szeged. Pp 54-58.
30. **Dusha, I.,** Bakos, A., Kondorosi, A., De Bruijn, F. and J. Schell. 1989. The *Rhizobium meliloti* early nodulation genes (*nodABC*) are nitrogen-regulated: isolation of a mutant strain with efficient nodulation capacity on alfalfa in the presence of ammonium. *Mol. Gen. Genet.* 219: 89-96.
31. **Ehrhardt, D.W.,** Wais, R. and S. R. Long. 1996. Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Cell.* 85: 673-681.
32. **Ehrhardt, D.W.,** Atkinson, E.M., Faull, K.F., Freedberg, D.I., Sutherlin, D.P. Armstrong, R. and S.R. Long. 1995. In vitro sulfotransferase activity of NodH, a nodulation protein of *Rhizobium meliloti* required for host-specific nodulation. *J. Bacteriol.* 177: 6237-6245.
33. **Fellay, R.,** Hanin, M., Montorzi, G., Frey, J., Freiberg, C., Golinowski, W., Staehelin, C., Broughton, W.J., and S. Jabbouri. 1998. *nodD2* of *Rhizobium* sp. NRG234 is involved in the repression of the *nodABC* operón. *Mol. Microbiol.* 27: 1039-1050.
34. **Felle, H.H.,** Kondorosi, E., Kondorosi, A. and M. Schultze. 1998. The role of ion fluxes in Nod factor signaling in *Medicago sativa*. *Plan. J.* 13: 455-463.
35. **Felle, H.H.,** Kondorosi, E., Kondorosi, A. and M. Schultze. 1999. Nod factors modulate the concentration of cytosolic free calcium differently in growing and non-growing root hairs of *Medicago sativa* L. *Planta.* 209: 207-212.
36. **Fernández-López, M.,** D'Haese, W. Mergaert, P., Verplancke, C., J.C. Promé, Van Montagu, M. and M. Holsters. 1996. Role of *nodI* and *nodJ* in lipochitooligosaccharide secretion in *Azorhizobium caulinodans* and *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 20: 993-1000.
37. **Figurski, D.H.** and D.R. Helinski. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 1648-1652.
38. **Firmin, J.L.,** Wilson, K.E., Carlson, R.W. Davies, A.E. and J.A. Downie. 1993. Resistance to nodulation of cv. Afghanistan peas is overcome by *nodX*, which mediates an O-acetylation of the *Rhizobium leguminosarum* lipo-oligosaccharide nodulation factor. *Mol. Microbiol.* 10: 351-360.
39. **Fisher, R.F.** and S.R. Long. 1992. *Rhizobium*-plant signal exchange. *Nature.* 357: 655-659.
40. **Fisher, R.F.** and S.R. Long. 1993. Interactions of NodD at the *nod* box: NodD binds to two distinct sites on the same face of the helix and induces a bend in the DNA. *J. Mol. Biol.* 233: 336-348.
41. **Fisher, R.F.,** Egelhoff, T.T., Mulligan, J.T. and S.R. Long. 1988. Specific binding of proteins from *Rhizobium meliloti* cell-free extracts containing NodD to DNA sequences upstream of inducible nodulation genes. *Genes Dev.* 2: 282-293.

42. Flores, M., González, B., Brom, S., Martínez, E., Piñero, D., Romero, D., Dávila, G. and R. Palacios. 1987. Reiterated DNA sequences in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. *J. Bacterial.* 169: 5393-5400.
43. Freiberg, C., Fellay, R., Bairoch, A., Broughton, W.J., Rosenthal, A. and X. Perret. 1997. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature.* 387: 394-401.
44. García, M., Dunlap, J., Loh, J. and G. Stacey. 1996. Phenotypic characterization and regulation of the *nolA* gene of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 9: 625-635.
45. Geelen, D., Leyman, B., Mergaert, P., Klarskov, K., Van Montagu, M. Geremia, R.A. and M. Holsters. 1995. NodS is an S-adenosyl-L-methionine- dependent methyltransferase that methylates chito-oligosaccharide deacetylated at the non-reducing end. *Mol. Microbiol.* 17: 387-397.
46. Geiger, O., Spaink, H.P. and E.P. Kennedy. 1991. Isolation of the *Rhizobium leguminosarum* NodF nodulation protein: NodF carries a 4'-phosphopantetheine prosthetic group. *J. Bacteriol.* 173: 2872-2878.
47. Geremia, R.A., Mergaert, P., Geelen, D., Van Montagu, M. and M. Holsters. 1994. The NodC protein of *Azorhizobium caulinodans* is an N-acetylglucosaminyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 2669-2673.
48. Goethals, K., Mergaert, P., Gao, M., Geelen, D., Van Montagu, M. and M. Holsters. 1992. Identification of new inducible nodulation genes in *Azorhizobium caulinodans*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5: 405-411.
49. Göttfert, M., Grob, P. and H. Hennecke. 1990. Proposed regulatory pathway encoded by the *nodV* and *nodW* genes, determinants of host specificity in *Bradyrhizobium japonicum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 2680-2684.
50. Hanin, M., Jabbouri, S., Broughton, W.J. and R. Fellay. 1998. SyrM1 of *Rhizobium* sp. NGR234 activates transcription of symbiotic loci and controls the level of sulfated Nod factors. *Mol. Plan-Microbe Interac.* 11: 343-350.
51. Hong, G. F., Burn, J. E. and A.W.B. Johnston. 1987. Evidence that DNA involved in the expression of nodulation (*nod*) genes in *Rhizobium* binds to the product of the regulatory gene *nodD*. *Nucleic Acids Res.* 15: 9677-9690.
52. Horvath, B., Bachem, C.W.B., Schell, J. and A. Kondorosi. 1987. Host-specific regulation on nodulation genes in *Rhizobium* its mediated by a plant-signal, interacting with the *nodD* gene product. *EMBO J.* 6: 841-848.
53. Hynes, M.F., Brucksch, K. and U. Priefer. 1988. Melanin production encoded by a cryptic plasmid in a *Rhizobium leguminosarum* strain. *Arch. Microbiol.* 150: 326-332.
54. Jabbouri, S., Fellay, R., Talmont, F., Kamalaprija, P. Burger, U. Relic', B. J.C. Promé and W.J. Broughton. 1995. Involvement of *nodS* in N-methylation and *nodU* in 6-O-Carbamoylation of *Rhizobium* sp. NGR234 nod factors. *J. Biol. Chem.* 270: 22968-22973.
55. John, M., Röhring, H., Schmidt, J., Wieneke, W. and J. Schell. 1993. *Rhizobium* NodB protein involent in nodulation signal synthesis is a chito oligosaccharide deacetylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 625-629.
56. Josephson, K. L. and I.L. Pepper. 1984. Competitiveness and effectiveness of strains of *Rhizobium phaseoli* isolates from the Sonoran Desert. *Soil Biol. Chem.* 16: 651-655.

57. **Kamst, E., Breek, C.K.D. and H.P. Spaink.** 2000. Functional analysis of chimeras derived from the *Sinorhizobium meliloti* and *Mesorhizobium loti nodC* genes identifies regions controlling chitin oligosaccharide chain length. *Mol. Gen. Genet.* 264: 75-81.
58. **Kamst, E., Pilling, J., Raamsdonk, L.M., Lugtenberg, B.J. and H.P. Spaink.** 1997. *Rhizobium* nodulation protein NodC is an important determinant of chitin oligosaccharide chain length in Nod factor biosynthesis. *J. Bacteriol.* 179: 2103-2108.
59. **Kamst, E., van Der Drift, M.G.M., Thomas-Oates, J.E., Lugtenberg, B. J.J. and H.P. Spaink.** 1995. Mass spectrometric analysis of chitin oligosaccharides produced by *Rhizobium* NodC protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179: 2103-2108.
60. **Kiss, E., Mergaert, P., Oláh, B., Kereszt, A., Staehelin, C., Davies, A.E., Downie, J.A., Kondorosi, A. and E. Kondorosi.** 1998. Conservation of *nolR* in the *Sinorhizobium* and *Rhizobium* genera of the *Rhizobiaceae* family. 11(12): 1186-1195.
61. **Kofoed, E. C. and J.S. Parkinson.** 1988. Transmitter and receiver modules in bacterial signaling proteins. *Poc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 4981-4985.
62. **Kondorosi, E., Banfalvi, Z and A. Kondorosi.** 1984. Physical and genetical análisis of symbiotic region of *R. meliloti*: identification of nodulation genes. *Mol. Gen. Genet.* 193: 445-452.
63. **Kondorosi, E., Buiré, M., Cren, M., Iyer, N., Hoffman, B. and A. Kondorosi.** 1991. Involvement of the *syrM* and *nodD3* genes of *Rhizobium meliloti* in nod gene activation and in optimal nodulation of the host plant. *Mol. Microbiol.* 5: 3035-3048.
64. **Kondorosi, E., Gyuris, J., Schmidt, J., John, M., Duda, E., Hoffman, B., Schell, J. and A. Kondorosi.** 1989. Positive and negative control of nod gene expression in *Rhizobium meliloti* is required for optimal nodulation. *EMBO J.* 8: 1331-1340.
65. **Kondorosi, E., Pierre, M., Cren, M., Haumann, U., Buiré, M. Hoffmann, B., Schell, S. and A. Kondorosi.** 1991. Identification of *NolR*, a negative transacting factor controlling the *nod* regulon in *Rhizobium meliloti*. *J. Mol. Biol.* 222: 885-896.
66. **Krishnan, H. B. and S.G. Pueppke.** 1991. *nolC*, a *Rhizobium fredii* gene involved in cultivar specific nodulation of soybean, shares homology with a heat-shock gene. *Mol. Microbiol.* 5: 737-745.
67. **Krishnan, H.B. and S.G. Pueppke.** 1992. Inactivation of *nolC* conditions developmental abnormalities in nodulation of Peking soybean by *Rhizobium fredii* USDA257. *Mol.Plant-Microbe Interc.* 5: 14-21.
68. **Laeremans, T., Caluwaerts, I. Verreth, C., Rogel, M.A., Vanderleyden, J. and E. Martínez-Romero.** 1996. Isolation and characterization of *Rhizobium tropici* Nod factor sulfation genes. *Mol. Plan-Microbe Interact.* 9: 492-500.
69. **Loh, J., Garcia, M. and G. Stacey.** 1997. NodV and NodW, a second flavonoid recognition system regulating nod gene espression in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. bacteriol.* 179: 3013-3020.
70. **Loh, J., Stacey, M.G., Sadowsky, M.J. and G. Stacey.** 1999. The *Bradyrhizobium japonicum nolA* gene encodes three fuctionally distinct proteins. *J. Bac.* 181(5): 1544-1554.
71. **Long, S. R.** 1996. *Rhizobium* symbiosis : Nod factors in perspective. *Plant Cell.* 8 : 1885-1898.

72. **López-Lara, M.I., Blok-Tip, L. Quinto, C. García, M.L., Stacey, G. Bloemberg, G.V., Lamers, G.E.M., Lugtenberg, B.J.J., Thoma-Oates, J.E. and H.P. Spaink.** 1996. NodZ of *Bradyrhizobium* extends the nodulation host range of *Rhizobium* by adding a fucosyl residue to nodulation signals. *Mol. Microbiol.* 21: 397-408.
73. **Luka, S., Sanjuan, J., Carlson, R.W. and G. Stacey.** 1993. *nolMNO* genes of *Bradyrhizobium japonicum* are co-transcribed with *nodYABCSUIJ* and *nolO* is involved in the synthesis of the lipo-oligosaccharide nodulation signals. *J. Biol. Chem.* 268: 27053-27059.
74. **Martínez-Romero, E., Segovia, L., Martins Mercante, F., Franco, A.A., Graham, P. and M.A. Pardo.** 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41:417-426.
75. **McIver, J., Djordjevic, M.A., Weinman, J.J., Bender, G.L. and B.J. Rolfe.** 1989. Extension of host range of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* due to point mutants in *nodD* that result in alterations in regulatory function and recognition of inducer molecules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2: 97-106.
76. **Megias, M., Sousa, C., Romero, M.J., Boloix, P. and J.L. Folch.** 1993. *Rhizobium meliloti nodEFG* and *nodH* genes confer host range extension to alfalfa when introduced to *R. leguminosarum* bv. *trifolii* RS1051. En: Palacios, R., Mora, J. and Newton, W.E. 1993. *New Horizons in Nitrogen Fixation.* Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. P 243.
77. **Meinhardt, L.W., Krishnan, H.B., Balatii, P.A. and S.G. Pueppke.** 1993. Molecular cloning and characterization of a Sym plasmid locus that regulates cultivar-specific nodulation of soybean by *Rhizobium fredii* USDA2557. *Mol. Microbiol.* 9: 17-29.
78. **Mergaert, P., D'Haese, W., Geelen, D., Promé, D., Van Montagu, M., Geremia, R., Promé, J.C. and M. Holsters.** 1995. Biosynthesis of *Azorhizobium caulinodans* Nod factors. Study of the activity of the NodABCS proteins by expression of the genes in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 270: 29217-29223.
79. **Mergaert, P., D'Haese, W., Fernández-López, M., Geelen, D. Goethals, K. Promé, J.C., Van Montagu, M. and M. holsters.** 1996. Fucosylation and arabinosylation of Nod factors in *Azorhizobium caulinodans*: involvement of *nolK*, *nodZ* as well as *noeC* and/or downstream genes. *Mol. Microbiol.* 21: 409-419.
80. **Michiels, J., De Wilde, P. and J. Vanderleyden.** 1993. Cloning and sequence of the *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli syrM* gene. *Nucleic Acids Res.* 21: 3893.
81. **Millar, B.E. and N.M. Kedrich.** 1987. Purification of the CysB protein from *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 262: 6006-6009.
82. **Mulligan, J.T. and S.R. Long.** 1989. A family of activator genes regulates expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Genetics.* 12:7-18.
83. **Mulligan, J.T. and S.R. Long.** 1985 Induction of *Rhizobium meliloti nodC* expression by plant exudate requires *nodD*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82(19): 6609-13.
84. **Nakano, T., Sato, F. and Y. Yamada.** 1993. Analysis of nucleoid-proteins in tobacco chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 34(6): 873-880.
85. **Niebel, A., Gressent, F., Bono, J.J., Ranjeva, R. and J. Cullimore.** 1999. Recent advances in the study of Nod factor perception and signal transduction. *Biochimie.* 81: 669-674.

86. **Noel, K. D.,** Sánchez, A., Fernández, L., Leemans, J. and M.A. Cevallos. 1984. *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. *J. Bacteriol.* 158: 148-155.
87. **Palacios, R.,** Quinto, C., de la Vega, H., Flores, M., Fernández, L., Hernández, M., Ballado, T. and G. Soberón. 1983. General organization of nitrogen fixation genes in *Rhizobium phaseoli*. In A. Púlher (ed), *Molecular genetics of bacteria –plant interactions*. Springer Verlag K.G., Berlín. 164-168.
88. **Perret, X.,** Staehelin, C. and W.J. Broughton. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. and Mol. Biol. Rev.* 64(1): 180-201.
89. **Piñero, D.,** Martínez, E. and R.K. Selander. 1988. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2825-2832.
90. **Prentki, P.** and H.M. Krisch. 1984. In vivo insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene.* 29: 303-313.
91. **Pueppke, S.G.** 1996. The genetic and biochemical basis of nodulation of legumes by Rhizobia. *Crit. Rev. biotech.* 16: 1-51.
92. **Pueppke, S.G.** and W.J. Broughton. 1999. *Rhizobium* sp. NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host-ranges. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12: 293-318.
93. **Quandt, J.** and M.F. Hynes. 1993. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene.* 127: 15-21.
94. **Quinto, C.,** de la Vega, H., Flores, M., Fernández, L. Ballado, T., Soberón, G. and R. Palacios. 1982. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli*. *Nature (London)* 299: 724-726.
95. **Quinto, C.,** Wijfjes, A.H.M., Bloemberg, G.V., Blok-Tip, L., López-Lara, I.M., Lugtenberg, B.J.J., Thomas-Oates, J.E. and H.P. Spaink. 1997. Bacterial nodulation protein NodZ is a chitin oligosaccharide fucosyltransferase which can also recognize related substrates of animal origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 4336-4341.
96. **Ritsema, D.,** Wijfjes, A.H. Lugtenberg, B.J. and H.P. Spaink. 1996. *Rhizobium* nodulation protein NodA is a host-specific determinant of the transfer of fatty acids in Nod factor biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* 251: 44-51.
97. **Ritsema, T.,** Geiger, O., van Dillewijn, P., Lugtenberg, B.J. and H.P. Spaink. 1994. Serine residue 45 of nodulation protein NodF from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* is essential for its biological function. *J. Bacteriol.* 176: 7740-7743.
98. **Rivilla, R.,** Sutton, J.M. and J.A. Downie. 1995. *Rhizobium leguminosarum* NodT is related to a family of outer-membrane transport proteins that includes TolC, PrtF, CyaE and AprF. *Gene.* 161: 27-31.
99. **Roche, P.,** Debellé, F., Maillet, F., Lerouge, P., Faucher, C., Truchet, G. Denarié, J. and J.C. Promé. 1991. Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti*: nodH and nodPQ genes encode the sulfation of lipooligosaccharide signals. *Cell.* 67: 1131-1143.
100. **Rostas, K.,** Kondorosi, E., Horvath, D., Simoncsits, A. and A. Kondorosi. 1986. Conservation of extended promoter regions of nodulation genes in *Rhizobium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 1757-1761.
101. **Sadowsky, M.J.,** Cregan, P.B., Göttfert, M., Sharma, A., Gerhold, D., Rodríguez-Quinones, F., Keyser, H.H., Hennecke, H. and G. Stacey. 1991. The *Bradyrhizobium*

- japonicum nolA* gene and its involvement in the genotype-specific nodulation of soybeans. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88:637-641.
102. **Saier, M.H.Jr.,** tam, R., Reizer, A. and J. Reizer. 1994. Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. Mol. Microbiol. 11: 841-847.
 103. **Sambrook, J.,** Fritsch, E.F. and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning, a laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
 104. **Sanjuan, J.,** Grob, p., Göttfert, Hennecke, H. and G. Stacey. 1994. NodW is essential for full expression of the common nodulation genes in *Bradyrhizobium japonicum*. Mol. Plant-Microbe Interac. 7: 364-369.
 105. **Schell, M.A.,** Brown, P.H. and S. Raju. 1990. Use of saturation mutagenesis to localize probable functional domains in the NahR protein, a LysR-type transcription activator. J. Biol. Chem. 265: 3844-3850.
 106. **Schlaman, H.R.,** Okker, R.J.H. and J.J. Lugtenberg. 1992. Regulation of nodulation gene expression by NodD in Rhizobia. J. Bacteriol. 174: 5177-5182.
 107. **Schultze, M.** and A. Kondorosi. 1998. Regulation of symbiotic root nodule development. Annu. Rev. Genet. 32: 33-57.
 108. **Schwedock, J.** and S. R. Long. 1990. ATP sulphurylase activity of the *nodP* and *nodQ* gene products of *Rhizobium meliloti*. Nature. 348: 644-647.
 109. **Scott, D.B.,** Young, C.A., Collins-Emerson, J.M., Terzaghi, E.A., Rockman, E.S., Lewis, P.A. and C.E. Pankhurst. 1996. Novel and complex chromosomal arrangement of *Rhizobium loti* nodulation genes. Mol. Plant-Microbe Interac. 9: 187-197.
 110. **Scott, K.F.** 1986. Conserved nodulation genes from the non-legume symbiont *Bradyrhizobium* sp. (Parasponia). Nucleic Acids Res. 14: 2905-2919.
 111. **Segovia, L.,** Young, J.P.W. and E. Martínez-Romero. 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 43(2): 374-377.
 112. **Shell, M.A.** 1993. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. Annu. Rev. Microbiol. 47: 597-626.
 113. **Spaink, H.P.** 1992. Rhizobial lipo-oligosaccharides: answers and questions. Plant Mol. Biol. 20: 977-986.
 114. **Spaink, H.P.,** Okker, R.J.H., Wijffelman, C.A., Pees, E. and B.J.J. Lugtenberg. 1987. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. Plant Mol. Biol. 9: 27-39.
 115. **Spaink, H.P.,** Weinman, J., Djordevic, M.A. Wijffelman, C.A., Okker R.J. and B.J. Lugtenberg. 1989. Genetic analysis and cellular localization of the *Rhizobium* host specificity determining NodE protein. EMBO J. 8: 2811-2818.
 116. **Spaink, H.P.,** Wijffes, A.H.M., and B.J.J. Lugtenberg. 1995. Rhizobium NodI and NodJ proteins play a role in the efficiency of secretion of lipochitin oligosaccharides. J. Bacteriol. 177: 6276-6281.
 117. **Stacey, G.** 1998. Plant-microbe signaling in the *Bradyrhizobium*-soybean symbiosis. En: Proceedings of the 16th North American Congress on Symbiotic Nitrogen Fixation. Cancún, México. 1-6 de febrero. 1998. III.02.
 118. **Stacey, G.,** Luka, S., Sanjuan, J., Banfalvi, Z., Nieuwkoop, A.J., Chun, J.Y., Forsberg, L.S. and R. Carlson. 1994. *nodZ*, a unique host-specific nodulation gene,

- is involved in the fucosylation of the lipooligosaccharide nodulation signal of *Bradyrhizobium japonicum*. J. Bacteriol. 176: 620-633.
119. **Stougaard, J.** 2000. Regulators and regulation of legume root nodule development. Plant Physiol. 124: 531-540.
 120. **Swanson, J.A., Mulligan, J.T. and S. R. Long.** 1993. Regulation of *syrM* and *nodD3* in *Rhizobium meliloti*. Genetics. 134: 435-444.
 121. **Van Rhijn, P. and J. Vanderleyden.** 1995. The *Rhizobium*-plant symbiosis. Microbiol. Reviews. 124-142.
 122. **Van Rhijn, P., Desair, J. Vlassak, K., and J. Vanderleyden.** 1994. The NodD proteins of *Rhizobium* sp. strain BR816 differ in their interaction with coinducers and in their activities for nodulation of different host plants. Appl. Environ. Microbiol. 60: 3615-3623.
 123. **Van Rhijn, P.J.S., Feys, B., Verreth, C. and J. Vanderleyden.** 1993. Multiple copies of *nodD* in *Rhizobium tropici* CIAT 899 and BR816. J. Bacteriol. 175: 438-447.
 124. **Vázquez, M., Dávalos, A., de las Peñas, A., Sánchez, F., and C. Quinto.** 1991. Novel organization of the common nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* strains. J. Bact. 173 (3): 1250-1258.
 125. **Vázquez, M., Santana, O. and C. Quinto.** 1993. The NodI and NodJ proteins from *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* strains are similar to capsular polysaccharides secretion proteins from gram-negative bacteria. Mol. Microbiol. 8 (1): 1111-1119.
 126. **Vinuesa, P., Maly, A.K. and D. Werner.** 1998. Identification of *noeJ* and *noI*K genes in *Rhizobium etli* Kim5s: analysis of their regulation and role in LCO-synthesis. Proceedings of the 16th North American Congress on Symbiotic Nitrogen Fixation. Cancún, México. 1-6 de febrero. 1998. III.17.
 127. **Wang, S.P. and G. Stacey.** 1990. Ammonia regulation of *nod* genes in *Bradyrhizobium japonicum*. Mol. Gen. Genet. 223: 329-331.
 128. **Wang, S.P. and G. Stacey.** 1991. Studies of the *Bradyrhizobium japonicum nodD1* promoter: a repeated structure of the *nod* box. J. Bacteriol. 173: 3356-3365.