

03081 4
24



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE POSGRADO DEL COLEGIO
DE CIENCIAS Y HUMANIDADES.

CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION DE NITROGENO.

"MODULACION DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL EN EL
PLASMIDO SIMBIOTICO DE *Rhizobium etli*."

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA.

PRESENTA

MARIA DE LOURDES GIRARD CUESY.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

CUERNAVACA, MOR.
**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1996.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS: "Modulación de la Actividad Transcripcional en el Plásmido Simbiótico de *Rhizobium etli*".

PRESENTADA POR: MARIA DE LOURDES GIRARD CUESY.

RESUMEN

El trabajo presentado describe un método experimental que permite la identificación y localización de regiones específicas en un genoma cuya expresión depende de estímulos ambientales específicos.

La actividad transcripcional global en el plásmido simbiótico (pSim) de *Rhizobium etli* fué estudiada en diferentes condiciones ambientales, incluyendo algunas que son relevantes para el proceso simbiótico. cDNAs de cadena sencilla, marcados radiactivamente con ^{32}P , fueron sintetizados a partir de RNAs totales. Estos ^{32}P -sscDNA fueron utilizados como detectores de hibridización contra una colección ordenada de cósmidos recombinantes que cubren todo el pSim.

Nuestros resultados muestran que bajo condiciones aeróbicas, la actividad transcripcional del plásmido es modulada por las fuentes de carbono y nitrógeno. La inducción de la transcripción de las secuencias del plásmido en respuesta a inductores específicos de la expresión de los genes *nod* sigue un orden temporal. El principal efector de la actividad transcripcional del pSim es el oxígeno. En condiciones de microaerobiosis, la mayor parte de las secuencias del plásmido es expresada, mientras que en condiciones aeróbicas, la expresión del plásmido es prácticamente nula. Esta respuesta a las condiciones de limitación de oxígeno es parcialmente dependiente de NifA, ya que los niveles de inducción son reducidos pero no suprimidos en ausencia de este regulador general de la fijación de nitrógeno. Durante simbiosis, la mayoría de las secuencias del pSim son transcritas de una manera similar a las obtenidas en microaerobiosis.



Dr. José Guillermo Dávila Ramos.
DIRECTOR DE TESIS

A AGUS, MARIANO Y LUIS MIGUEL.

A MIGUEL.....

AGRADECIMIENTOS

A Agus por la intensidad de nuestra relación y por compartir conmigo esta aventura con tanto amor, paciencia y enorme apoyo.

A Mariano y Luis Miguel, por la alegría que le han dado a mi vida, por regalarme parte de su tiempo y por tantas cosas que me han enseñado.

A mis papás por todo lo que me han dado a lo largo de mi vida.

A Migue porque con su alegría y valentía me enseñó a disfrutar y a valorar la vida.

A mis hermanos, Male, Juan Carlos, Chio, Chepe y Magui; a mis sobrinos. Porque son una familia maravillosa.

A la familia de Leonardo por hacerme parte de ustedes.

A David por todo lo que hemos compartido y lo que falta, por tu tiempo y apoyo.

A Memo por tu enorme apoyo, por dejarme volar y por tu amistad incondicional.

Al Dr. Rafael Palacios por haberme dado esta oportunidad y el invaluable apoyo que siempre me has brindado.

Al Dr. Jaime Mora por tu constante motivación y apoyo.

A los Dres. Esperanza Martínez, Mario Soberón y Alejandra Covarrubias, por la discusión de esta tesis y formar parte del jurado.

A Susi y a Jaime por lo estimulante que es trabajar con ustedes. Por su amistad.

A Brenda y a Maggie por su valiosa colaboración académica a lo largo de todo este tiempo y por su amistad.

A Osvaldo por tu amistad y porque siempre estás.

A TODOS mis amigos del CIFN, porque nombrarlos a cada uno harían una lista interminable. Gracias por compartir conmigo tantos momentos y darme la oportunidad de disfrutar con ustedes este maravilloso lugar de trabajo, superación y alegría.

A mis amigos del IBT.

Este trabajo fué realizado en el Departamento de Genética Molecular del
Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, perteneciente a la
Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del
Dr. José Guillermo Dávila R.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
Estadíos iniciales de la simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosa.....	2
Diversidad genética y especificidad del proceso.....	2
Proceso de infección y ontogenia del nódulo.....	3
Genes involucrados en la interacción planta-bacteria.....	6
Genes que controlan la infección, la nodulación y el rango de hospedero.....	9
Genes que controlan la fijación de nitrógeno.....	19
OBJETIVOS.....	29
RESULTADOS.....	33
"Transcriptional activity of the symbiotic plasmid of <i>Rhizobium etli</i> is affected by different environmental conditions".	
DISCUSIÓN.....	43
BIBLIOGRAFÍA.....	53

INTRODUCCION.

En esta introducción pretendo hacer una revisión general acerca de la asociación simbiótica que se establece entre algunas bacterias del suelo pertenecientes a la familia *Rhizobiaceae* (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*) y las plantas leguminosas. Mediante este proceso, la planta tiene la capacidad de utilizar el nitrógeno atmosférico a través de la formación de estructuras morfológicamente definidas, llamadas nódulos, en las raíces de la planta. La formación de nódulos fijadores de nitrógeno es un proceso de desarrollo inducido por medio de un intercambio de señales moleculares que se establece en la rizósfera por los dos simbioses. Dentro de estos nódulos, las bacterias, diferenciadas en bacteroides, reducen el nitrógeno atmosférico a amonio.

La fijación biológica de nitrógeno, es un proceso agrónomicamente significativo que provee una alternativa al uso de fertilizantes químicos, y ofrece un sistema de estudio a nivel molecular de gran relevancia, ya que cada uno de los simbioses puede ser estudiado y manipulado a nivel genético y molecular.

En términos generales, la presente revisión estará enfocada principalmente a aspectos relacionados con la regulación de la expresión de los genes bacterianos comprometidos en el establecimiento de una relación simbiótica efectiva. Sin embargo, esta debe necesariamente comprender el intercambio de señales entre ambos simbioses, los primeros estadios de la relación simbiótica y la especificidad del proceso, estadios en los cuales la información genética de la

INTRODUCCION.

En esta introducción pretendo hacer una revisión general acerca de la asociación simbiótica que se establece entre algunas bacterias del suelo pertenecientes a la familia *Rhizobiaceae* (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*) y las plantas leguminosas. Mediante este proceso, la planta tiene la capacidad de utilizar el nitrógeno atmosférico a través de la formación de estructuras morfológicamente definidas, llamadas nódulos, en las raíces de la planta. La formación de nódulos fijadores de nitrógeno es un proceso de desarrollo inducido por medio de un intercambio de señales moleculares que se establece en la rizósfera por los dos simbioses. Dentro de estos nódulos, las bacterias, diferenciadas en bacteroides, reducen el nitrógeno atmosférico a amonio.

La fijación biológica de nitrógeno, es un proceso agrónomicamente significativo que provee una alternativa al uso de fertilizantes químicos, y ofrece un sistema de estudio a nivel molecular de gran relevancia, ya que cada uno de los simbioses puede ser estudiado y manipulado a nivel genético y molecular.

En términos generales, la presente revisión estará enfocada principalmente a aspectos relacionados con la regulación de la expresión de los genes bacterianos comprometidos en el establecimiento de una relación simbiótica efectiva. Sin embargo, esta debe necesariamente comprender el intercambio de señales entre ambos simbioses, los primeros estadios de la relación simbiótica y la especificidad del proceso, estadios en los cuales la información genética de la

planta es necesaria.

ESTADIOS INICIALES DE LA SIMBIOSIS *RHIZOBIUM*-LEGUMINOSA.

Podemos decir que durante las etapas iniciales del proceso simbiótico, existe un diálogo molecular recíproco entre ambos organismos, en el cual existen moléculas señales que inducen la expresión de genes bacterianos; estos a su vez inducen cambios en el desarrollo morfológico de las raíces de la planta.

Diversidad genética y especificidad del proceso. El nombre de las especies del microsimbionte en muchos casos, está dado por el correspondiente huésped nodulado y sugiere que la simbiosis es un proceso especie-específico. Por ejemplo, *R. meliloti* nodula *Medicago*, *Melilotus*, y *Trigonella*, mientras que *Pisum*, *Vicia*, *Lens* y *Lathyrus* son hospederos para *R. leguminosarum* bv. *viciae*. *R. etli*, *R. tropici* y *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* establecen relaciones simbióticas con *Phaseolus vulgaris*. El uso de taxonomía numérica, hibridación de ácidos nucleicos y análisis del 16S ribosomal han demostrado la existencia de una marcada diversidad genética dentro de la familia *Rhizobiaceae* (Young *et al*, 1991). Es evidente que el grado de especificidad del hospedero varía ampliamente entre los rhizobia y que las relaciones simbióticas entre las especies de leguminosas y rhizobia son complejas. Esto se hace más evidente en el caso de algunas especies que tienen un rango de especificidad muy grande, como por ejemplo *Rhizobium* sp. NGR234 que nodula al menos a 35 especies de leguminosas y a *Parasponia*, una planta no leguminosa (Martínez *et al*, 1990; Van Rhijn y Vanderleyden, 1995). Estudios recientes indican que el rango de

hospederos para especies como *R. etli*, *R. meliloti* y *R. tropici* se extiende más allá de lo que inicialmente se creía, indicando que muchas especies de *Rhizobium* parecen estar ampliamente adaptadas para el establecimiento de una simbiosis. (Hernández-Lucas *et al*, 1995). Ha sido reportado que algunas cepas de rhizobia forman nódulos efectivos en una especie de planta (o género) e inefectivos en otra, mostrando que la especificidad no está limitada para la nodulación pero puede afectar las etapas tardías del desarrollo del nódulo y el establecimiento de una simbiosis fijadora de nitrógeno.

Proceso de infección y ontogenia del nódulo. El desarrollo de nódulos fijadores de nitrógeno representa la culminación de una compleja secuencia de eventos que requiere de la expresión temporal y definida de genes específicos. Al menos en los primeros estadíos de la simbiosis, el intercambio de señales entre ambos simbiosis activa consecutivamente genes tanto de la bacteria como de la planta. La infección de las raíces de la planta es un proceso precedido por eventos de preinfección en la rizósfera. Las bacterias responden positivamente a diferentes sustancias exudadas por la planta, incluyendo aminoácidos y carbohidratos, así como flavonoides, los cuales además de inducir la expresión de los genes *nod* son quimioatrayentes de la bacteria (Peters y Verma, 1990; Schultze *et al*, 1994). Las bacterias entonces, se mueven hacia sitios localizados sobre las raíces de la leguminosa (Dowling y Broughton, 1986). Aunque la quimiotaxis tiene influencia sobre la competitividad y establecimiento de la bacteria en la rizósfera, no es esencial para la nodulación ni es factor fundamental en la determinación de la especificidad del huésped, ya que mutantes en motilidad de *B. japonicum*, *R. meliloti* y *R. leguminosarum* bv. trifoli, siguen

siendo capaces de nodular (Liu *et al*, 1989; Malek, 1992; Mellor *et al*, 1987).

Los flavonoides secretados por la planta inducen, junto con la proteína activadora NodD, la expresión de los genes de nodulación (*nod*, *nol*) de la bacteria. A su vez, la bacteria produce lipooligosacáridos (conocidos como factores Nod), los cuales inducen la respuesta de la planta (Spaink *et al*, 1991). Dentro de las reacciones de la planta tenemos que los pelos radiculares se ramifican, deforman y enrollan como prerrequisito para la invasión y sucesiva infección de la raíz por la bacteria (Schultze *et al*, 1994). La división celular en el córtex y la formación del primordio del nódulo están asociadas con la infección. El desarrollo del primordio da lugar a nódulos donde las bacterias se multiplican y son entonces liberadas a las células vegetales donde se diferencian en bacteroides fijadores de nitrógeno (Dénarié *et al*, 1992).

Es importante mencionar que la planta huésped posee la información genética para la infección simbiótica y nodulación y que el papel de la bacteria es el de activar en la planta el programa simbiótico. Una bacteria puede entonces penetrar a distintos hospederos de diferente manera, es decir, ya sea por fisuras o a través de hilos de infección en los pelos radiculares, y una leguminosa dada es infectada por el mismo tipo de mecanismo cualquiera que sea la cepa. Tanto la ruta de infección como las características estructurales y de desarrollo de un nódulo eficiente son especificadas por la planta y no por la cepa bacteriana (Dénarié *et al*, 1992).

Las plantas leguminosas determinan el tipo, forma y tamaño de los nódulos. La localización del primordio del nódulo en el cortex de la raíz depende del tipo de

nódulo formado por una planta en particular (Rolfe y Gresshoff, 1988). En general, en leguminosas de clima templado tales como chícharos, alfalfa y veza, el primordio es formado en el córtex interior, formando nódulos indeterminados cilíndricos con un meristemo apical persistente. En este tipo de nódulos, mientras el meristemo está activo, los rhizobia son liberados desde los hilos de infección al citoplasma de las células vegetales. La diferenciación de los simbioses permite el establecimiento de una zona central en el nódulo, en la cual el nitrógeno es reducido (Nap y Bisseling, 1990; Vasse *et al*, 1990). Por lo tanto, en los nódulos indeterminados, el crecimiento y funcionalidad del nódulo ocurren simultáneamente. En los nódulos determinados, por el contrario, la actividad meristemática está restringida a un período determinado durante el desarrollo del nódulo. Este patrón de desarrollo se presenta en la mayoría de las leguminosas tropicales, tales como soya, frijol y *Lotus*. El meristemo del nódulo es inducido en el córtex externo de la raíz, y las bacterias son liberadas a las células meristemáticas que se están dividiendo activamente, de tal forma que cada célula hija recibe bacterias. Las células meristemáticas invadidas se diferencian simultáneamente formando el tejido central fijador de nitrógeno (Rolfe y Gresshoff, 1988). Este patrón de desarrollo da como resultado que el crecimiento del nódulo y su función estén disociados. Aquí, sólo se puede observar en un momento en particular la diferenciación bacteriana.

GENES INVOLUCRADOS EN LA INTERACCIÓN PLANTA-BACTERIA

El establecimiento de una relación simbiótica entre la planta y la bacteria, necesaria para llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno, es un proceso en el cual participan genes de ambos organismos. El estudio a nivel genético y molecular de los genes involucrados en la fijación simbiótica de nitrógeno ha avanzado notoriamente en los últimos años.

La morfogénesis del nódulo en las raíces de la planta es inducida por la interacción de la planta huésped con su bacteria simbiótica. Durante la diferenciación del nódulo, un grupo de genes específicos de la planta, llamados nodulinas, son activados en la raíz o en el nódulo en desarrollo (Schultze *et al*, 1994). De acuerdo a su patrón de expresión y a su función se han definido dos tipos principales de nodulinas (Verma *et al*, 1986). Las nodulinas que se expresan antes de que comience la fijación de nitrógeno son llamadas nodulinas tempranas (Enod). Se piensa que participan en la interacción temprana entre la bacteria y la planta, así como en la morfogénesis del nódulo. La mayoría de las nodulinas parecen ser expresadas durante los estadios tardíos de la simbiosis (por ejemplo, justo antes o durante la fijación de nitrógeno) y son llamadas nodulinas tardías. Estas están involucradas principalmente en las diferentes actividades metabólicas necesarias para el funcionamiento del nódulo. Ejemplos de algunas de ellas, con función conocida son aquellas que codifican para la globina, parte de la leghemoglobina, la cual controla la concentración de oxígeno libre dentro del nódulo. La función de las nodulinas tempranas, ENOD2, ENOD12, ENOD13 y ENOD55, las cuales se expresan durante la formación del nódulo, es desconocida.

Sin embargo, la estructura de las proteínas codificadas por estos genes sugiere que son glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (Van de Wiel *et al*, 1990). En *G. soja*, ENOD2 es una nodulina temprana que codifica para una proteína de la pared celular rica en prolina (Van de Wiel *et al*, 1990), la cual es expresada rápidamente después de la inoculación bacteriana. ENOD55 también es expresada rápidamente y ha sido propuesta como una proteína de la pared celular, localizada en células infectadas en los primeros estadios del desarrollo del nódulo (Kouchi y Hata, 1993). Estudios recientes indican que los genes de las nodulinas tempranas son inducidos por los factores de nodulación producidos por la bacteria (LCOs, lipooligosacáridos) (Lugtenberg *et al*, 1995). Observaciones recientes muestran, sin embargo, que ENOD12 no es requerida ni para la nodulación ni para la fijación de nitrógeno (Lugtenberg, *et al*, 1995) y que el ADN de ENOD40, de *Medicago truncatula* no muestra ningún marco de lectura abierto sugiriendo que este producto génico funciona como un RNA no traducido que actúa como un ribo-regulador asociado con el control de crecimiento y diferenciación (Lugtenberg *et al*, 1995; Hirsch *et al*, 1995).

Dado que la organogénesis del nódulo requiere de la inducción de la división celular en el córtex de la raíz, se ha sugerido que un posible papel de los factores Nod sea el de activar la maquinaria del ciclo celular en las células diferenciadas. Dentro de los genes del ciclo celular que han sido clonados de las plantas leguminosas encontramos a *cdc2*, el cual ha sido aislado de chícharos, alfalfa y soya. Este, en asociación con diferentes tipos de ciclinas, juega un papel central en la progresión del ciclo celular (Feiler y Jacobs, 1990; Hirt *et al*, 1991). En soya, la expresión de este gene es inducida durante la infección por *Rhizobium*

y durante las etapas tempranas del desarrollo del nódulo (Verma, 1992). Otros genes aislados de alfalfa y soya, involucrados en en la progresión del ciclo celular y que son activados por los factores Nod son *cdc2Ms*, *cycMs2* y la histona H3 (Schultze *et al*, 1994).

Como ya ha sido mencionado, los flavonoides exudados por la planta controlan la expresión de los genes *nod*, pero también funcionan como inhibidores del transporte de auxinas (Jacobs y Rubery 1988); estos podrían jugar un papel morfogénico durante el desarrollo del nódulo. Durante el desarrollo del nódulo, la expresión de genes que codifican para enzimas claves de la vía biosintética de flavonoides es inducida (Estabrook y Sengupta-Gopalan, 1991). Por lo tanto, la expresión de los genes de flavonoides está correlacionada con la actividad meristemática de la raíz y del nódulo (Schultze *et al*, 1994).

Los genes bacterianos involucrados en las diferentes etapas de la interacción planta-bacteria incluyen, en el más amplio sentido, a los genes *nod*, *nif* y *fix*. Los genes *nod* son requeridos en los estadíos tempranos de la interacción y en la formación del nódulo. Para que la invasión bacteriana sea exitosa, se requiere de la expresión de los genes bacterianos *exo*, *lps* y *ndv*, involucrados en la síntesis de exopolisacáridos, lipopolisacáridos y β -glucano, respectivamente (Schultze *et al.*, 1994). Los genes involucrados en la fijación de nitrógeno han sido definidos como genes *nif* cuando son homólogos, tanto estructural como funcionalmente, a los genes de organismos fijadores de nitrógeno en vida libre, como *K. pneumoniae*. En *Klebsiella*, el "cluster" de genes *nif* comprende al menos

20 genes organizados en 8 operones, ocupando 24 kb de ADN (Arnold *et al.*, 1988). Otros genes involucrados en la fijación simbiótica de nitrógeno son designados genes *fix*, los cuales no son equivalentes estructuralmente a los genes *nif* de *K. pneumoniae* (Fischer 1994). La presencia de los genes *fix* esta correlacionada con las condiciones ambientales específicas en las cuales se lleva a cabo la fijación de N₂. Dentro de los nódulos de las raíces se requieren, por lo tanto, vías regulatorias diferentes a las de *K. pneumoniae*. Los genes comprometidos en la fijación biológica del nitrógeno están organizados en operones que son regulados coordinadamente. La localización genómica y la organización de estos operones es específica para cada especie.

El genoma de *Rhizobium* está organizado en dos tipos de replicones, el cromosoma y los plásmidos de alto peso molecular, los cuales son esenciales para el proceso de nodulación y fijación de nitrógeno. El número y tamaño de los plásmidos varía para cada cepa. La mayoría de los genes para nodulación y fijación de nitrógeno están localizados en un plásmido llamado simbiótico o pSim (Johnston *et al.*, 1978; Banfalvi *et al.*, 1981; Hooykaas *et al.*, 1981; Rosenberg *et al.*, 1981). Otros genes simbióticos se localizan en otros plásmidos o en el cromosoma. En las especies de *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* la información simbiótica está localizada en el cromosoma (Fischer, 1994).

Genes que controlan la infección, la nodulación y el rango de hospederos. Los genes involucrados en estos procesos pueden ser divididos en dos grupos: uno que incluye a aquellos genes involucrados en la formación de la superficie celular bacteriana, tales como los genes *exo*, *lps* y *ndv* (Gray y Rolfe,

1990; Leigh y Coplin, 1992; García de los Santos *et al.*, 1996). Mutaciones en estos genes alteran el proceso de infección de tal manera que pueden causar la formación de nódulos vacíos no fijadores (fenotipo Nod⁺ Fix⁻). El otro grupo de genes incluye a los genes específicos de nodulación: *nod* y *nodJ*.

Los exopolisacáridos (EPS) y los lipopolisacáridos (LPS) son moléculas cuya función es importante para la vida de la bacteria y para el proceso de nodulación. Durante la simbiosis los EPS son requeridos para los procesos de invasión y desarrollo del nódulo, en aquellas leguminosas que forman nódulos indeterminados. En *R. meloti*, un "cluster" de genes involucrados en la biosíntesis de EPS, se encuentra localizado en un megaplásmido diferente al pSim (Leigh y Walker, 1994). En otras especies de *Rhizobium*, la biosíntesis de EPS es regulada por genes localizados en otros plásmidos. En *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, el gene *psi* inhibe la síntesis de EPS (Borthakur y Johnston, 1987); mientras que una secuencia con una función similar ha sido localizada en *S. fredii* (Barbour y Elkan, 1990). En *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* y *R. etli*, algunos de los genes involucrados en la síntesis de LPS han sido localizados en plásmidos no simbióticos. Mutaciones en estos plásmidos afectan la nodulación. Estudios de complementación funcional y homología estructural sugieren que existe una alta conservación entre los plásmidos que llevan los genes *lps* de *R. leguminosarum* y *R. etli*. (García de los Santos *et al.*, 1996).

Se ha sugerido que los genes *exo* y *lps* podrían ser importantes en la determinación de la especificidad, sin embargo no existen evidencias genéticas que muestren a los componentes de la superficie de *Rhizobium* como

determinantes en el rango de especificidad (Van Rhijn y Vanderleyden, 1995).

El otro grupo de genes comprende a los genes de nodulación (*nod* o *nod*). La leguminosa huésped libera compuestos señal que estimulan la expresión coordinada de los genes *nod* de la bacteria, los cuales a su vez codifican enzimas involucradas en la síntesis de factores de nodulación (factores Nod) (Fisher y Long, 1992). Los factores Nod son considerados la molécula señal principal de nodulación de *Rhizobium* que actúa como determinante para el rango de huésped específico de la bacteria. Las señales moleculares en la simbiosis rizobia-leguminosa son variaciones de un mismo tema, los inductores de la planta son compuestos fenólicos del grupo de los flavonoides con un esqueleto y modificaciones que los distinguen de los inductores de otras plantas. Los morfógenos sintetizados por la bacteria son oligosacáridos de N-acetil-D-glucosamina que varían en longitud de tres a cinco unidades de azúcares unidos por enlaces β -1,4. En el extremo no reductor están N-acilados y la presencia de otras sustituciones es dependiente de las especies y cepas que los sintetizan. Los diferentes tipos de factores Nod con sus diferentes modificaciones se muestran en la siguiente figura (Poupot *et al.*, 1993; Carlson *et al.*, 1994; Poupot *et al.*, 1995).

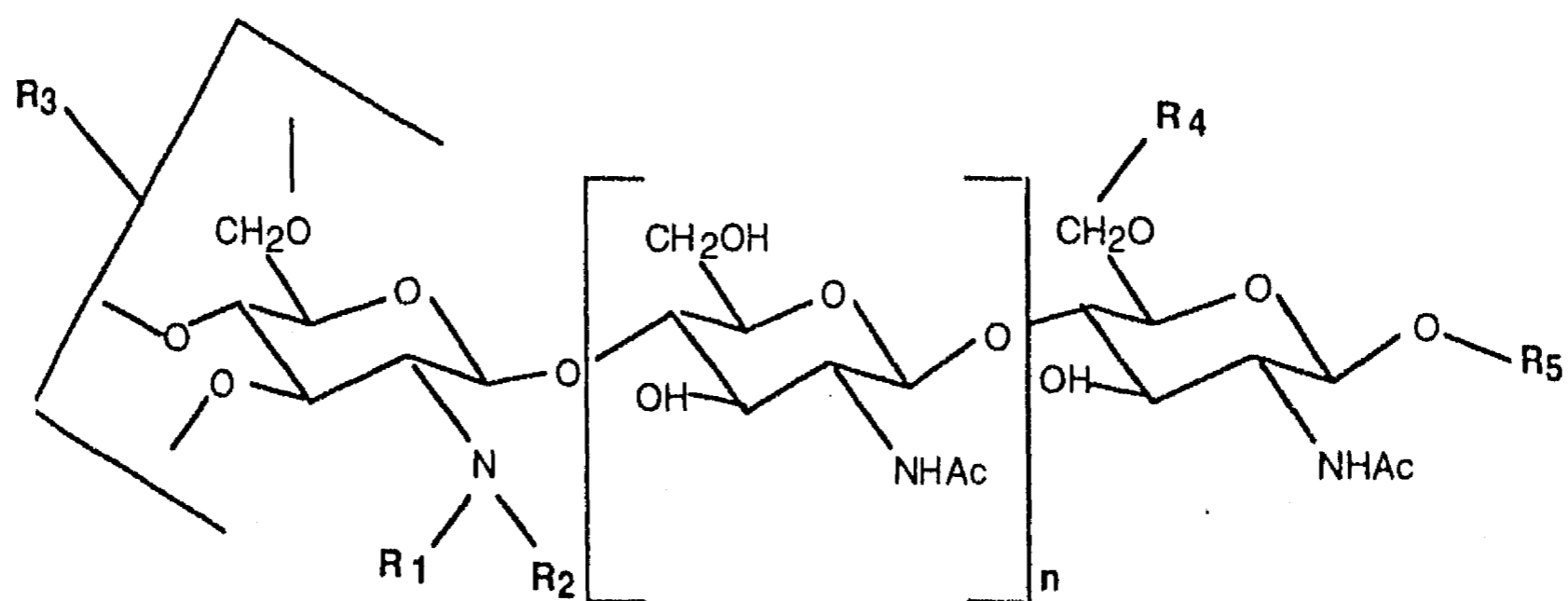
TIPOS DE GRUPOS SUSTITUYENTES EN DIFERENTES FACTORES

NOD

ESPECIE	R1	R2	R3	R4	R5	n
<i>R. meliloti</i>	H	C16:2 C16:3	Ac(O-6) H	Sulfato	H	1,2,3

<i>R.leg. bv. viciae</i>	H	C18:4 C18:1	Ac(O-6)	H Ac(O-6)	H	2,3
<i>B. japonicum</i>	H	C18:1 C16:0 C16:1	Ac(O-6) H	MeFuc	H	3
<i>B. elkanii</i>	H Me	C18:1	Ac(O-6) H Cb	MeFuc Fuc	H Gro	2,3
NGR234	Me	C18:1 C16:0	Ac(O-6) H Cb(1,2)	MeFuc AcMeFuc MeFucS	H	3
<i>A. caulinodans</i>	Me	C18:1 C18:0	Ac(O-6) Cb	D-Ara H	H	2,3
<i>R. tropici</i>	Me	C18:1	H	Sulfato	H	3
<i>R. etli</i>	Me	C18:1	Cb	AcFuc	H	3
<i>R. fredii</i>	H	C18:1	H	MeFuc Fuc	H	1,2,3

Me= metil; C16:0= ác. palmítico, C18:1= ác. vacénico; Ac= acetil; Fuc= fucosa; MeFuc= 2-O-metilfucosa; Ara= arabinosa; Gro= glicerol; Cb= carbamil; S= sulfato.



Originalmente, los genes de nodulación fueron clasificados de acuerdo al fenotipo en mutantes *nod* y en estudios de complementación, de tal manera que, los genes *nodABC*, presentes en todos los *Rhizobium* los cuales además son intercambiables entre diferentes especies, son nombrados genes *nod* comunes. Estos genes son esenciales para que la nodulación ocurra (Kondorosi *et al.*, 1984). Los genes de especificidad, *hsn*, se encuentran solo en algunas cepas y ayudan a determinar el rango de hospedero de la bacteria. Por ejemplo el gene *nodE* de *R. leguminosarum* especifica la nodulación de chícharo o trébol, dependiendo del biovar, *viciae* o *trifolii*, respectivamente (Spaink *et al.*, 1991; Horvath *et al* 1986). En *R. meliloti*, *nodH* y *nodPQ* son responsables de la especificidad en la nodulación de alfalfa (Schwedock y Long, 1989). Mutaciones en los genes de nodulación resultan en diferentes fenotipos: ausencia de nodulación (Nod⁻), nodulación retardada pero efectiva (Nod^d Fix⁺) o cambios en el rango de hospedero (Van Rhijn y Vanderleyden, 1995). Las funciones propuestas para los genes *nod* requeridas para la biosíntesis y transporte de los factores de

nodulación son enlistadas en la siguiente tabla:

**Funciones y propiedades de los productos de algunos genes
nod y *nol*.**

PROTEINA	FUNCIONES Y PROPIEDADES PROPUESTAS
Síntesis de la estructura básica de oligosacáridos.	
NodA	Acetilación del factor de nodulación.
NodB	Quitooligosacárido deacetilasa.
NodC	N-acetilglucosamil transferasa, síntesis de quitooligosacáridos.
Síntesis de los precursores de factores Nod.	
NodM	D-glucosamina sintetasa.
Modificaciones huésped-específicas de factores Nod.	
NodE	β -cetoacil sintetasa. Síntesis de ácidos grasos multi-insaturados.
NodF	Proteína acarreadora del grupo acilo. Síntesis de ácidos grasos multi insaturados.
NodG	β -cetoacil reductasa. ¿Síntesis de ácidos grasos multi insaturados?.

NodH	Sulfotransferasa. Sulfatación de factores Nod.
NodL	6- <i>O</i> -acetilación del factor Nod.
NodP,Q	ATP-sulfurilasa y APS cinasa. Activación del sulfato para transferirlo a los factores Nod.
NodS	Metil transferasa. <i>N</i> -metilación de factores Nod.
NodX	6- <i>O</i> -acetilación del factor Nod en el extremo reducido.
NodZ	Fucosilación de factores Nod.
NoIL	Acetil-transferasa. 4- <i>O</i> -acetilación de fucosa.
NoIK	¿ <i>D</i> -arabinosilación de factores Nod?.
NoIO	Eficiencia de la 2- <i>O</i> -metilfucosilación.
Funciones auxiliares	
NodI,J	Secreción de factores Nod.
NodT	Secreción de factores Nod, posiblemente en cooperación con NodI,J.
NodN	Eficiencia de la producción de la señal Nod.
NodO	Proteína secretada. Forma poros membranales.
NoIF,G,H,I	¿Secreción del factor Nod?.
Funciones regulatorias	

NodD	Activación de la transcripción de los genes <i>nod</i> . Determinante de especificidad. Reiterado en alguna especies.
SyrM	Activación de genes <i>nod</i> flavonoide-independiente.
NodV,W	Sistema regulatorio de dos componentes para activación de genes <i>nod</i> . NodV: sensor. NodW: activador transcripcional.
NolA	¿Regulación de genes <i>nod</i> ?
NolR	Represor de la transcripción de genes <i>nod</i> .

Información tomada de Schultze *et al.*, (1994); Van Rhijn y Vanderleyden, (1995); Rivilla *et al.*, (1995); Scott *et al.*, (1996); Corvera y Romero (comunicación personal)

En general, la expresión de los genes *nod* requiere de la presencia de señales de la planta, flavonoides u otros compuestos fenólicos excretados por las raíces de la planta. La proteína regulatoria NodD, reconoce estos flavonoides y actúa como activador transcripcional, uniéndose a secuencias altamente conservadas presentes en la región promotora de las unidades transcripcionales de los genes *nod* inducibles por flavonoides (las cajas *nod*). La presencia de las cajas *nod* permite una expresión coordinada de los operones *nod* formando el regulón *nod*. La estructura de una proteína NodD dada determina cuáles flavonoides actúan como inductores de los genes *nod*. Por lo tanto, las interacciones flavonoide-NodD representa el principal paso huésped específico en el establecimiento de una simbiosis (Schultze *et al.*, 1994). Este sistema de regulación por NodD está presente en todos los *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y

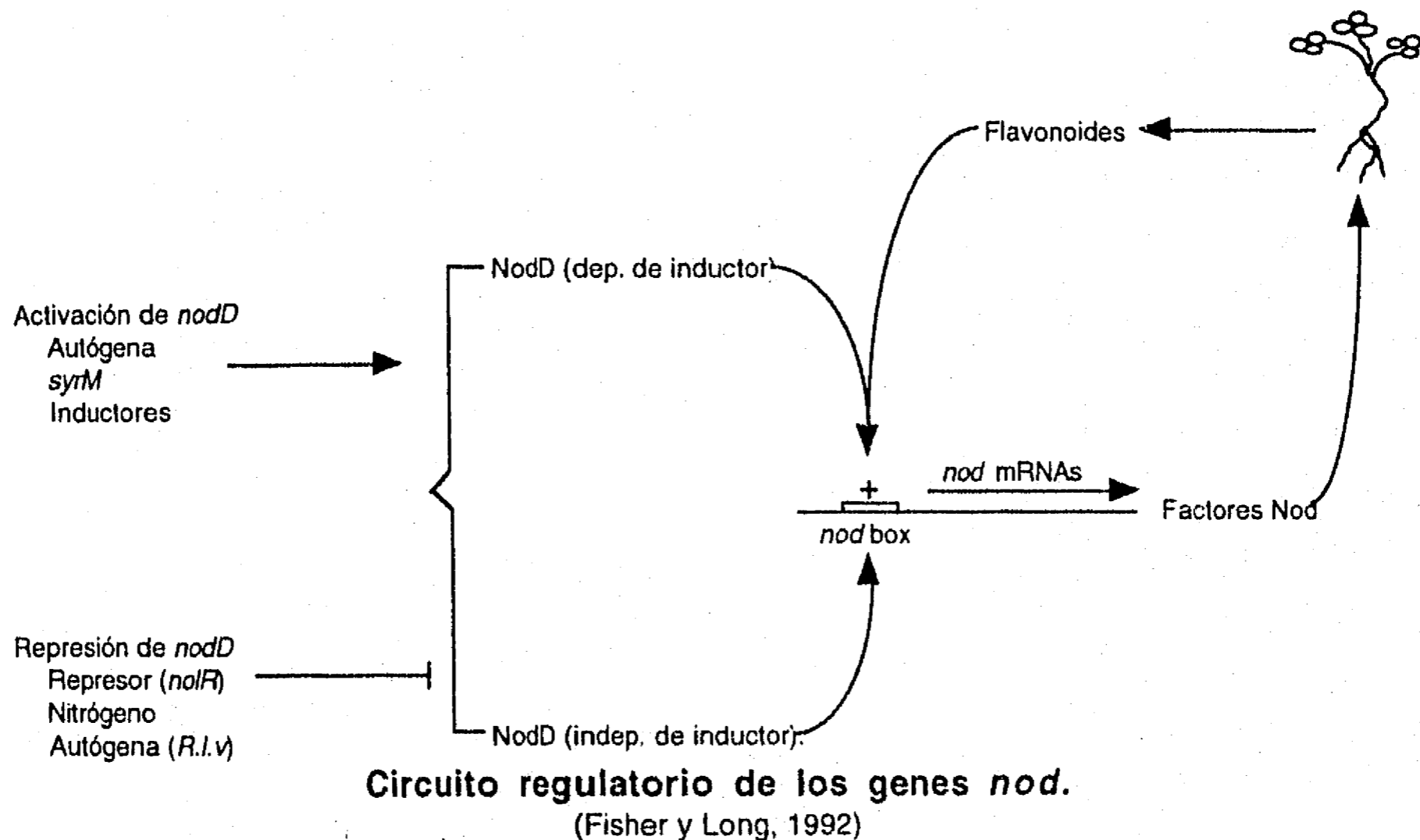
Azorhizobium estudiados hasta ahora. A pesar de que existen variaciones entre las especies en el número de copias presentes del gene *nodD*, los diferentes genes *nodD* están conservados y sus correspondientes proteínas han sido clasificadas como miembros de la familia de activadores transcripcionales LysR (Henikoff *et al.*, 1988). El número de copias de *nodD* no está correlacionado con el rango de hospederos, ya que mientras *R. meliloti*, un simbiote relativamente específico, tiene tres copias del gene, *Rhizobium* sp. NGR234, una cepa de amplio rango, tiene dos.

La importancia de las reiteraciones del gene *nodD* en el proceso de nodulación depende de la planta huésped, ya que las proteínas NodD, como se mencionó anteriormente muestran diferente sensibilidad a los compuestos exudados por la planta. Por ejemplo, en *R. meliloti*, *nodD1* responde a luteolina (Honma *et al.*, 1990); mientras que *nodD2* es activado en presencia de metoxi-chalcona (Hartwig *et al.*, 1990). El papel de las proteínas NodD no está limitado a la regulación de la expresión de los genes *nod* en respuesta a flavonoides. En *R. meliloti*, *nodD3* también está involucrado en la regulación por amonio de la expresión de los genes *nod* (Dusha *et al.*, 1989).

Dentro del circuito regulatorio por NodD existen otros elementos regulatorios. Por ejemplo el gene *syrM*, que también pertenece a la familia *lysR*, activa la expresión de *nodD3*, el cual a su vez activa la expresión de *syrM* (Kondorosi *et al.*, 1991b). *SyrM* también regula la expresión de los genes *exo*, indicando que *syrM* podría regular coordinadamente el metabolismo de EPS y de

factores Nod (Rushing *et al.*, 1991).

En *R. meliloti* la regulación de los genes *nod* está bajo un control dual que involucra activadores y al represor NodR, el cual contribuye a una nodulación óptima. El gene *nolR* está presente en una sola copia localizada en el cromosoma, el cual se une a una secuencia de 21 pb localizada de 2 a 14 pb abajo de las cajas *nod* n1, n4 y n6 (Kondorosi *et al.*, 1989; Kondorosi *et al.*, 1991a). La regulación por NodR afecta particularmente a aquellos genes *nod* involucrados en la síntesis del esqueleto central del factor de nodulación y probablemente a aquellas involucradas en su excreción, pero no a los genes *nod* requeridos en las modificaciones específicas de los factores Nod (Schultze *et al.*, 1994). La eliminación de esta secuencia reduce fuertemente la actividad promotora, indicando que es un elemento esencial del promotor (Spaink *et al.*, 1987).



En *B. japonicum* se han identificado otros genes regulatorios además de los genes *nodD*. Los genes *nodVW* son requeridos para la nodulación de otras leguminosas diferentes a soya. La secuencia de aminoácidos de NodV y NodW indica que son miembros de la familia de los sistemas regulatorios de dos componentes, donde NodV parecería ser una cinasa sensora que responde a señales de la planta, mientras que NodW, el regulador, regula a uno o a varios genes involucrados en nodulación (Göttfert *et al.*, 1990). Se sugiere que NodW es esencial para la inducción por isoflavonas de *nodYABC* y *nodD₁* (Sanjuan *et al.*, 1994). Esto sugiere un efecto sinérgico de NodD₁ y NodW sobre la activación de los genes *nod*. Sin embargo, el modo de acción del sistema regulatorio NodVW es desconocido y no está claro, como NodW pudiera interaccionar con los promotores *nod* y con la regulación transcripcional mediada por NodD.

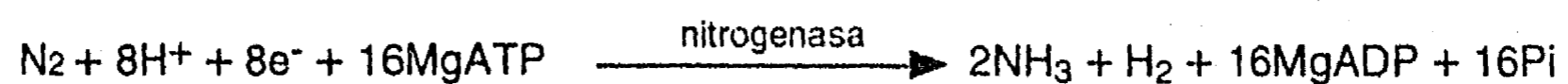
La diversidad de señales y estrategias encontradas para la inducción de los genes *nod*, sugiere que a lo largo de la evolución fue desarrollado un sistema genético complejo paso a paso hacia la adaptación de los rhizobia a nuevos genotipos de plantas.

Genes que controlan la fijación de nitrógeno. Los genes *nif* y *fix* son expresados en los estadios tardíos del desarrollo del nódulo y su expresión es controlada por cascadas de genes regulatorios, los cuales permiten que la bacteria sense las condiciones ambientales requeridas para la fijación de nitrógeno y transmita esta información a nivel de expresión génica.

La actividad y síntesis de la nitrogenasa, la enzima encargada de reducir el

N₂ a amonio, es regulada por las condiciones ambientales. Los factores ambientales mas significativos son la disponibilidad del nitrógeno fijado y el oxígeno molecular. En los casos de organismos que contienen nitrogenasas alternativas, la disponibilidad de molibdeno o vanadio puede influir en la actividad de la nitrogenasa y expresión de los genes de fijación de nitrógeno *nif*, *vnf* y *anf* (Bishop y Premakumar, 1992; Merrick, 1992). El mecanismo de reacción de esta enzima es muy complejo, sin embargo ha habido un avance sustancial en los últimos años (algunos de los cuales pueden ser revisados en Howard, 1994; Kim y Rees, 1994).

La fijación de nitrógeno en nódulo sigue la siguiente ecuación general:



Debido a la sensibilidad de la nitrogenasa al oxígeno y al fuerte gasto de energía requerida en la reducción de 1 mol de N₂ a amonio, los circuitos regulatorios ejercen un fino control en su síntesis. El control de la regulación de la fijación de nitrógeno en la mayoría de los organismos estudiados se ejerce a nivel de la transcripción de los genes *nif*, cuya expresión es regulada principalmente en respuesta a la concentración de oxígeno celular. La expresión de los genes *nif* y *fix*, incluyendo los genes estructurales de la nitrogenasa, es inducida *ex planta* en respuesta a bajas concentraciones de oxígeno (Ditta *et al.*, 1987). Esta inducción de la expresión por bajo oxígeno es fisiológicamente relevante debido a las bajas concentraciones de oxígeno que se mantienen en el nódulo para prevenir la inactivación de la nitrogenasa.

A pesar de la considerable variabilidad taxonómica encontrada entre los organismos fijadores de nitrógeno, existe un sorprendente grado de similitud entre las proteínas regulatorias de los genes *nif* (Merrick 1992). Sin embargo, existe una diversidad de variantes en los mecanismos de regulación de estos genes.

Los elementos regulatorios identificados incluyen a FixL, FixJ, FixK, NifA y RpoN, los cuales están integrados de manera específica en dos cascadas regulatorias que controlan diferentes grupos de genes. Por un lado, NifA, una proteína activadora de los genes *nif* a nivel transcripcional, controla la expresión de los genes estructurales de la nitrogenasa. El otro circuito regulatorio involucra a las proteínas FixLJ y FixK que regulan la expresión de los genes *fixNOQP* y *fixGHIS*; y en algunos casos regulan la expresión de *nifA* (David *et al.*, 1988; Virts, *et al.*, 1988; Batut *et al.*, 1989; Kaminski y Elmerich, 1991a; Kaminski *et al.*, 1991b).

Las proteínas FixL y FixJ son miembros de los sistemas regulatorios de dos componentes por medio de los cuales la bacteria es capaz de responder a señales del medio ambiente o citoplásmicas con actividades celulares específicas (Ronson *et al.*, 1987; David *et al.*, 1988; Albright *et al.*, 1989). FixL es una hemoproteína cinasa/fosfatasa regulada por oxígeno, en la cual una molécula hemo unida al dominio central de la proteína sensa la tensión de oxígeno. El C-terminal corresponde al dominio más conservado de las proteínas sensoras en sistemas regulatorios de dos componentes, e incluye el sitio de autofosforilación de FixL. El dominio N-terminal no fosforilado de la proteína FixJ enmascara al C-terminal, el cual contiene al motivo de unión de DNA hélice-vuelta-hélice (Kahn y Ditta, 1991; Da Re *et al.*, 1994). La fosforilación del dominio N-terminal por FixL induce un

cambio conformacional de la proteína, liberándola de su efecto inhibitorio. El control por oxígeno ocurre a dos niveles. Las condiciones de bajo oxígeno estimulan la actividad de autofosforilación de FixL y reprimen la actividad de fosfatasa, resultando en un incremento de los niveles de FixJ fosforilada bajo estas condiciones. Contrariamente, la acumulación de FixJ no fosforilada se debe, bajo condiciones de alto oxígeno al decremento de la autofosforilación y a la estimulación de la actividad de fosfatasa de FixL (Monson *et al.*, 1992; Gilles-González y González, 1993; Lois *et al.*, 1993).

En *R. meliloti*, los genes que son activados por FixJ incluyen a *nifA*, *fixK* y *fixK*. Este último corresponde al gene *fixK* reiterado de la región duplicada *fixK-fixNOQP* (Batut *et al.*, 1989). En *B. japonicum* FixJ activa al gene *fixK₂*; y en *A. caulinodans* a *fixK* (Virts *et al.*, 1988; Kaminski *et al.*, 1991b; Fischer, 1994). A pesar de que se han encontrado algunos elementos comunes en la región promotora de los cinco genes blanco para FixJ, no está claro si este motivo es parte de un sitio de reconocimiento para FixJ o si éste hace contacto con la RNA polimerasa o ambos.

Las proteínas FixK pertenecen al grupo de las proteínas reguladoras transcripcionales procarióticas, llamadas Crp-Fnr. En *E. coli*, Fnr es un regulador transcripcional que controla la expresión de una variedad de genes involucrados principalmente en procesos respiratorios anaeróbicos (Spiro y Guest, 1990). Las funciones regulatorias de Crp y Fnr incluyen tanto control positivo como negativo. Existen dos elementos estructurales comunes en todos los miembros de la familia Crp-Fnr. Primero, cinco residuos de glicina en la mitad del dominio N-terminal de

la proteína. Segundo, un motivo hélice-vuelta-hélice, característico de todas las proteínas de unión a DNA, está presente en el C-terminal. Los miembros de la familia de proteínas Crp-Fnr pueden ser divididas de acuerdo a la similitud de su secuencia de aminoácidos y a su función. De tal manera que algunas están involucradas en el control por oxígeno de varios procesos celulares, otras están relacionadas con competencia y fitopatogenicidad, más que con la regulación de genes catabólicos y por último, encontramos las que están involucradas en el control del metabolismo de nitrógeno y azufre (Fischer, 1994).

Una función común de las proteínas FixK de la familia *Rhizobiaceae* es el control de la expresión de *fixNOQP* (Batut *et al.*, 1989; Mandon *et al.*, 1993; Mandon, 1994). La presencia de un sitio de unión a FixK en los genes *fixGHIS* de *R. meliloti* y *B. japonicum*, hacen pensar que su expresión es también regulada por FixK. En contraste, la función regulatoria de FixK sobre *nifA* difiere significativamente. En *R. meliloti*, ejerce un control negativo sobre la expresión de *nifA* (Batut, *et al.*, 1989); mientras que en *A. caulinodans* es requerida para la regulación positiva de la expresión de *nifA* (Kaminski *et al.*, 1991b). Contrariamente, en *B. japonicum*, la cascada *fixLJ-fixK₂* no está involucrada directamente en la regulación de la expresión de *nifA*, pero es responsable del control por oxígeno de *rpoN₁* y *fixK₁* (Fischer, 1994).

La activación de los promotores *nif* y *fix* regulados por NifA es estrictamente dependiente de la presencia de un factor sigma alternativo, σ^{54} , codificado por el gene *rpoN* (Merrick, 1992; Fischer, 1994). La estructura de los

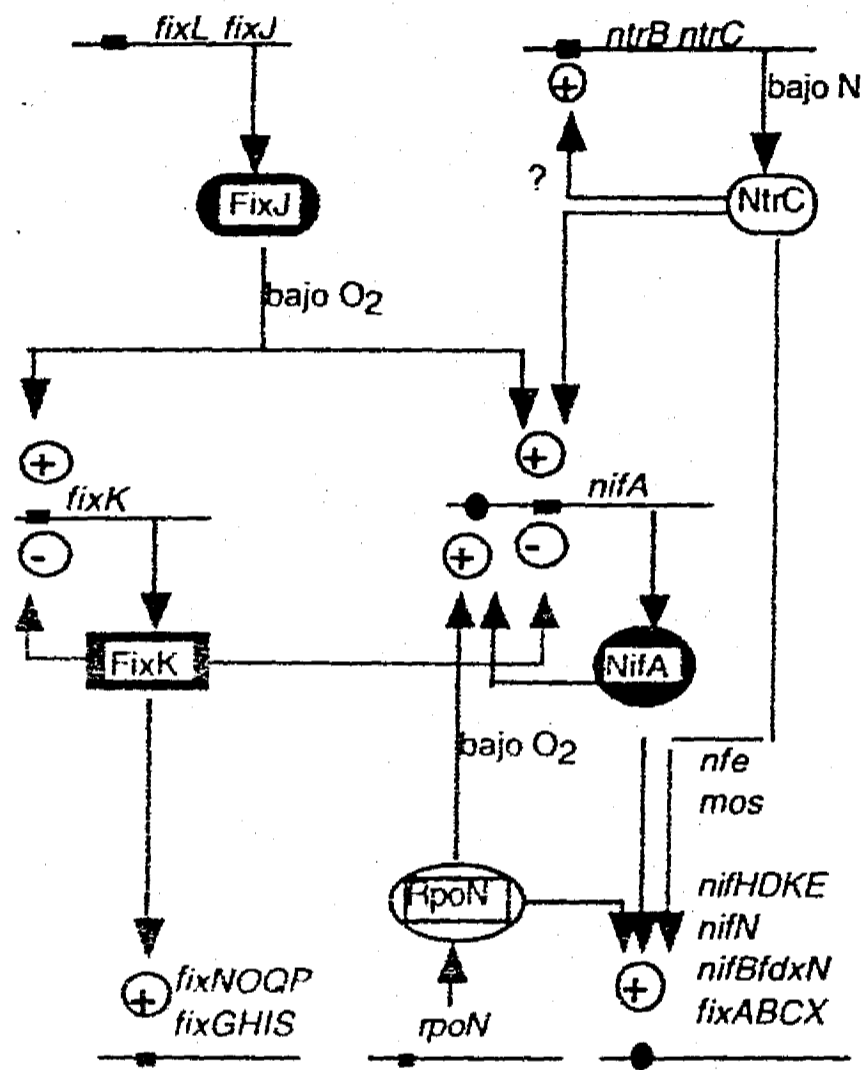
promotores σ^{54} -dependientes está altamente conservada, presentando en las posiciones -11 y -26 con respecto al punto de inicio de la transcripción un consenso 5'-TGGCACN₅TTGCA/T-3', el cual es diferente del encontrado en la región -35, -10 de la mayoría de los promotores procarióticos (Morett y Buck, 1989). NifA es una proteína de unión que interactúa específicamente con un motivo de DNA al cual se une, llamado UAS (upstream activator sequence). Este consenso, 5'-TG_{TN}₁₀ACA-3', está altamente conservado entre dichos genes y se localiza entre 80 y 150 pb arriba del inicio de la transcripción (Morett y Buck, 1988).

Al menos, 16 secuencias del gene *nifA* en 14 especies diferentes han sido reportadas (Buikema *et al.*, 1985; Kim *et al.*, 1986; Grönger, *et al.*, 1987; Thöny *et al.*, 1987; Bennett *et al.*, 1988; Evans *et al.*, 1988; Masephol *et al.*, 1988; Nees *et al.*, 1988; Iismaa y Watson, 1989; Ratet *et al.*, 1989; Roelvink *et al.*, 1989; Liang *et al.*, 1991; Souza *et al.*, 1991; Shigematsu *et al.*, 1992; Michiels *et al.*, 1994; Girard *et al.*, 1995). Mutantes NifA en diferentes especies inhiben totalmente la fijación de nitrógeno (fenotipo Fix⁻), así como la actividad de nitrogenasa en vida libre (fenotipo Nif⁻) (Fischer, *et al.*, 1986; Pawlowski, *et al.*, 1987; Michiels, *et al.*, 1994; Valderrama, *et al.*, 1996; Girard, *et al.*, 1996). Esto refleja la función común de los genes *nifA* como activadores transcripcionales de los genes estructurales de la nitrogenasa y genes que codifican para funciones accesorias. En un fondo genético de *E. coli*, la actividad *in vivo* de las proteínas NifA de *R. meliloti*, *B. japonicum*, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* y *R. etli* es inhibida por altas concentraciones de oxígeno (Fischer y Hennecke, 1987; Beynon *et al.*, 1988; Hawkins y Johnston, 1988; Huala y Ausubel, 1989; Valderrama *et al.*, 1996). Esta

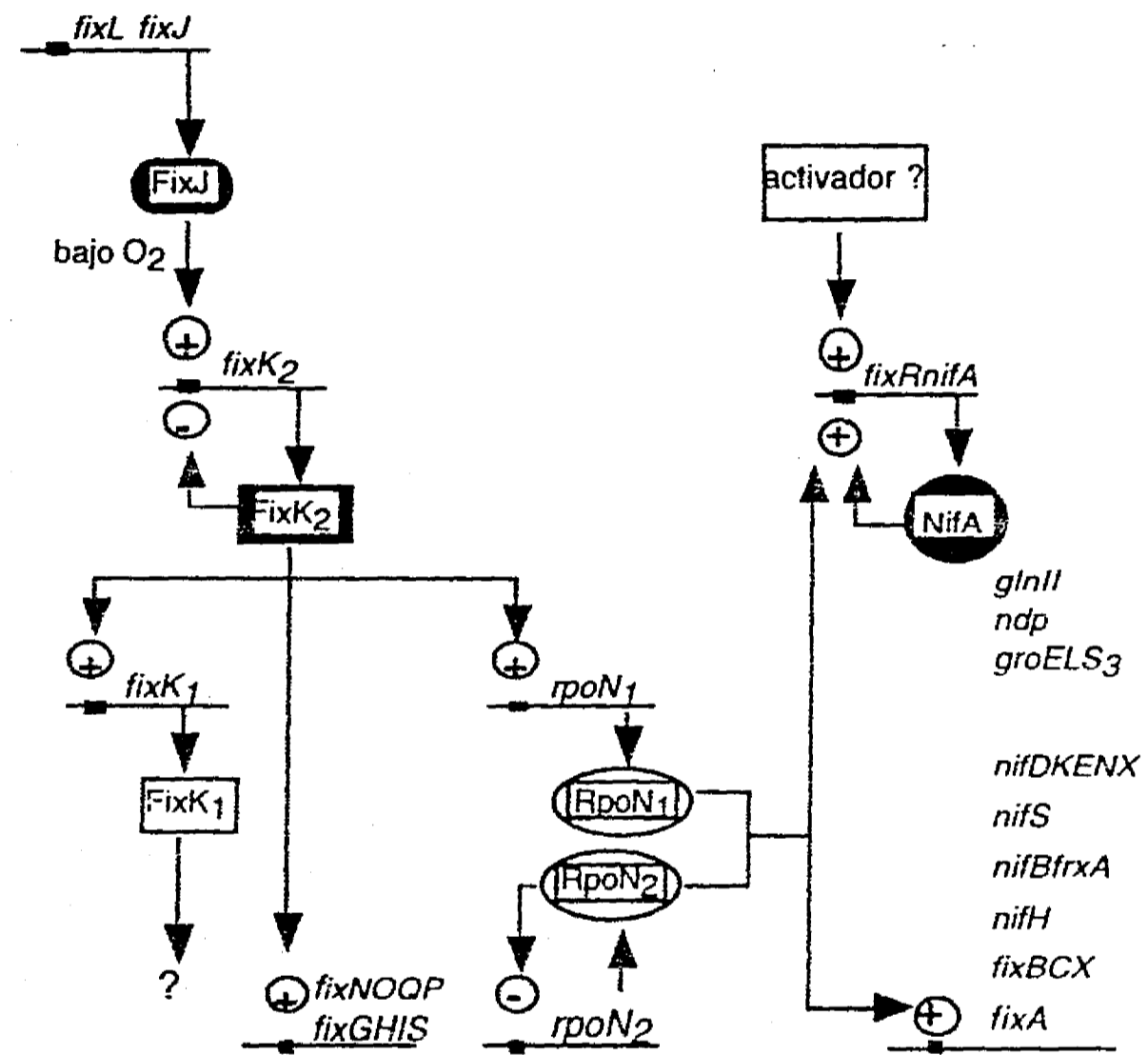
sensibilidad a oxígeno parece ser común en las proteínas NifA de todos los tipo de rhizobia que contienen en su estructura un motivo rico en cisteínas. Los mediadores de este control pueden ser el oxígeno *per se*, o bien por medio de potenciales redox positivo, como ha sido propuesto para *E. coli* (Fnr).

A continuación se muestran los modelos de regulación propuestos para *R. meliloti* y *B. japonicum*, así como una tabla integrativa de los genes *nif* y *fix*.

Modelos de regulación de los genes *nif* y *fix*.



Rhizobium meliloti



Bradyrhizobium japonicum

- Promotores σ^{54} -dependientes
- Otros promotores

Fischer, H.M., 1994

GENES *nif* y *fix* IDENTIFICADOS EN *R. meliloti*, *B. japonicum* y *A. caulinodans* Y SU FUNCIÓN CONOCIDA O PROPUESTA.

GENE	PRODUCTO Y/O FUNCION PROPUESTA
Genes <i>nif</i>	
<i>nifH</i>	Proteína Fe de la nitrogenasa.
<i>nifD</i>	Subunidad α de la proteína MoFe de la nitrogenasa.
<i>nifK</i>	Subunidad β de la proteína MoFe de la nitrogenasa.
<i>nifE</i>	Involucrada en la biosíntesis del cofactor FeMo.
<i>nifN</i>	Involucrada en la biosíntesis del cofactor FeMo.
<i>nifB</i>	Involucrada en la biosíntesis del cofactor FeMo.
<i>nifS</i>	Activación del azúfre para la síntesis del metalocluster?.
<i>nifW</i>	Función desconocida; requerida para la actividad completa de la proteína FeMo.
<i>nifX</i>	Función desconocida.
<i>nifA</i>	Regulador positivo de los genes <i>nif</i> , <i>fix</i> y otros.
Genes <i>fix</i>	
<i>fixABCX</i>	Función desconocida, requeridos para actividad de la nitrogenasa; FixX muestra similitud a ferredoxinas.

<i>fixNOQP</i>	Inducidos en microaerobiosis, citocromo oxidasa membranal.
<i>fixGHIS</i>	Proteínas transmembranales; posiblemente involucradas en el proceso de oxidoreducción acoplado al bombeo de cationes.
<i>fixLJ</i>	Sistema regulatorio de dos componentes que responde a oxígeno. Involucradas en el control positivo de <i>fixK</i> (Rm, Bj, Ac) y <i>nifA</i> (Rm).
<i>fixK/fixK₂</i>	Regulador positivo de <i>fixNOQP</i> (Rm, Bj, Ac), <i>nifA</i> (Ac), <i>rpoN₁</i> y "respiración" por nitrato (Bj); regulador negativo de <i>nifA</i> y <i>fixK</i> (Rm).
Rm <i>fixK'</i>	Copia reiterada funcional.
Bj <i>fixK₁</i>	Homologo a <i>fixK</i> con función desconocida; no esencial para fijación de nitrógeno.
Bj <i>fixR</i>	Función desconocida; no esencial para fijación de nitrógeno.
Ac <i>nfrA</i>	Regulación de <i>nifA</i> .

Información tomada de Fischer, (1994)

Abreviaturas: Rm, *R. meliloti*; Bj, *B. japonicum*; Ac, *A. caulinodans*.

OBJETIVOS.

Como se ha descrito anteriormente, el establecimiento de una simbiosis efectiva requiere de la expresión regulada de muchos genes bacterianos. Es claro que el avance en el estudio de esta área es muy grande. El número de genes descritos que intervienen en el proceso es enorme, cerca de 60 genes; algunos de los mecanismos que operan en la regulación de su expresión han sido establecidos (Fischer, 1994; Schultze *et al.*, 1994; Van Rhijn y Vanderleyden, 1995). Sin embargo, desde mi punto de vista falta tener una visión más completa de la expresión residente en el plásmido simbiótico, por lo cual este proyecto fue planteado.

En *R. etli*, los datos actuales nos presentan una visión parcial del proceso, en la que son de llamar de atención los siguientes puntos:

- 1) La localización de genes relacionados con el proceso simbiótico, hasta el momento, sectorizan al pSim en dos regiones, una de las cuales sería dispensable durante el establecimiento de una simbiosis efectiva.
- 2) La existencia de reiteraciones funcionales de genes *nod D* y *nifHDK*, así como,
- 3) El hecho de que otros plásmidos diferentes al pSim participen en la efectividad de la fijación de nitrógeno.

Tradicionalmente, técnicas que incluyen mutagénesis al azar, clonación y secuenciación de regiones de interés y sus alrededores han sido comúnmente usadas para la identificación de genes involucrados en el proceso simbiótico

(Sanjuan *et al.*, 1993); sin embargo, estas estrategias presentan una limitante en el caso de la existencia de reiteraciones funcionales, vías alternativas y en el caso de genes con un papel auxiliar en la interacción simbiótica.

Entonces, es necesaria una mejor herramienta experimental para poder contestar preguntas tales como:

¿Cuántas de las regiones contenidas en el pSim son expresadas durante el proceso simbiótico?. ¿Cuánto del genoma de *R. etli* CFN42 está comprometido en la nodulación y fijación de nitrógeno?. ¿Cuáles son los reguladores que operan durante éste proceso?. ¿Cuál es la señal inductora de su expresión?

Nuestra estrategia está basada en la detección cuantitativa de regiones cuya transcripción es activada en diversas condiciones experimentales.

La comparación de los niveles de transcripción de diferentes regiones del genoma en *E. coli* (Chuang *et al.*, 1993), ha permitido la detección de genes que son inducidos o reprimidos bajo un estímulo dado. Para el caso específico de *Rhizobium*, el estudio global de la transcripción de regiones del genoma ha sido limitado. En *R. meliloti*, se hizo un monitoreo directo de los niveles de transcripción de un sector de 310 kb del pSim que incluye la región *nif* y *fix*. Estos estudios permitieron la localizar secuencias *fix* reiteradas, cuya inducción es independiente de *nifA* (David *et al.*, 1987). En *Bradyrhizobium japonicum* este tipo de estrategia se ha usado para el aislamiento de secuencias de DNA que son altamente transcritas en bacteriodes (Scott-Craig *et al.*, 1991). Finalmente, una estrategia

similar ha sido empleada recientemente para localizar regiones en el pSim de *Rhizobium* sp. NGR234, que responden a una inducción por flavonoides o exudados de planta (Fellay *et al.*, 1995).

La detección cuantitativa de regiones con transcripción activa bajo diversas condiciones experimentales y la existencia de un mapa físico del pSim de *R. etli* CFN42, nos permite identificar *loci* simbióticos putativos y obtener información sobre el proceso de inducción y regulación de su expresión.

Con el objeto de conocer las regiones del pSim cuya transcripción es activada en respuesta a condiciones ambientales, la expresión global del plásmido simbiótico de *R. etli* CFN42 fue analizada en respuesta a estímulos específicos:

- Inducción de la expresión de los genes bacterianos en los primeros estadios de la simbiosis en respuesta a flavonoides que se sabe son exudados por las raíces de la planta.
- Evaluación de la expresión génica de regiones del pSim de *R. etli* CFN42 en respuesta a condiciones de aerobiosis, microaerobiosis y simbiosis, tomando en cuenta que la expresión de los genes *nif* y *fix* es controlada por la concentración de oxígeno de la célula a través de la regulación de la actividad y la síntesis de NifA.
- Participación del gene *nifA*, como uno de los reguladores generales de la transcripción de los genes de fijación de nitrógeno.
- Evaluación del papel de los estímulos nutricionales sobre la expresión del pSim, en diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno.

Los resultados obtenidos son reportados en el artículo "Transcriptional activity of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* is affected by different environmental conditions".

Transcriptional activity of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* is affected by different environmental conditions

Lourdes Girard,¹ Brenda Valderrama,² Rafael Palacios,¹ David Romero¹ and Guillermo Dávila¹

Author for correspondence: Lourdes Girard. Tel: +52 75 175867. Fax: +52 75 175581.
e-mail: girard@cifn.unam.mx

Departamentos de Genética Molecular¹ and Ecología Molecular², Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos, Mexico

Global patterns of transcriptional activity of the symbiotic plasmid (pSym) of *Rhizobium etli* were studied under a variety of environmental conditions, including some relevant to the symbiotic process. ³²P-labelled single-stranded complementary DNAs synthesized from total RNA were used as hybridization probes against an ordered collection of cosmid clones that covered the whole pSym. Our results showed that, under aerobic conditions, discrete regions of the pSym are differentially transcribed depending on the carbon and nitrogen sources employed. In general, poor carbon or nitrogen sources allowed greater expression than rich ones. Time-course experiments with the *nod* gene inducer genistein led us to the identification of new regions responsive to this flavonoid. Widespread transcription was observed during microaerobiosis, but not under aerobic conditions, indicating that oxygen concentration is a major effector of transcriptional activity in the pSym. This response was reduced, but not suppressed, in a *nifA* mutant, indicating the location of regions whose transcription may depend on other oxygen-sensitive regulators. During symbiosis, almost the entire pSym was actively transcribed and the transcription pattern was similar to that observed during microaerobiosis. The experimental approach described allowed the identification and localization of specific regions in the pSym whose expression depends on defined environmental stimuli.

Keywords: *Rhizobium etli*, symbiotic plasmid, pSym, nodulation, transcription

INTRODUCTION

In *Rhizobium* species, more than fifty different genes that participate in nodulation and nitrogen fixation have been identified (Fischer, 1994; Schultze *et al.*, 1994; Van Rhijn & Vanderleyden, 1995). Current research is mostly devoted to clarifying the role of specific genes in definite steps of the *Rhizobium*–legume interaction (Carlson *et al.*, 1994; Schultze *et al.*, 1994). In several *Rhizobium* species, most of these genes are clustered in a sector of a single large plasmid, the so-called symbiotic plasmid or pSym. Complete physical maps of the pSyms of some *Rhizobium* species have been published (Girard *et al.*, 1991; Perret *et al.*, 1991); genes involved in the symbiotic process cover

a relatively small zone of these megaplasmids. It is commonly assumed that some of the remaining genetic information is required for stable maintenance of the plasmid, or that it participates in other, as yet undescribed, processes.

The identification of many symbiotic genes has been achieved mainly through loss of function approaches, such as random transposon mutagenesis and/or gene fusion techniques. Cloning and sequencing of interesting regions and their surroundings has been useful, due to the observed clustering of genes involved in the symbiotic process (Sanjuan *et al.*, 1993). However, application of these approaches to the identification of regions responding to different environmental stimuli usually requires new mutant hunts or extensive sequencing efforts. Moreover, these strategies usually do not detect genes with a leaky phenotype when mutated. This situation may arise

Abbreviation: ³²P-sscDNA, ³²P-labelled single-stranded complementary DNA.

either when active reiterations (a common situation in *Rhizobium* species) or alternative pathways occur. These strategies may also fail to detect genes with an ancillary, albeit important, role in the symbiotic interaction. These limitations probably result in an underestimation of the actual number of genes participating in bacteria-plant interactions.

A global approach for the detection of transcriptional activity under specific conditions offers an alternative to circumvent the above problems. This strategy relies on the quantitative detection of regions undergoing active transcription under diverse experimental conditions. Application of this strategy to sectors of the genome where a comprehensive map is available allows a positional evaluation of gene activity in response to the stimulus to be tested (Chuang *et al.*, 1993). A similar approach was recently employed on the pSym of *Rhizobium* sp. NGR234 (Fellay *et al.*, 1995) to identify regions whose expression is enhanced by plant root exudates or specific flavonoids.

The use of this technique, coupled with the existence of a complete map of the pSym of *Rhizobium etli* (Girard *et al.*, 1991), allows us to evaluate the extent of transcriptional activity under different conditions. In this work, we report quantitative maps of gene expression in the pSym in response to growth on several carbon and nitrogen sources, flavonoid induction and microaerobic conditions, and during symbiosis.

METHODS

Bacterial strains, plasmids and media. The bacterial strains and plasmids used are listed in Table 1. *Rhizobium* strains were grown at 30 °C in PY rich medium (Noel *et al.*, 1984) or in Y minimal medium with different carbon and nitrogen sources, each at a concentration of 10 mM (Bravo & Mora, 1988). Carbon sources were sodium succinate, glucose or glycerol; nitrogen sources were ammonium chloride, potassium nitrate, sodium glutamate or glutamine. *Escherichia coli* strains were grown at 37 °C in LB medium (Miller, 1972). Antibiotics were added at the following concentrations: chloramphenicol (Cm), 25 µg ml⁻¹ (*E. coli*) or 10 µg ml⁻¹ (*R. etli*); kanamycin (Km), 30 µg ml⁻¹ (*R. etli*); nalidixic acid (Nal), 20 µg ml⁻¹ (*R. etli*); spectinomycin (Sp), 50 µg ml⁻¹ (*E. coli* or *R. etli*); tetracycline, 10 µg ml⁻¹ (*E. coli*) or 5 µg ml⁻¹ (*R. etli*).

Genetic manipulations. Plasmid pGC479 is a pSUP202 derivative (Simon *et al.*, 1983) that carries a 2170 bp *Hind*III fragment containing the *nifA* gene of *R. etli* CFN42 (GenBank accession no. U31630). As a first step in the generation of a mutation in the *nifA* gene from *R. etli*, a 394 bp fragment from *nifA* (position 1165-1559) was excised from pGC479 by digestion with *Eco*RI. A 2.0 kb Ω Sp/Sm (Prentki & Krisch, 1984) cassette was then ligated in its place, thus generating pGC480. Double recombinants carrying the *nifA*_Δ: Ω Sp/Sm allele in *R. etli* were obtained by standard genetic procedures (Martínez *et al.*, 1990). This replacement was confirmed by Southern hybridization (Ausubel *et al.*, 1987) using the *nifA* gene of *R. etli* as a probe, and also by plant tests in which this strain was completely ineffective for nitrogen fixation. The resulting *nifA* mutant strain was designated CFNX247.

Construction of a strain lacking the pSym but harbouring the wild-type *nifA* gene on a replicating plasmid was done as

follows. The strain CFNX248 was constructed by a triparental mating using *R. etli* CFNX89 as the recipient and HB101/pNC206 (Table 1) as cointegrative plasmid for HB101/pGC479; cointegration between these plasmids occurred through recombination among ampicillin resistance genes shared by these plasmids. The derivatives were selected as Nal^r Cm^r Km^r transconjugants. They were analysed by Southern blot hybridization and plasmid profiles (Eckhardt, 1978).

Growth conditions. Cultures were grown to mid-exponential phase in PY medium. Cells were collected by centrifugation (at 6000 g in a Sorvall SS34 rotor), washed with sterile minimal medium and concentrated 100-fold. Fresh Y minimal medium containing the desired carbon and nitrogen sources was inoculated with these suspensions at an initial OD₅₄₀ of 0.05. For growth under microaerobic conditions, sodium succinate and ammonium chloride were used as carbon and nitrogen sources, respectively. Twenty milliliters of these cultures were incubated either in 150 ml bottles closed with a cotton stopper (aerobic conditions), or in 150 ml bottles closed with an airtight stopper and previously flushed with several volumes of an oxygen/argon (1:99, v/v) mixture (microaerobic conditions). Both types of cultures were grown with shaking (200 r.p.m.) for 8 h at 30 °C. Cells were then collected by centrifugation (6000 g) at 4 °C and pellets were stored at -70 °C until RNA isolation.

Genistein induction. Cultures grown for 1 d on PY agar plates were used to inoculate a minimal medium with the following composition: sucrose, 5 mM; KNO₃, 1 mM; K₂HPO₄, 1 mM; KH₂PO₄, 7 mM; MgSO₄, 1 mM; NaCl, 2 mM; CaCl₂, 0.1 mM; biotin, 0.4 mM; ferric citrate, 0.2 mM; H₃BO₃, 46 µM; MnSO₄, 9 µM; ZnSO₄, 0.076 µM; CuSO₄, 0.3 µM; Na₂MoO₄, 0.4 µM. Cultures were inoculated at an initial OD₆₀₀ of 0.1 and grown with shaking (200 r.p.m.) for 4 h at 30 °C. Genistein was then added at a final concentration of 1.2 µM, with further incubation for 1, 4, 8 or 24 h. Control cultures were treated similarly, but without genistein addition. At the appropriate times, samples were withdrawn and cells were collected by centrifugation (6000 g) at 4 °C and pellets were stored at -70 °C until RNA isolation. To verify the production of nodulation factors, parallel 1 ml cultures were labelled 3 h after genistein addition with 0.2 µCi (7.4 kBq) D-[1-¹⁴C]glucosamine, and grown for 12 h. Culture supernatants were analysed by thin-layer chromatography as described previously (Mendoza *et al.*, 1995).

Plant growth. Surface-sterilized *Phaseolus vulgaris* cv. Negro Jamapa seeds (kindly provided by PRONASE) were germinated under sterile conditions in trays containing vermiculite. After 3 d at 30 °C, the seedlings were transferred to 1 l plastic pots filled with sterile vermiculite and inoculated with 1 ml of an overnight culture (in PY medium) of *R. etli* CFN42. Plants were grown in a greenhouse and watered periodically with a N-free nutrient solution (Vincent, 1970) as previously described (Romero *et al.*, 1988). After 25 d, nodules were picked out from the roots, washed briefly with diethyl-pyrocyanate-treated water and surface-sterilized. They were then immediately frozen in a dry-ice-ethanol bath and stored at -20 °C until further use.

Bacteroid purification. Bacteroids were purified from root nodules (3 g, fresh wt), obtained as described above, by centrifugation through self-generated Percoll gradients (Reibach *et al.*, 1981). Purified bacteroids were utilized immediately for RNA purification.

RNA purification. Total RNA extraction from purified bacteroids and from cells grown under aerobic or microaerobic conditions was done by the acid phenol procedure, employing a commercial kit (RNAid kit, BIO101). RNA was quantified by absorbance measurements and electrophoresed under de-

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant properties	Source or reference
Strain		
<i>Rhizobium etli</i>		
CFN42	Wild-type strain	Quinto <i>et al.</i> (1985)
CFNX89	CFN42 derivative lacking the pSym	Brom <i>et al.</i> (1992)
CFNX247	CFN42 derivative carrying the <i>nifA_Δ::ΩSp/Sm</i> allele	This work
CFNX248	CFNX89 derivative carrying a cointegrate plasmid pNC206/pGC479 (<i>nifA</i> ⁺)	This work
<i>Escherichia coli</i>		
HB101	Host for recombinant plasmids	Boyer & Roulland-Dussoix (1969)
Plasmids		
pSUP202	Suicide vector, Ap ^r Cm ^r Tc ^r	Simon <i>et al.</i> (1983)
pNC206	A deleted RP4 derivative, Ap ^r Km ^r , self-replicating in <i>Rhizobium</i> spp.	A. Pühler, Universität Bielefeld, Germany.
pRK2013	Conjugation helper	Figurski & Helinski (1979)
pGC479	A pSUP202 derivative carrying the wild-type <i>nifA</i> gene	This work
pGC480	A pGC479 derivative carrying the <i>nifA_Δ::ΩSp/Sm</i> allele	This work
cGD collection	Ordered cosmid collection from the pSym of <i>R. etli</i> CFN42	Girard <i>et al.</i> (1991)

naturing conditions in agarose-formaldehyde gels (Ausubel *et al.*, 1987).

Synthesis of total ³²P-labelled single-stranded complementary DNA (³²P-sscDNA). This was done by the random hexamer priming method (Sambrook *et al.*, 1989). The reaction mixture contained 1 µg total RNA; 0.3 µg of a random hexanucleotide (Amersham); 0.5 mM dGTP, dATP and dTTP; 5 µM dCTP; 80 µCi [α -³²P]dCTP [6000 Ci mmol⁻¹ (222 TBq mmol⁻¹)]; 20 units placental ribonuclease inhibitor (Gibco BRL); 5 mM DTT; 400 units M-MLV Reverse Transcriptase (Gibco BRL) in the presence of first strand buffer (Gibco BRL); in a total volume of 30 µl. The reaction mixture was incubated for 90 min at 37 °C. To hydrolyse the RNA templates, EDTA, SDS and NaOH were added at final concentrations of 50 mM, 0.4% and 0.36 M, respectively, and the mixture was incubated for 30 min at 68 °C. For neutralization, Tris buffer (pH 7.4) and HCl were then added at final concentrations of 0.33 M and 0.2 M, respectively. Samples were precipitated with ethanol in the presence of tRNA as carrier, resuspended in 0.1 M NaOH and used as hybridization probes (A. Garay, personal communication).

Hybridization conditions and data analysis. Equal amounts of the cosmids that cover the whole pSym of *R. etli* CFN42 (quantified spectrophotometrically) were digested with *Bam*HI, electrophoresed in 1% (w/v) agarose gels and transferred to Nylon membranes (Hybond-N+, Amersham) (Ausubel *et al.*, 1987). DNA blots were hybridized in a solution containing 50% (v/v) formamide as described previously (Girard *et al.*, 1991). Hybridization signals were integrated by scanning the autoradiographs with a GS300 scanning densitometer using the GS-365W data system (Hoefer Scientific Instruments), taking care that measurements were within the linear range of the film.

RESULTS

Experimental design

In order to study the global transcriptional patterns of the pSym of *R. etli* CFN42 under different conditions, we took advantage of the physical map of this plasmid, previously established in our laboratory. This map was assembled from an ordered cosmid collection, comprising 85 *Bam*HI fragments, which are numbered consecutively on the circular map from an arbitrary start in the *nifHDK* region a (Girard *et al.*, 1991). Hybridization with probes representing the total RNA population from different conditions against the whole cosmid set allows us to determine the extent and localization of transcriptional activity on the pSym. To this end, total RNA was isolated from cultures grown under different conditions and from bacteroids (see Methods). These RNAs were used as templates for the synthesis of ³²P-sscDNAs, which were then employed as probes in hybridization experiments against the whole cosmid collection. In these experiments, signal intensity in the autoradiographs was taken as a measure of the relative abundance of the mRNA corresponding to a certain region, i.e. its degree of expression. Pairwise comparison between treatments allowed the determination of induction or repression ratios, which are defined as the quotient between the conditions to be compared. To make valid comparisons between the different data sets, densitometric scannings were normalized according to the total radioactivity in the probes, exposure time and amount of cosmid DNA loaded in the

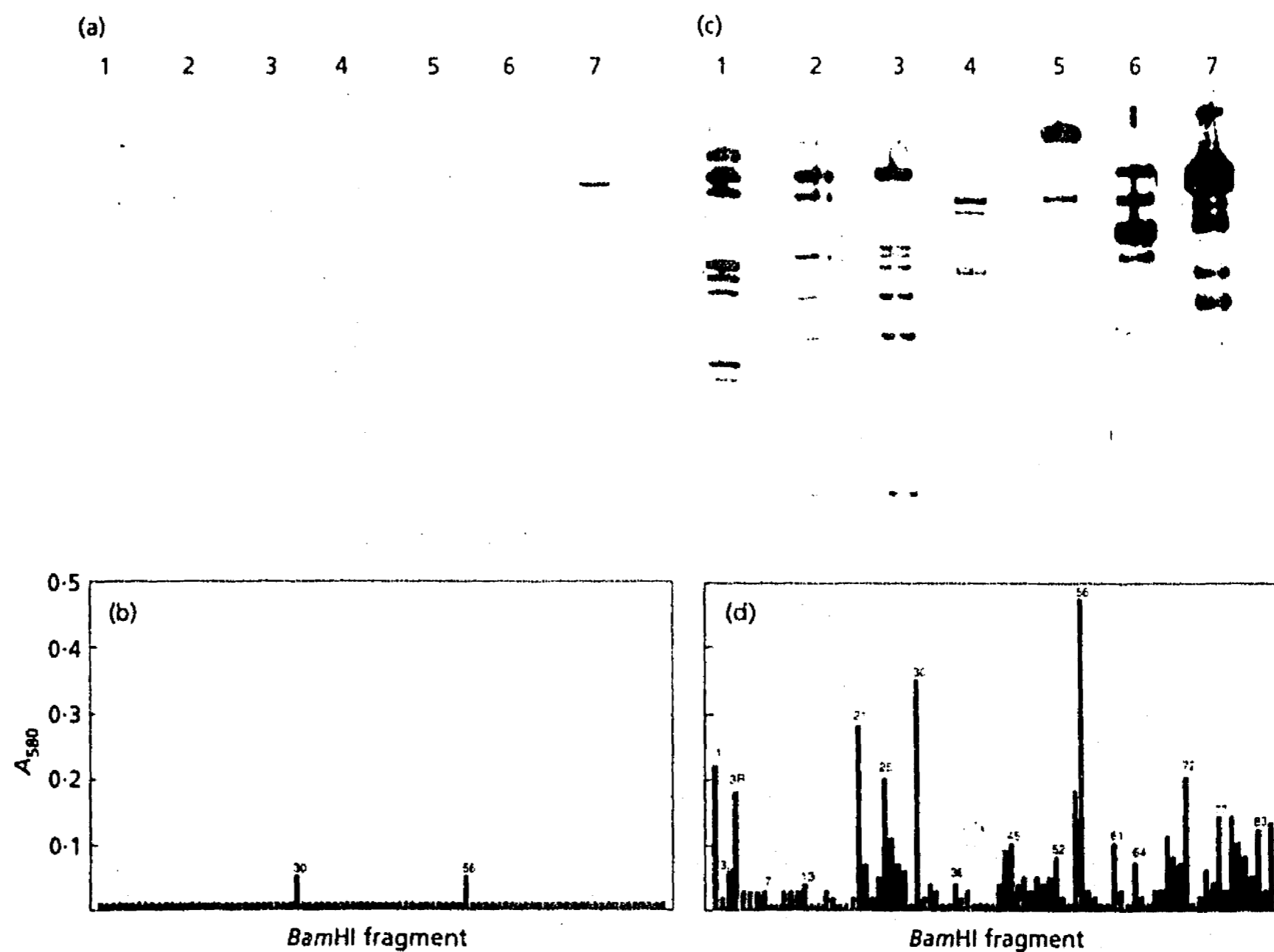


Fig. 1. Detection of transcriptional patterns of the *R. etli* pSym and their quantification. The patterns were obtained using as probes ^{32}P -sscDNAs from strain CFN42 grown in succinate-ammonium medium under aerobic (a, b) or microaerobic (c, d) conditions. (a, c) Southern blot hybridizations of a set of cosmid clones from the pSym digested with *Bam*HI. Lanes: 1, cGD7 (bands 80-2); 2, cGD102 (bands 1-7); 3, cGD101 (bands 3-12); 4, cGD28 (bands 9-21); 5, cGD15 (bands 20-24); 6, cGD35 (bands 21-26); 7, cGD45 (bands 24-31). (b, d) Results of densitometric integration of hybridization signals for the whole pSym. Bar numbers indicate the position of specific fragments on the map (Fig. 3a).

gels, as described in Methods. An example of this type of analysis is shown in Fig. 1.

This experimental design assumes that the signals observed are due to transcription of sequences in the pSym, which are specifically detected through high-stringency hybridization against our cosmid collection. Although this is a reasonable assumption, reiteration of some potentially transcribable regions occurs in other replicons in the cell (Girard *et al.*, 1991). To exclude the possibility that detectable transcription originated from these reiterated regions, RNA was isolated from microaerobic cultures of strain CFNX248. This strain lacks the pSym but carries an active *nifA* gene on an autonomous, self-replicating plasmid (see Methods). Microaerobic conditions in the wild-type strain provoked a widespread, *nifA*-dependent transcription in the pSym (see below). If detectable transcription originated from reiterated DNA, hybridization signals should be observed with a probe made using microaerobically-grown CFNX248. No hybridization signals were observed with ^{32}P -sscDNA synthesized from this strain (data not shown). Thus, the

transcriptional activity detected in our experiments originated from sequences on the pSym, and not from reiterations located elsewhere in the genome.

Carbon and nitrogen sources modulate transcriptional activity in the pSym

To evaluate the role of nutritional stimuli on pSym expression under aerobic conditions, transcript levels were analysed after growth in a variety of carbon and nitrogen sources. As shown in Fig. 1(a), growth of the wild-type strain in a C- and N-rich medium (succinate plus ammonium) was very restrictive in terms of transcriptional activity. Only two regions (bands 30 and 56) were expressed at a detectable level, while the rest of the plasmid was not expressed. This profile was taken as the baseline expression pattern of the pSym. To discern between effects caused by different N or C sources, media containing succinate and glutamine, glutamate or KNO_3 were used. For comparison of the effects between the different treatments, expression values obtained in any given treatment were divided by the corresponding values

maintained under the baseline condition (succinate plus ammonium), thus deriving induction ratios. Growth on glutamine (Fig. 2a) led to higher induction than ammonium. In contrast, growth on a moderate (glutamate, Fig. 2b) or poor (KNO_3 , Fig. 2c) nitrogen source provoked a gradual increase in induction ratios. Growth on KNO_3 led to the activation of 16 regions, with induction ratios ranging from 2.5 to 7.3. Growth on medium containing ammonium and glucose (Fig. 2d) or glycerol (Fig. 2e) as alternative carbon sources promoted higher transcriptional activity than succinate, leading to the activation of 10 regions at induction ratios ranging from 2.5 to 9.6. Thus, transcriptional activity in the pSym is modified by the type of nitrogen and carbon sources employed.

Temporal order of pSym expression in response to flavonoid induction

Flavonoid compounds are components of root exudates which are important mediators in the chemical communication between bacteria and leguminous plants. Flavonoids are responsible for the induction of genes involved in the nodulation process, but it has been suggested that they are also involved in other steps of the symbiotic interaction, such as competitiveness (Bhagwat & Sester, 1992; Sadowsky *et al.*, 1988). To identify the extent and location of pSym regions induced by the isoflavone genistein, cultures were grown in sucrose- KNO_3 minimal medium (see Methods) and expression values were obtained at different times after genistein addition. As a control, expression values were obtained from parallel cultures treated similarly, but without added genistein. Induction or repression ratios are expressed as the quotient of the values obtained in the presence vs the absence of genistein. Four different regions, differing in temporal order after induction, could be recognized (Fig. 2f-i). Members of region I, spanning bands 1-11, showed an early pattern of induction. Expression was detectable 1 h after genistein addition, achieving maximal levels 24 h after the onset of the induction period. In contrast, regions II-IV (bands 22-26; 43-51 and 80-85, respectively) were clearly induced only after 24 h. Under our conditions, production of Nod factors was detectable at 24 h after induction (data not shown). All the nodulation genes so far identified in *R. etli* are contained in region I and in part of region IV (see Fig. 3a and Discussion); however, regions II and III mark the location of new, isoflavone-induced sectors that might be involved in nodulation or other flavonoid-controlled processes.

Transcriptional activity of the pSym is regulated by oxygen concentration

Oxygen limitation is an important metabolic effector of the expression of many genes involved in nitrogen fixation. The effect of this environmental variable was explored by growing the wild-type strain in a medium containing succinate and ammonium, under both aerobic and microaerobic conditions (see Methods). Extensive expression of

genes borne by the pSym was observed under microaerobic conditions: 67 out of 85 *Bam*HI bands were expressed (Fig. 1b). This is more clearly seen when induction ratios (microaerobic vs aerobic levels) are considered. As shown in Fig. 2j, oxygen limitation provokes widespread induction of expression in the pSym, with ratios ranging from 2 to 28. Transcription of most of the *nif* and *fix* genes in *Rhizobium* is dependent on the *nifA* gene product, under both microaerobic and symbiotic conditions (Fischer, 1994). A comparison of the induction ratios achieved under microaerobic conditions in the wild-type strain (Fig. 2j) and in the *nifA* mutant strain (Fig. 2k) allowed us to classify the different pSym regions according to their degree of dependency on the *nifA* gene product. Thirty-seven fragments showed an absolute dependency for this gene, i.e. they were expressed in the wild-type strain but not in the *nifA* mutant strain. Twenty-nine fragments showed lower induction ratios in the *nifA* mutant strain, suggesting a partial dependency for this transcriptional activator. The extent of this dependency varied widely, since the induction ratios ranged from 1.2 to values 10-fold larger in the wild-type as compared to the mutant strain.

These results indicate that (i) oxygen limitation leads to a dramatic induction in the transcriptional activity of the pSym, and (ii) that the NifA transcriptional activator partially controls this response.

General transcriptional activity of the pSym during symbiosis

The transcription pattern of the pSym during symbiosis was only studied in the wild-type strain, due to the low recovery of bacteroids from nodules induced by the *nifA* mutant. To this end, ^{32}P -sscDNA was synthesized from total bacteroid RNA of the wild-type strain. This ^{32}P -sscDNA was then used as a probe. Under symbiotic conditions, almost all the plasmid was actively transcribed. In fact, the absolute transcriptional levels during this stage were the highest among the conditions tested. As shown in Fig. 2(l), induction ratios during symbiosis vs aerobic conditions (succinate plus ammonium) may be as high as 46-fold. Two contiguous regions in the pSym, spanning fragments 80-85 and 1-29, contain most of the fragments with a high induction during symbiosis (Fig. 2l); many of the symbiotic genes detected in this organism are located here (see Discussion).

The induction ratios observed during symbiosis (Fig. 2l) are qualitatively similar to the ones seen during microaerobiosis (Fig. 2j). To further explore the observed similarity in transcription patterns, data were plotted as the quotient of the values during symbiosis vs microaerobiosis. As shown in Fig. 2(m), 41 fragments of the pSym were induced during symbiosis at levels well above the ones observed under low oxygen conditions. Fourteen fragments were expressed at the same level in both conditions; fifteen fragments that showed expression under low oxygen tensions were repressed in bacteroids.

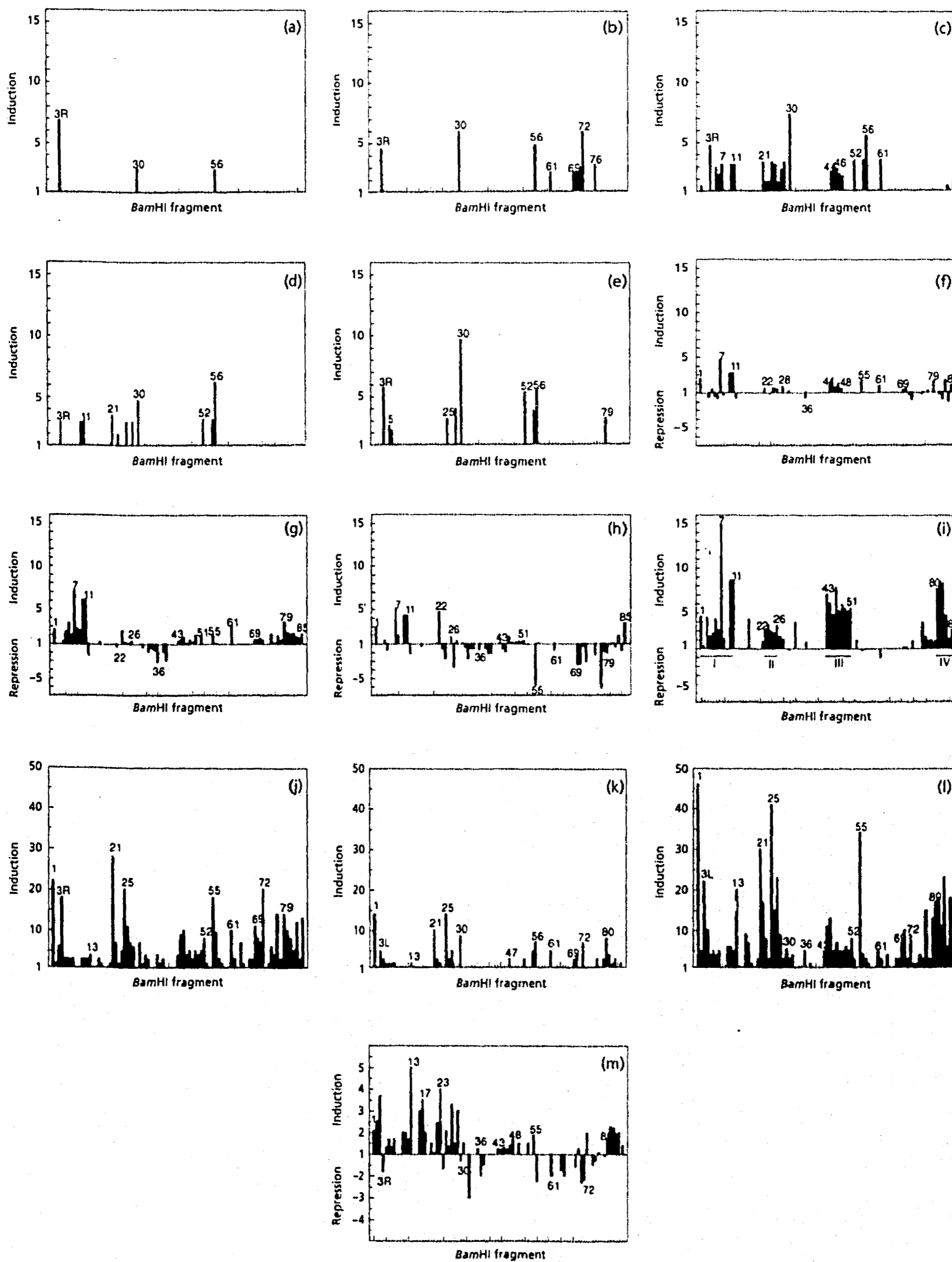


Fig. 2. For legend see facing page.

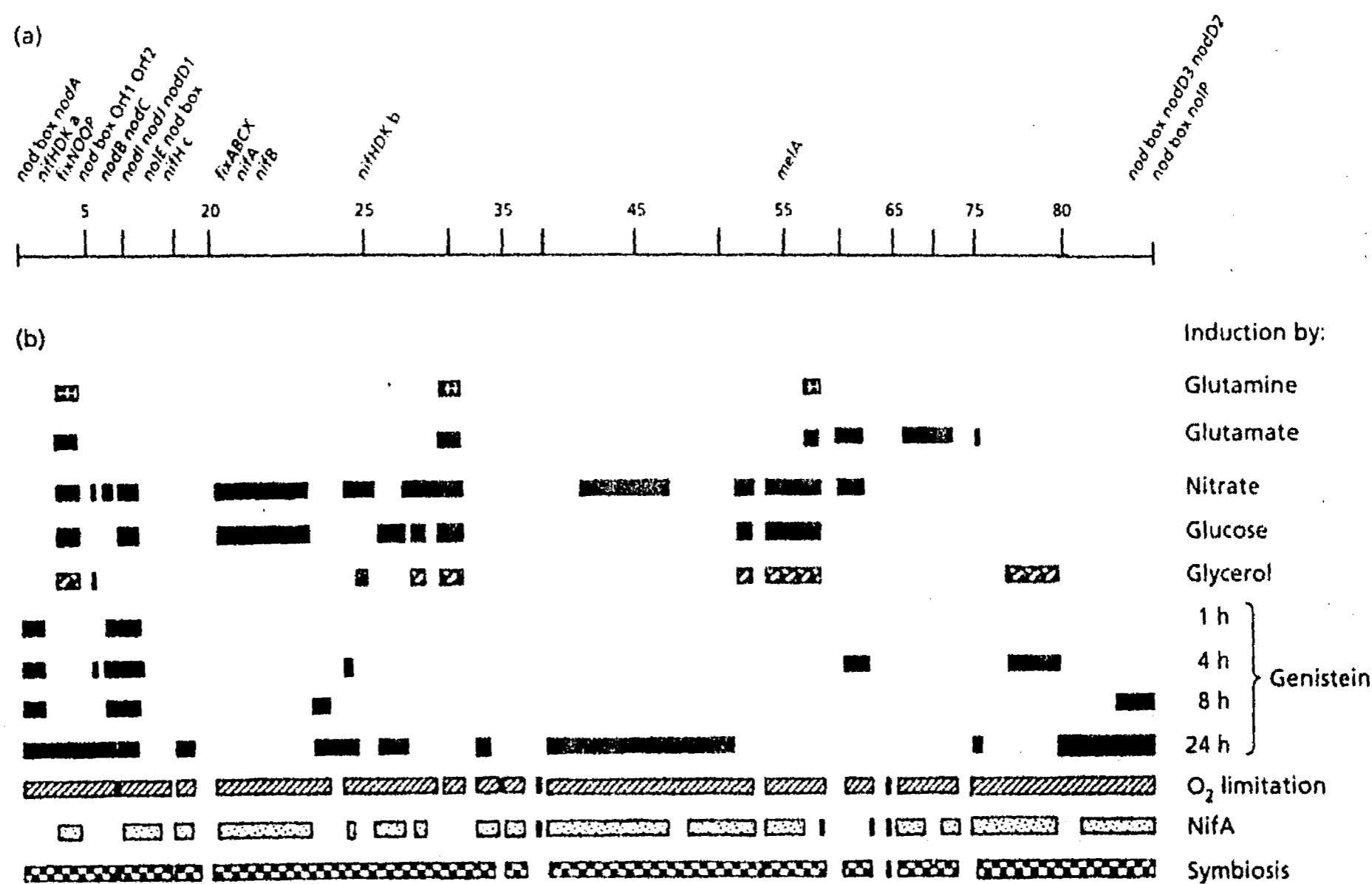


Fig. 3. Transcriptional activity in the *R. etli* pSym. (a) Linear *Bam*HI map of the 390 kb pSym of *R. etli* CFN42, indicating the location of specific symbiotic genes. The location of these genes was compiled from data given by Girard *et al.* (1991); Vázquez *et al.* (1991, 1993); and our own unpublished results. Exact locations for specific genes are: *nod box*, *nodA* and *nifHDK a* (band 1); *fixNO* (band 3); *fixOP* (band 4); *nod box*, ORF 1-2 and *nodB* (band 7); *nodC* (band 8); *nodJ* (band 10); *nodD1* (bands 10-11); *nolE* (band 11); *nifH c* (band 13); *fixABCX*, *nifA* and *nifB* (band 21); *nifHDK b* (band 25); *melA* (bands 55-56); *nod box*, *nodD3*, *nodD2*, *nod box* and *nolP* (band 85). Numbers indicate the corresponding *Bam*HI fragments. (b) Extent of transcriptional activity under each environmental condition tested. In this figure, only bands that showed an induction ratio over 2.5 were considered.

DISCUSSION

How many regions in a symbiotic plasmid are actively expressed during symbiosis? How much of this information is regulated by other physiological stimuli? In this paper we approached these questions through the determination of the global transcription patterns in the pSym. Our analyses were greatly aided by a sensitive technique that allows the quantitative detection of the transcriptional activity in specific genomic regions (Chuang *et al.*, 1993). The validity of this approach is supported by the fact that the transcriptional activity detected originates from the pSym (see Results).

Two limitations need to be considered to analyse these

experiments. First, it is not generally possible to equate transcriptional activity of a region with the activity of single genes due to the possibility that a region may contain several transcriptional units. A second limitation is that if transcripts are generated from a multigene family located exclusively in the same replicon (such as the *nifHDK* reiterations in the pSym), the total transcriptional activity detected may be due to any or all the members of the family. Nevertheless, this approach is valuable for the identification and localization of regions which respond to defined environmental stimuli.

Fig. 3 shows a correlation between the quantitative maps of transcriptional activity obtained in this work and the

Fig. 2. Comparison of the levels of induction in the *R. etli* pSym under different conditions. For each fragment, induction ratios were calculated as a quotient of absolute transcript levels (Fig. 1) between the conditions to be compared. For repression, the reciprocal of the induction ratios were plotted. For these comparisons, a value corresponding to the minimal detection level (A_{580} 0.01) was assigned to unexpressed regions. (a-e) Induction by glutamine (a), glutamate (b), nitrate (c), glucose (d) and glycerol (e) compared with the wild-type strain grown in succinate-ammonium medium under aerobic conditions. (f-i) Induction by genistein at 1 h (f), 4 h (g), 8 h (h) and 24 h (i) after addition compared with the corresponding control without genistein addition. (j, k) Microaerobic induction in the wild-type strain (j) and in the *nifA* mutant strain (k) compared with the wild-type strain grown under aerobic conditions. (l, m) Symbiotic induction in the wild-type strain compared to the wild-type strain grown under aerobic (l) or microaerobic (m) conditions. Bar numbers indicate the position of specific regions on the map (Fig. 3a).

location of specific genes on the pSym. It is noteworthy that physiological signals, such as the type of the carbon and nitrogen sources, exert significant control on the transcriptional activity of the pSym (Fig. 3b). In general, poorly utilized carbon or nitrogen sources allow a greater expression than rich ones. The expressed regions appear to be dispensable, since curing of the pSym does not affect growth rates under these conditions. *Ex planta* expression of some symbiotic genes in other *Rhizobium* species, such as *nodD3* (Dusha & Kondorosi, 1993), *nifHDK* and *fixABCX* (Szeto *et al.*, 1987), is affected by the nitrogen source. In fact, it has been proposed that nitrogen status may control nodulation by *R. etli* via the *ntrC* gene product (Mendoza *et al.*, 1995). Although the expression of some fragments under C- or N-limited conditions might be explained by correspondence with known symbiotic genes, many of these fragments map in zones of the pSym lacking identifiable *nod* or *fix* genes. The functional status of these fragments is still uncertain, but they represent N- and C-controlled regions that might be relevant for either saprophytic or symbiotic life-styles.

Four different regions were actively transcribed after induction with the isoflavone genistein. One of these (region I, Fig. 2i) contains most of the nodulation genes identified in *R. etli* (Fig. 3a). Complementation of a pSym-cured strain with a cosmid clone containing region I leads to nodule formation (Cevallos *et al.*, 1989); thus, this region is sufficient for nodulation. Region I shows an early pattern of expression, detectable 1 h after induction and achieves maximal levels after 24 h. These data are in agreement with experiments employing transcriptional fusions with members of region I, such as *nodA* and *nodBC*, where high-level expression was observed after 24 h (Vázquez *et al.*, 1991). All the new regions identified (regions II–IV, Fig. 2i) show a late pattern of inducibility, suggesting that these regions might be important in other flavonoid-influenced processes, such as efficiency of nodulation (Schultze *et al.*, 1994), competitiveness (Bhagwat & Keister, 1992; Sadowsky *et al.*, 1988), chemotaxis (Aguilar *et al.*, 1988) or resistance to plant phytoalexins (Parniske *et al.*, 1991).

A similar approach was recently employed with the pSym of *Rhizobium* sp. NGR234 (Fellay *et al.*, 1995). Although the spatial order of equivalent zones is different from the pSym of CFN42, four flavonoid-inducible regions were also observed. Three of these were induced only late after flavonoid addition. Contrasting with our data, a locus similar to our region I (containing *nodABC* and other host-specificity genes) was expressed only shortly after flavonoid induction. This region becomes transcriptionally silent late after induction. Thus, both the topological arrangement and the temporal order of expression of equivalent zones may vary depending on the bacterial host.

It is commonly thought that the pattern of expression of nitrogen fixation genes under microaerobic conditions resembles the pattern observed during endosymbiotic stages. In fact, it has been recently proposed that oxygen limitation is a key determinant of the symbiotic pattern of

nitrogen fixation gene expression in alfalfa nodules (Soupène *et al.*, 1995). Our results show that oxygen concentration is one of the main effectors for induction of transcriptional activity in the pSym. Contrasting with the low expression of the pSym under most aerobic conditions, microaerobic status leads to a dramatic increase in the expression level for most of the fragments (Fig. 3b). Some of the induced fragments correspond to sectors that contain different *nif* and *fix* genes (for instance, both fragments 1 and 25 contain *nifHDK* operons, fragment 21 contains *fixABCX* and *nifA* genes, Fig. 3a). However, functions encoded in many of the induced fragments are still unknown.

It is important to note that this microaerobic induction is dependent, either partially or totally, on the presence of an active *nifA* gene (Fig. 2k). This dependency suggests that many induced fragments might have a role, either essential or ancillary, during the symbiotic process. Nevertheless, a detectable fraction of transcriptional activity in this condition is independent of *nifA*. It is possible that the remaining activity might be dependent on other oxygen-sensitive regulators, such as *fixK* (Fischer, 1994).

Symbiotic conditions gave the highest induction in the pSym. Our results show that most of the plasmid regions are expressed during symbiosis (Fig. 3b). Two contiguous regions account for most of the highly expressed fragments in this condition. Although some symbiotic genes, such as *nifHDK*, *fixABCX* and *nifA*, have been located in these fragments, the function of the others (Fig. 3a) is largely unknown.

Considering the level of expression of these regions, it is plausible to think that they may be particularly relevant for symbiosis. In support of this, deletions that remove a sector comprising fragments 1–25 lead to an inability to nodulate (Romero *et al.*, 1991). In contrast, deletions that affect fragments 30–81 are still able to nodulate and to fix nitrogen (unpublished data). The only other highly expressed region in the pSym is fragment 55, which apparently contains the *melA* gene (unpublished data); this gene is expressed during both microaerobic and symbiotic stages (Hawkins & Johnston, 1988).

Although our data are consistent with the role of oxygen as one of the main effectors of symbiotic expression, some discrepancies still remain. Our data for the symbiotic induction pattern resemble, but are not identical to, the microaerobic induction pattern. A comparison of both conditions (Fig. 2m), revealed that induction ratios were the same (i.e. close to one) for only fourteen expressed fragments. The rest of the fragments were either more induced or even repressed during symbiosis.

Microaerobic cultures similar to the ones we employed are commonly used to evaluate the level of expression of known symbiotic genes *in vitro*. Our comparisons are useful to evaluate the agreement between these conditions. Although there is a good qualitative agreement, there are important differences. It is now well established that the O₂ concentration in the infected nodule tissue is about 50 nM (Kuzma *et al.*, 1993). Although the actual

concentration of dissolved oxygen was not determined in our microaerobic cultures, calculations based on the published Ostwald coefficients for oxygen suggest that it was approximately 12 μ M. The simplest explanation for the observed differences between the microaerobic and symbiotic induction patterns is that they are solely due to differences in oxygen concentration. Another explanation is that there are other controls, superimposed on the one exerted by oxygen concentration, which act to determine the level of expression during symbiosis. Resolution of these alternatives must wait for quantitative determinations of expression levels under nanomolar oxygen concentrations.

Previous attempts to evaluate the global transcriptional activity of a pSym were restricted to some defined pSym sectors (David *et al.*, 1987) or to isolated highly expressed regions from genome banks (Scott-Craig *et al.*, 1991). However, a recent report from Fellay *et al.* (1995) evaluated the transcriptional activity of the whole pSym of *Rhizobium* sp. NGR234 under flavonoid or root exudate induction, employing an approach similar to the one described in this paper. Our data extend the usefulness of this approach, providing quantitative information on transcriptional activity on a different pSym under a variety of environmental conditions.

An additional application of this approach is in the evaluation of the effect of mutations in global transcriptional regulators, such as *nifA*. This type of analysis allows a rapid evaluation of the number and position of regions controlled by a complex regulatory circuit, either in a positive or a negative mode. We believe that the resolute power achieved through a quantitative global approach will make it extremely useful for the analysis of complex genomes.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to Susana Brom, Patrice Dion and Jaime Martínez-Salazar for critical reviewing of the manuscript; to Adriana Garay (Instituto de Biotecnología, UNAM) for help with cDNA synthesis; and to Sergio Caro, Laura Cervantes and María de la Paz Salas for skilful technical assistance.

REFERENCES

- Aguilar, J. M. M., Ashby, A. M., Richards, A. J. M., Loake, G. A., Watson, M. D. & Shaw, C. H. (1988). Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* towards flavonoid inducers of the symbiotic nodulation genes. *J Gen Microbiol* 134, 2741-2746.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley.
- Bhagwat, A. A. & Keister, D. L. (1992). Identification and cloning of *Bradyrhizobium japonicum* genes expressed strain selectively in soil and rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* 58, 1490-1495.
- Boyer, H. W. & Roulland-Dussoix, D. (1969). A complementation analysis of restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 41, 459-472.
- Bravo, A. & Mora, J. (1988). Ammonium assimilation in *Rhizobium phaseoli* by the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway. *J Bacteriol* 170, 980-984.
- Brom, S., García de los Santos, A., Stepkowski, T., Flores, M., Dávila, G., Romero, D. & Palacios, R. (1992). Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* are required for optimal symbiotic performance. *J Bacteriol* 174, 5183-5189.
- Carlson, R. W., Price, N. P. J. & Stacey, G. (1994). The biosynthesis of rhizobial lipo-oligosaccharide nodulation signal molecules. *Mol Plant-Microb Interact* 7, 684-695.
- Cevallos, M. A., Vázquez, M., Dávalos, A., Espín, G., Sepúlveda, J. & Quinto, C. (1989). Characterization of *Rhizobium phaseoli* Sym plasmid regions involved in nodule morphogenesis and host-range specificity. *Mol Microbiol* 3, 879-889.
- Chuang, S., Daniels, D. L. & Blattner, F. R. (1993). Global regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 175, 2026-2036.
- David, M., Domergue, O., Pognonec, P. & Kahn, D. (1987). Transcription patterns of *Rhizobium meliloti* symbiotic plasmid pSym: identification of *nifA*-independent *fix* genes. *J Bacteriol* 169, 2239-2244.
- Dusha, I. & Kondorosi, A. (1993). Genes at different regulatory levels are required for the ammonia control of nodulation in *Rhizobium meliloti*. *Mol Gen Genet* 240, 435-444.
- Eckhardt, T. (1978). A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* 1, 584-588.
- Fellay, R., Perret, X., Viprey, V., Broughton, W. J. & Brenner, S. (1995). Organization of host-inducible transcripts on the symbiotic plasmid of *Rhizobium* sp. NGR234. *Mol Microbiol* 16, 657-667.
- Figurski, D. H. & Helinski, D. R. (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.
- Fischer, H.-M. (1994). Genetic regulation of nitrogen fixation in Rhizobia. *Microbiol Rev* 58, 352-386.
- Girard, M. L., Flores, M., Brom, S., Romero, D., Palacios, R. & Dávila, G. (1991). Structural complexity of the symbiotic plasmid of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. *J Bacteriol* 173, 2411-2419.
- Hawkins, F. K. L. & Johnston, A. W. B. (1988). Transcription of a *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* gene needed for melanin synthesis is activated by *nifA* of *Rhizobium* and *Klebsiella pneumoniae*. *Mol Microbiol* 2, 331-337.
- Kuzma, M. M., Hunt, S. & Layzell, D. B. (1993). Role of oxygen in the limitation and inhibition of nitrogenase activity and respiration rate in individual soybean nodules. *Plant Physiol* 101, 161-169.
- Martínez, E., Romero, D. & Palacios, R. (1990). The *Rhizobium* genome. *Crit Rev Plant Sci* 9, 59-93.
- Mendoza, A., Leija, A., Martínez-Romero, E., Hernández, G. & Mora, J. (1995). The enhancement of ammonium assimilation in *Rhizobium etli* prevents nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *Mol Plant-Microbe Interact* 8, 584-592.
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Noel, K. D., Sánchez, F., Fernández, L., Leemans, J. & Cevallos, M. A. (1984). *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. *J Bacteriol* 158, 148-155.
- Parniske, M., Ahlborn, B. & Werner, D. (1991). Isoflavonoid-inducible resistance to the phytoalexin glyceollin in soybean rhizobia. *J Bacteriol* 173, 3432-3439.
- Perret, X., Broughton, W. J. & Brenner, S. (1991). Canonical ordered cosmid library of the symbiotic plasmid of *Rhizobium* species NGR234. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 1923-1927.
- Prentki, P. & Krisch, H. M. (1984). *In vitro* insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* 29, 303-313.
- Quinto, C., de la Vega, H., Flores, M., Leemans, J., Cevallos, M. A.,

- Pardo, M. A., Azpiroz, R., Girard, M. L., Calva, E. & Palacios, R. (1985). Nitrogenase reductase: a functional multigene family in *Rhizobium phaseoli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 1170-1174.
- Reibach, P. H., Mask, P. L. & Streeter, J. G. (1981). A rapid one-step method for the isolation of bacteroids from root nodules of soybean plants, utilizing self-generating Percoll gradients. *Can J Microbiol* 27, 491-495.
- Romero, D., Singleton, P. W., Segovia, L., Morett, E., Bohlool, B. B., Palacios, R. & Dávila, G. (1988). Effect of naturally occurring *nif* reiterations on symbiotic effectiveness in *Rhizobium phaseoli*. *Appl Environ Microbiol* 54, 848-850.
- Romero, D., Brom, S., Martínez-Salazar, J., Girard, M. L., Palacios, R. & Dávila, G. (1991). Amplification and deletion of a *nod-nif* region in the symbiotic plasmid of *Rhizobium phaseoli*. *J Bacteriol* 173, 2435-2441.
- Sadowsky, M. J., Olson, E. R., Foster, V. E., Kossak, R. M. & Verma, D. P. S. (1988). Two host-inducible genes of *Rhizobium fredii* and characterization of the inducing compound. *J Bacteriol* 170, 171-178.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanjuan, J., Luka, S. & Stacey, G. (1993). Genetic maps of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species. In *Genetic Maps*, pp. 2136-2145. Edited by S. O'Brien. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schultze, M., Kondorosi, E., Ratet, P., Bulré, M. & Kondorosi, A. (1994). Cell and molecular biology of *Rhizobium*-plant interactions. *Int Rev Cytol* 156, 1-75.
- Scott-Craig, J. S., Guerinot, M. L. & Chelm, B. K. (1991). Isolation of *Bradyrhizobium japonicum* DNA sequences that are transcribed at high levels in bacteroids. *Mol Gen Genet* 228, 356-360.
- Simon, R., Priefer, U. & Pühler, A. (1983). Vector plasmids for *in vitro* manipulations of Gram-negative bacteria. In *Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction*, pp. 98-106. Edited by A. Pühler. Berlin: Springer-Verlag.
- Soupène, E., Foussard, M., Boistard, P., Truchet, G. & Batut, J. (1995). Oxygen as a key developmental regulator of *Rhizobium meliloti* N₂-fixation gene expression within the alfalfa root nodule. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 3759-3763.
- Szeto, W. W., Nixon, B. T., Ronson, C. W. & Ausubel, F. M. (1987). Identification and characterization of the *Rhizobium meliloti ntrC* gene: *R. meliloti* has separate regulatory pathways for activation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic cells. *J Bacteriol* 169, 1423-1432.
- Van Rhijn, P. & Vanderleyden, J. (1995). The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol Rev* 59, 124-142.
- Vázquez, M., Dávalos, A., de las Peñas, A., Sánchez, F. & Quinto, C. (1991). Novel organization of the common nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* strains. *J Bacteriol* 173, 1250-1258.
- Vázquez, M., Santana, O. & Quinto, C. (1993). The NodI and NodJ proteins from *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* strains are similar to capsular polysaccharide secretion proteins from gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* 8, 369-377.
- Vincent, J. M. (1970). *A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria*. IBP Handbook no. 15. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Received 29 April 1996; revised 19 June 1996; accepted 24 June 1996.

DISCUSION

La regulación de la expresión genética en organismos procariotes involucra a menudo la expresión de una serie de genes controlados por un regulador general en respuesta a estímulos del medio ambiente. Así, una proteína reguladora, represora o activadora; es responsable del reconocimiento de una secuencia común en los miembros de un regulón. Este mecanismo es usado en los sistemas de SOS, daño por oxidación y transporte anaeróbico de electrones en enterobacterias. En otros sistemas el circuito es definido por un factor sigma alternativo que reprograma a la RNA polimerasa para reconocer a los promotores de los miembros de un regulón. Los sistemas de choque por calor y esporulación de varias especies bacterianas son ejemplos de esta situación. En algunos procesos bacterianos intervienen muchos genes, los cuales pueden estar organizados en operones. Otros procesos involucran a un número de genes que pueden ser regulados independientemente y sujetos a un control coordinado. Algunos circuitos involucran una combinación de proteínas regulatorias y factores sigma, como las encontradas en sistemas de utilización de nitrógeno de muchas bacterias. El uso de técnicas globales nos permiten conocer como se regulada la expresión de un gene o como la expresión de un conjunto de genes en una condición dada es co-regulada.

Los resultados presentados en el artículo "Transcriptional activity of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* is affected by different environmental conditions", muestran claramente que el control transcripcional del plásmido simbiótico de *R. etli*/CFN42 es regulado por diferentes estímulos a distintos niveles

de inducción o de represión.

Durante simbiosis se observan los mayores niveles de inducción en la transcripción del plásmido simbiótico de *R. etli*. La actividad transcripcional del plásmido en estas condiciones es general, ya que en 69 de los 85 fragmentos *Bam*HI que cubren la totalidad del plásmido hay transcripción. Los genes involucrados en el proceso simbiótico identificados hasta ahora en la cepa CFN42, se localizan dentro de las regiones con mayor actividad transcripcional durante simbiosis (Girard *et al*, 1991; Vázquez *et al.*, 1991; Vázquez *et al.*, 1993). Sin embargo, la función de los genes localizados entre las bandas *Bam*HI 26 a 84 es desconocida. Estos datos indican que aunque no todo el plásmido codifica para genes indispensables para el proceso, éste contiene información genética que podría estar involucrada en vías alternativas de asimilación o en procesos metabólicos llevados a cabo a lo largo de la simbiosis.

La limitación de oxígeno ha sido propuesta como un determinante clave en la expresión de los genes de fijación de nitrógeno (Soupène *et al.*, 1995). De una manera general podemos decir que el oxígeno es el principal efector de la expresión de las secuencias contenidas en el pSim de *R. etli*. La expresión de las secuencias localizadas en el plásmido en condiciones aeróbicas es prácticamente nula, ya que sólo dos regiones son transcritas en estas condiciones, mientras que los niveles de transcripción y la extensión de las secuencias expresadas en microaerobiosis es de prácticamente todo el plásmido (66 de los 85 fragmentos *Bam*HI).

Los patrones de expresión del pSim durante microaerobiosis son similares

a aquellos obtenidos durante simbiosis. La diferencia de los niveles de inducción entre ambas condiciones podrían ser simplemente explicados como un efecto de la concentración de oxígeno. En el nódulo las concentraciones de oxígeno son mucho menores que las utilizadas en nuestras condiciones microaeróbicas. La concentración de oxígeno utilizada en nuestros experimentos en vida libre es aquella en la cual se ha visto que los genes de la nitrogenasa son activamente expresados (Valderrama *et al.*, 1996). Experimentos en los cuales la concentración de oxígeno en el medio sea similar a las condiciones que prevalecen en el nódulo nos indicarían si esta diferencia en los niveles de inducción es debida al estricto control ejercido por el oxígeno sobre la expresión de los genes de fijación de nitrógeno, o bien, existen otros factores que junto con el oxígeno ejercen el control transcripcional de los genes simbióticos.

Las proteínas regulatorias para la expresión de los genes *nif* y *fix* identificadas incluyen a FixLJ, FixK y NifA (Fischer, 1994). El análisis de la actividad transcripcional del pSim en ausencia de uno de estos reguladores, NifA, indican que en el control de la expresión del pSim estaría involucrado otro elemento regulatorio sensible a oxígeno. Uno de estos reguladores podría ser *fixK* (Fischer, 1994).

Dado que el tipo de análisis que hemos implementado para estudiar la actividad transcripcional del pSim puede ser aplicado para conocer los efectos globales dentro de un circuito regulatorio general de una manera cuantitativa y posicional, se plantea la posibilidad de llevar a cabo estudios similares para conocer cómo es regulada la transcripción del plásmido en ausencia de otro de los

a aquellos obtenidos durante simbiosis. La diferencia de los niveles de inducción entre ambas condiciones podrían ser simplemente explicados como un efecto de la concentración de oxígeno. En el nódulo las concentraciones de oxígeno son mucho menores que las utilizadas en nuestras condiciones microaeróbicas. La concentración de oxígeno utilizada en nuestros experimentos en vida libre es aquella en la cual se ha visto que los genes de la nitrogenasa son activamente expresados (Valderrama *et al.*, 1996). Experimentos en los cuales la concentración de oxígeno en el medio sea similar a las condiciones que prevalecen en el nódulo nos indicarían si esta diferencia en los niveles de inducción es debida al estricto control ejercido por el oxígeno sobre la expresión de los genes de fijación de nitrógeno, o bien, existen otros factores que junto con el oxígeno ejercen el control transcripcional de los genes simbióticos.

Las proteínas regulatorias para la expresión de los genes *nif* y *fix* identificadas incluyen a FixLJ, FixK y NifA (Fischer, 1994). El análisis de la actividad transcripcional del pSim en ausencia de uno de estos reguladores, NifA, indican que en el control de la expresión del pSim estaría involucrado otro elemento regulatorio sensible a oxígeno. Uno de estos reguladores podría ser *fixK* (Fischer, 1994).

Dado que el tipo de análisis que hemos implementado para estudiar la actividad transcripcional del pSim puede ser aplicado para conocer los efectos globales dentro de un circuito regulatorio general de una manera cuantitativa y posicional, se plantea la posibilidad de llevar a cabo estudios similares para conocer cómo es regulada la transcripción del plásmido en ausencia de otro de los

reguladores generales de la fijación de nitrógeno. Experimentos recientes (Girard *et al.*, datos no publicados) indican que un plásmido diferente al pSim (pf) de *R. etli* CFN42 contiene secuencias reiteradas de los genes *fixK*, *fixNOQP*, *fixGHIS* y *cycJLK*. Estos últimos están involucrados en la biogénesis de citocromo c y fijación de nitrógeno en *R. leguminosarum* y *R. etli* (Delgado *et al.*, 1995; Soberón, comunicación personal). Dentro de esta región del pf también se localiza una secuencia con similitud al gene *fixL* de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, el cual tiene una organización peculiar (ver más abajo) (Patschkowski *et al.*, 1996). La identificación de esta secuencia es muy interesante, ya que hasta el momento no se ha detectado en el pSim de la cepa una región con homología a este gene ni al gene *fixJ*. Recientemente ha sido reportada la localización de una región *fixK-fixL* "downstream" del operón *fixNOQP* en un plásmido de *R. leguminosarum* bv. *viciae* diferente al simbiótico (pRleVF39c) (Patschkowski *et al.*, 1996). La secuencia de aminoácidos de la proteína FixL revela una estructura no común que contiene el dominio N-terminal unido a un dominio transmisor. El dominio de unión al grupo hemo que sensa el oxígeno está conservado en esta proteína. La proteína FixK encontrada en este plásmido representa un segundo gene parecido a los genes *fnr* cuyo producto es similar a las proteínas FixK de *R. meliloti* y *A. caulinodans*. Mutaciones en estos genes, *fixL* y *fixK*, muestran un fenotipo Fix⁺. La expresión microaeróbica de *fixL* es dependiente de *fixK*. Esta cepa de *R. leguminosarum* contiene un segundo gene similar a *fnr/fixK*, designado *fnrN*, el cual muestra similitud funcional y estructural a FixK de *R. meliloti* (Colonna-Romano *et al.*, 1990). La actividad de nitrogenasa en una mutante *fnrN*, es aproximadamente del 30% de la actividad de la cepa silvestre. Un fenotipo Fix⁻ se obtiene en una doble mutante *fnrN/fixK* (Patschkowski *et al.*, 1996). La regulación de la expresión del

operón *fixNOQP* en *R. meliloti*, *B. japonicum* y *A. caulinodans* depende de un gene *fixL* funcional, en este caso la expresión de *fixN* no es estrictamente dependiente de FixL. Estos datos, junto con el hecho de que no se ha identificado un gene homólogo estructural o funcional a *fixJ*, sugieren la presencia de componentes adicionales regulados por oxígeno que están involucrados en la expresión de los genes *nif* y *fix*, lo cual nos daría un modelo de regulación alternativo a los ya descritos.

Dentro de este contexto, la existencia de reiteraciones de los genes *fixK*, *fixNOQP* y *cycJLK*, así como la presencia de un gene *fixL* no común y el hecho de no haber encontrado hasta ahora un gene homólogo a *fixJ* en *R. etli*, nos abre la posibilidad de estudiar la regulación de la expresión de los genes involucrados en fijación de nitrógeno en un contexto de expresión global en el que deberemos considerar un posible modelo de regulación diferente.

El patrón de expresión del pSim de *R. etli* en presencia de flavonoides revela la existencia de cuatro regiones cuya expresión es dependiente de éste inductor (Regiones I - IV). En *Rhizobia*, los genes de nodulación son activados por la presencia de flavonoides. Existe un orden temporal en la expresión de las secuencias en el pSim bajo condiciones de inducción por genisteína. Los genes de nodulación identificados hasta el momento en *R. etli* se localizan dentro de la región del pSim cuya expresión es inducida desde tiempos muy tempranos (1 hora). La naturaleza de las secuencias contenidas en las regiones del plásmido que son expresadas a tiempos más largos después de la inducción (24 horas) es hasta ahora desconocida. Ha sido reportado que los genes de nodulación

contenidos en la región I son suficientes para la nodulación de plantas de frijol por *R. etli* (Cevallos *et al.*, 1989). Entonces, es posible pensar que las secuencias del pSim que son inducidas tardíamente por genisteína podrían estar involucradas en procesos auxiliares tales como modificaciones del factor de nodulación para especificidad del huésped o en otros procesos tales como quimiotaxis (Aguilar *et al.*, 1988), competitividad (Bhagwat y Keister, 1992; Sadowsky *et al.*, 1988), eficiencia de nodulación (Schultze *et al.*, 1994) y resistencia a fitoalexinas (Parniske *et al.*, 1991) que también son inducidos por la presencia de estos compuestos.

En *R. meliloti* se postula que existen dos vías quimiotácticas funcionales, una de las cuales responde a L-aminoácidos, mientras que la otra actúa por medio de receptores similares a MCPs (Methyl Accepting Chemotaxis Proteins), respondiendo probablemente a exudados específicos (Greck *et al.*, 1995). Un análisis de las secuencias del pSim obtenidas en el grupo de Guillermo Dávila sugieren que dentro de la región II podrían estar localizados algunos genes involucrados en procesos quimiotácticos. La secuencia parcial de esta región presenta una identidad del 63% con el gene *mcpA* de *Caulobacter crescentus*. Evidencias recientes obtenidas por Alberto Mendoza y Jaime Mora indican que al menos un gene MCP está presente en esta región del plásmido inducida por genisteína.

Una región involucrada en la síntesis de factores de nodulación, localizada dentro de la región IV, ha sido localizada en el pSim (Corvera y Romero, comunicación personal). La secuencia de aminoácidos de esta región muestra

una similitud significativa con el gene *nolL* de *Rhizobium loti*, el cual posiblemente codifica para una acetil-transferasa (NolL) esencial para que *R. loti* nodule *Lotus pedunculatus* y *Leucaena leucocephala* (Scott *et al.*, 1996). Por lo tanto, el análisis de la secuencia de los fragmentos del pSim inducidos por genisteína nos daría información acerca de estas regiones que hasta el momento habían sido caracterizadas como dispensables.

La interacción primaria entre las especies de *Rhizobium* y las plantas leguminosas, es mediada por la respuesta de la bacteria a compuestos exudados por las raíces de la planta. Esta respuesta puede ser diferente a la obtenida con sólo un inductor de los genes de nodulación, ya que dichos compuestos pueden activar o antagonizar con la expresión de los genes *nod* (Djordjevic *et al.*, 1987; Firmin *et al.*, 1986; Innes *et al.*, 1985; Mulligan and Long, 1985; Peters *et al.*, 1986; Redmond *et al.*, 1986), pueden estimular quimiotaxis (Currier y Strobel, 1977), o estar involucrados en la competitividad de las bacterias (Bhagwat y Keister, 1992; Sadowsky *et al.*, 1988). Se tiene planeado estudiar la actividad transcripcional del pSim en presencia de dichos exudados y conocer el papel de éstos como inductores o represores en las etapas iniciales de la interacción planta-bacteria.

Para el establecimiento del diálogo molecular entre la bacteria y su hospedero es necesaria la presencia de un regulador de la transcripción de los genes *nod*, la proteína NodD. Si el análisis de la transcripción del pSim mediada por proteínas reguladoras generales de la fijación de nitrógeno se plantea como una posibilidad de estudio en este trabajo, de igual manera se piensa que debemos conocer la actividad transcripcional del plásmido regulada por NodD.

Dicho análisis no se ha llevado a cabo debido a que en *R. etli* CFN42, se han identificado tres copias del gene *nodD* (Cevallos *et al.*, 1989; Davis y Johnston, 1990; Girard *et al.*, 1991), y al momento no contamos con las mutantes respectivas. Un análisis de la transcripción del pSim de *Rhizobium* sp. NGR234 en presencia de flavonoides y exudados de raíz (Fellay *et al.*, 1995), muestra que la transcripción de dicho plásmido es parcialmente dependiente de una de las copias del gene *nodD*₁, lo cual plantea la necesidad de construir dobles mutantes, ya que dicha cepa contiene dos copias del gene.

Es claro que las diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno ejercen un control en la expresión de regiones específicas del plásmido. El succinato y el amonio son las fuentes de carbono y de nitrógeno más utilizadas por estos microorganismos; de los resultados obtenidos vemos claramente que la expresión de ciertas regiones del pSim es mediada por la calidad de las fuentes de carbono o de nitrógeno. La expresión de algunas regiones del plásmido inducida como respuesta a la presencia de un nutriente dado, puede depender de la calidad de la fuente nutritiva. Así, en glicerol, una de las fuentes de carbono considerada como pobre, la inducción es mayor, mientras que en succinato, la expresión del pSim es casi nula. Estos resultados nos indican que existen en el pSim ciertas regiones que podrían estar involucradas en una vía metabólica dada, o que son capaces de responder a la presencia de un nutriente determinado directa o indirectamente.

Para poder evaluar la relevancia de la información obtenida en nuestros experimentos, cósmidos al azar que llevan secuencias del plásmido pb de *R. etli*

CFN42 fueron analizados de la misma manera que el pSim para conocer su actividad transcripcional durante simbiosis, microaerobiosis, aerobiosis y en presencia de genisteína. En estas condiciones solamente dos fragmentos *Bam*HI provenientes del pb fueron expresados de manera constitutiva. El resto de las regiones analizadas no mostró expresión detectable bajo ninguna de estas condiciones.

La comparación de estos resultados muestran que la expresión de las secuencias contenidas en el pb, conocido como plásmido LPS ya que contiene secuencias involucradas en la síntesis de lipopolisacáridos, es regulada de diferente manera a las del plásmido simbiótico. En particular, estos datos confirman la importancia del oxígeno como principal efector de la actividad transcripcional en el plásmido simbiótico de *R. etli* CFN42.

La posibilidad de que en *R. etli* exista un mecanismo alternativo de regulación para los genes *nif* y *fix* en el cual los reguladores descritos hasta ahora sean controlados de diferente manera, nos lleva a plantear un análisis de la transcripción del pSim en la que deberán ser tomadas en cuenta sus posibles efectores así como el papel de cada una de las reiteraciones encontradas. Por lo tanto, este tipo de metodologías nos permitirá evaluar de una manera posicional como es controlada la expresión del plásmido simbiótico por un circuito regulatorio complejo.

Los datos obtenidos en este estudio muestran que las secuencias contenidas en el plásmido simbiótico de *R. etli* están sujetas a un control

transcripcional mediado por diferentes estímulos. Dado que nuestros resultados señalan diferentes zonas en el plásmido cuya transcripción es inducida por un estímulo específico, estos podrán ser integrados a los esfuerzos que se están realizando para obtener la secuencia total del plásmido.

BIBLIOGRAFIA

- Aguilar, J. M.M., A.M. Ashby, A.J.M. Richards, G.A. Loake, M.D. Watson, and C.H. Shaw.** 1988. Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* towards flavonoid inducers of the symbiotic nodulation genes. *J. Gen Microbiol.* **134**: 2741-2746.
- Albright, L.M., E. Huala, and F.M. Ausubel.** 1989. Procaryotic signal transduction mediated by sensor and regulatory protein pairs. *Annu. Rev. Genet.* **23**: 311-336.
- Arnold, W., A. Rump, W. Klipp, U.B. Priefer, and A. Pühler.** 1988. Nucleotide sequence of a 24,206- base-pair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Mol. Biol.* **203** : 715-738.
- Banfalvi, Z., V. Sakanyan, C. Koncz, A. Kiss, I. Dusha, and A. Kondorosi.** 1981. Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of *R. meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* **184** : 318-325.
- Barbour, W.M., and G.H. Elkan.** 1990. Physiological characteristics and competitive ability of plasmid-cured derivatives of *Rhizobium fredii* USDA 206. *Arch. of Microbiol.* **124** : 1-4.
- Batut, J., M.L. Daveran-Mingot, M. David, J. Jacobs, A.M. Garnerone, and D. K. Kahn.** 1989. *fixK*, a gene homologous with *fnr* and *crp* from *Escherichia coli*, regulates nitrogen fixation genes both positively and negatively in *Rhizobium meliloti*. *EMBO J.* **8**: 1279-1286.
- Bennett, L. T., F.C. Cannon, and D. Dean.** 1988. Nucleotide sequence and mutagenesis of the *nifA* gene from *Azotobacter vinelandii*. *Mol Microbiol.*

2: 315-321.

Beynon, J.L., M.K. Williams, and F.C. Cannon. 1988. Expression and functional analysis of the *Rhizobium meliloti nifA* gene. EMBO J. 7: 7-14.

Bhagwat, A.A., and D.L. Keister. 1992. Identification and cloning of *Bradyrhizobium japonicum* genes expressed strain selectively in soil and rhizosphere. Appl. Environ Microbiol. 58: 1490-1495.

Bishop, P.E., and R. Premakumar. 1992. Alternative nitrogen fixation systems. Pp. 736-762. En: Biological Nitrogen Fixation. Stacey, G., R.H. Burris, and H.J. Evans (Edit.). Chapman & Hall. New York, London.

Borthakur, D., and A.W.B. Johnston. 1987. Sequence of *psi*, a gene on the symbiotic plasmid of *Rhizobium phaseoli* wich inhibits exopolysaccharide synthesis and nodulation and demonstration that its transcription is inhibited by *psr*, another gene on the Sym plasmid. Mol. Gen. Genet. 207 : 149-154.

Bulkema, W.J., W.W. Szeto, P.V. Lemley, W.H. Orme-Johnson, and F.M. Ausubel. 1985. Nitrogen fixation specific regulatory genes of *Klebsiella pneumoniae* and *Rhizobium meliloti* share homology with the general nitrogen regulatory gene *ntrC* of *Klebsiella pneumoniae*. Nucleic Acids Res. 13: 317-335.

Carlson, R.W., N.P.J. Price, and G. Stacey. 1994. The biosynthesis of Rhizobial lipo-oligosaccharide nodulation signal molecules. Mol. Plant-Microbe Interac. 7 : 684-695.

Cevallos, M.A., M. Vázquez, A. Dávalos, G. Espín, J. Sepúlveda, and C. Quinto. 1989. Characterization of *Rhizobium phaseoli* Sym plasmid regions involved in nodule morphogenesis and host-range specificity. Mol. Microbiol. 3: 879-889.

- Chuang, S., D.L. Daniels, and F.R. Blattner.** 1993. Global regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**: 2026-2036.
- Colonna-Romano, S., W. Arnold, A. Schlüter, P. Boistard, and A. Pühler.** 1990. An Fnr-like protein encoded in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* shows structural and functional homology to *Rhizobium meliloti* FixK. *Mol. Gen. Genet.* **223**: 138-147.
- Currier, W.W., and G.A. Strobel.** 1977. Chemotaxis of *Rhizobium* spp. to a glycoprotein produced by birdsfoot trefoil roots. *Science* **196**: 434-435.
- Da Re, S., S. Bertagnoli, J. Fourment, J.-M. Reyrat, and D. Kahn.** 1994. Intramolecular signal transduction within the FixJ transcriptional activator: *in vivo* evidence for the inhibitory effect of the phosphorylatable regulatory domain. *Nucleic Acids Res.* **22**: 1555-1561.
- David, M., O. Domergue, P. Pognonec, and D. Kahn.** 1987. Transcription patterns of *Rhizobium meliloti* symbiotic plasmid pSym: identification of *nifA*-independent *fix* genes. *J. Bacteriol.* **169**: 2239-2244.
- David, M., M.L. Daveran, J. Batut, A. Dedieu, O. Domergue, J. Ghai, C. Hertig, P. Boistard, and D. Kahn.** 1988. Cascade regulation of *nif* gene expression in *Rhizobium meliloti*. *Cell* **54**: 671-683.
- 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.
- Delgado, M.J., K.H. Yeoman, G. Wu, C.Vargas, A.E. Davies, R.K. Poole, A.W.B. Johnston.** 1995. Characterization of the *cycHJKL* genes involved in cytochrome c biogenesis and symbiotic nitrogen fixation in

Rhizobium leguminosarum. J. Bacteriol. 177: 4927-4934.

Dénarié, J., F. Debellé, and Ch. Rosenberg. 1992. Signaling and host range variation in nodulation. Annu. Rev. Microbiol. 46 : 497-531.

Ditta, G., E. Virts, A. Palomares, and K. Choong-Hyun. 1987. The *nifA* gene of *Rhizobium meliloti* is oxygen regulated. J. Bacteriol. 169: 3217-3223.

Djordjevic, M.A., J.W. Redmond, M. Batley, and B.G. Rolfe. 1987. Clovers secrete specific phenolic compounds which stimulate or repress *nod* genes expression in *Rhizobium trifolii*. EMBO J. 6: 1173-1179.

Dowling, D. N., and W. J. Broughton. 1986. Competition for nodulation of legumes. Annu. Rev. Microbiol. 40 : 131-157.

Dusha, I., A. Bakos, A. Kondorosi, F.J. de Bruijn, 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.

Estabrook, E.M., and C. Sengupta-Gopalan. 1991. Differential expression of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase during soybean nodule development. Plant Cell 3 : 299-308.

Evans, D., R. Jones, P. Woodley and R. Robson. 1988. Further analysis of nitrogen fixation (*nif*) genes in *Azotobacter chroococcum*: identification and expression in *Klebsiella pneumoniae* of *nifS*, *nifV*, *nifM*, and *nifB* genes and localization of *nifE/N*-, *nifU*-, *nifA*- and *fixABC*-like genes. J. Gen. Microbiol. 134: 931-942.

Feiler, H.S., and T.W. Jacobs. 1990. Cell division in higher plants : A *cdc2* gene, its 34 kDa product, and histone H1 kinase activity in pea. Proc.

Natl. Acad. Sci. USA. 87 : 5397-5401.

Fellay, R., X. Perret, V. Viprey, W.J. Broughton, and S. Brenner. 1995. Organization of host-inducible transcripts on the symbiotic plasmid of *Rhizobium* sp. NGR234. Mol. Microbiol. 16: 657-667.

Firmin, J.L., K.E. Wilson, L. Rossen., and A.W.B. Johnston. 1986. Flavonoid activation of nodulation genes in *Rhizobium* reversed by other compounds present in plants. Nature 324: 90-92.

Fischer, H.M., A. Alvarez-Morales, and H. Hennecke. 1986. The pleiotropic nature of symbiotic regulatory mutants: *Bradyrhizobium japonicum* *nifA* gene is involved in control of *nif* gene expression and formation of determinate symbiosis. EMBO J. 5: 1165-1173.

Fischer, H. M., and H. Hennecke. 1987. Direct response of *Bradyrhizobium japonicum* *nifA*-mediated *nif* gene regulation to cellular oxygen status. Mol. Gen. Genet. 209: 621-626.

Fischer, H.M. 1994. Genetic regulation of nitrogen fixation in Rhizobia. Microbiol. Rev. 58 : 352-386.

Fisher, R.F., and S.R. Long. 1992. *Rhizobium*-plant signal exchange. Nature 357 : 655-660.

García-de los Santos, A., S. Brom, and D. Romero. 1996. *Rhizobium* plasmids in bacteria-legume interactions. World J. of Microbiol. & Biotech. 12 : 119-125.

Gilles-González, M.A., and G. González. 1993. Regulation of the kinase activity of heme protein from two-component system FixL/FixJ of *Rhizobium meliloti*. J. Biol. Chem. 268: 16293-16297.

Girard, M.L., M. Flores, S. Brom, D. Romero, R. Palacios, and G.

- Dávila. 1991. Structural complexity of the symbiotic plasmid of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli. J. Bacteriol. **173**: 2411-2419.
- Girard, M.L., B. Valderrama, R. Palacios, D. Romero, and G. Dávila. 1995. GenBank accession no. U31630.
- Girard, L., B. Valderrama, R. Palacios, D. Romero, and G. Dávila. 1996. Transcriptional activity of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* is affected by different environmental conditions. Microbiology. **142**: 2847-2856.
- Göttfert, M., P. Grob, and H. Hennecke. 1990. Proposed regulatory pathway encoded by the *nodV* and *nodW* genes, determinants of the host specificity in *Bradyrhizobium japonicum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **87**: 2680-2684.
- Gray, J.X., and B.G. Rolfe. 1990. Exopolysaccharide production in *Rhizobium* and its role in invasion. Mol. Microbiol. **4** : 1425-1431.
- Greck, M., J. Platzer, V. Sourjik, and R. Schmitt. 1995. Analysis of a chemotaxis operon in *Rhizobium meliloti*. Mol. Microbiol. **15**: 989-1000.
- Grönger, P., S.S. Manian, H. Reiländer, M. O'Connell, U.B. Priefer, and A. Pühler. 1987. Organization and partial sequence of a DNA region of the *Rhizobium leguminosarum* symbiotic plasmid pRL6J1 containing the genes *fixABC*, *nifA*, *nifB* and a novel open reading frame. Nucleic Acids Res. **15**: 31-49.
- Hawkins, F. K. L., and A. W. B. Johnston. 1988. Transcription of a *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* gene needed for melanin synthesis is activated by *nifA* of *Rhizobium* and *Klebsiella pneumoniae*. Mol. Microbiol. **2**: 331-337.
- Hartwig, U.A., C.A. Maxwell, C.M. Joseph, and D.A. Phillips. 1990.

Effects of alfalfa *nod* gene-inducing flavonoids on *nodABC* transcription in *Rhizobium meliloti* strains containing different *nodD* genes. J. Bacteriol. 172: 2769-2773.

Henikoff, S., G.W. Haughn, J.M. Calvo, and J.C. Wallace. 1988. A large family of bacterial activator proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 6602-6606.

Hernández-Lucas, I., M.A. Pardo, L. Segovia, J. Miranda, and E. Martínez-Romero. 1995. *Rhizobium tropici* chromosomal citrate synthase Gene. Appl. Environ. Microbiol. 61 : 3992-3997.

Hirsch, A.M., Y. Fang, L.M. Brill, K.L. Wycoff, B.M. Niner, J.P. Brandt, and P. Van Rhijn. 1995. Nodule development in legumes- the early stages : involvement of early nodulins, lectins and other proteins. p. 299. En : Nitrogen Fixation : Fundamentals and Applications. Tikhonovich, I.A., N.A. Provorov, V.I. Romanov, and W.E. Newton. (ed.). Kluwer Acad. Publishers. The Netherlands.

Hirt, H., A. Páy, J. Györgyey, L. Bacó, K. Németh, L. Bögre, R.J. Schweyen, E. Heberle-Bors, and D. Dudits. 1991. Complementation of a yeast cell cycle mutant by an alfalfa cDNA encoding a protein kinase homologous to p34^{cdc2}. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88 :1636-1640.

Honma, M.A., M. Asomaning, and F.M. Ausubel. 1990. *Rhizobium meliloti nodD* genes mediate host-specific activation of *nodABC*. J. Bacteriol. 172: 901-911.

Hooykaas, P.J.J., A.A.N. Van Brussel, H. Den Dulk-Ras, G.M.S. Van Slogteren, R.A. Schilperoort. 1981. Sym plasmid of *Rhizobium trifolii* expressed in different Rhizobial species and *Agrobacterium*

tumefaciens. Nature 291 : 351-353.

Horvath, B., E. Kondorosi, M. John, J. Schmidt, I., Török, Z. Györgypal, I. Barabas, U. Wieneke, J. Schell., and A. Kondorosi.

1986. Organization, structure and symbiotic function of *Rhizobium meliloti* nodulation genes determining host specificity for alfalfa. Cell 46: 335-343.

Howard, J.B. 1994. Nitrogenase: a nucleotide-dependent molecular switch. Ann. Rev. Biochem. 63: 235-264.

Huala, E., and F. M. Ausubel. 1989. The central domain of *Rhizobium meliloti* NifA is sufficient to activate transcription from the *R. meliloti* *nifH* promoter. J. Bacteriol. 171: 3354-3365.

Iismaa, S. E., and J. M. Watson. 1989. The *nifA* gene product from *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* lacks the N-terminal domain found in other NifA proteins. Mol. Microbiol. 3: 943-955.

Innes, R.W., P.L. Kuempel, J. Plazinski, H. Canter-Cremers, B.G. Rolfe, M.A. Djordjevic. 1985. Plant factors induce expression of nodulation and host-range genes in *Rhizobium trifolii*. Mol. Gen. Genet. 201: 426-432.

Jacobs, M., and P.H. Rubery. 1988. Naturally occurring auxin transport regulators . Science 241 : 346-349.

Johnston, A.W.B., J.L. Beynon, A.V. Buchanon-Wollaston, S.M. Setchell, P.R. Hirsch, and J.E. Beringer. 1978. High frequency transfer of nodulation ability between strains and species of *Rhizobium*. Nature 276 : 634-636.

Kahn, D., and G. Ditta. 1991. Modular structure of FixJ: homology of the transcriptional activator domain with the -35 binding domain of sigma factors. Mol. Microbiol. 5: 987-997.

Kaminski, P.A., and C. Elmerich. 1991a. Involvement of *fixLJ* in the regulation of nitrogen fixation in *Azorhizobium caulinodans*. *Mol. Microbiol.* **5**: 665-673.

Kaminski, P.A., K. Mandon, F. Arigoni, N. Desnoues, and C. Elmerich. 1991b. Regulation of nitrogen fixation in *Azorhizobium caulinodans*: identification of a *fixK*-like gene, a positive regulator of *nifA*. *Mol. Microbiol.* **5**: 1983-1991.

Kim, J., and D.C. Rees. 1994. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. *Biochemistry.* **33**: 389-397.

Kim, Y.M., J. Ahn, T. Beppu, and T. Uozumi. 1986. Nucleotide sequence of the *nifLA* operon of *Klebsiella oxytoca* NG13 and characterization of the gene products. *Mol. Gen. Genet.* **205**: 253-259.

Kondorosi, E., Z. Banfalvi, and A. Kondorosi. 1984. Physical and genetic analysis of a symbiotic region of *Rhizobium meliloti*: Identification of nodulation genes. *Mol. Gen. Genet.* **193**: 445-452.

Kondorosi, E., Gyuris, J., J. Schmidt, M. John, E. Duda, B. Hoffman, J. Schell, and A. Kondorosi. 1989. Positive or negative control of *nod* gene expression in *Rhizobium meliloti* is required for optimal regulation. *EMBO J.* **8**: 1331-1340.

Kondorosi, E., M. Pierre, M. Cren, B. Hoffmann, M. Buiré, J. Schell, and A. Kondorosi. 1991a. Identification of NolR, a negative transacting factor controlling the nod regulon in *Rhizobium meliloti*. *J. Mol. Biol.* **222**: 885-896.

Kondorosi, E., M. Buiré, M. Cren, N. Iyer, B. Hoffmann, and A. Kondorosi. 1991b. Involvement of the *syrM* and *nodD₃* genes of *Rhizobium*

melliloti in *nod* gene activation and in optimal nodulation of the plant host. Mol. Microbiol. 5: 3035-3048.

Kouchi, H., and S. Hata. 1993. Isolation and characterization of novel nodulin cDNAs representing genes expressed at early stages of soybean nodule development. Mol. Gen. Genet. 238 : 106-119.

Leigh, J.A., and D.L. Coplin. 1992. Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. Annu. Rev. Microbiol. 46 : 307-346.

Leigh, J.A., and G.C. Walker. 1994. Exopolysaccharides of *Rhizobium*: synthesis regulation and symbiotic function. Trends in Genetics 10 : 63-67.

Liang, Y. Y., P. A. Kaminski, and C. Elmerich. 1991. Identification of a *nifA*-like regulatory gene of *Azospirillum brasilense* Sp7 expressed under conditions of nitrogen fixation and in the presence of air and ammonia. Mol. Microbiol. 5: 2735-2744.

Liu, R. L., V. M. Tran, and E. L. Schmidt. 1989. Nodulation competitiveness of a nonmotile Tn7-mutant of *Bradyrhizobium japonicum* in nonsterile soil. Appl. Environ. Microbiol. 55 : 1895-1900.

Lois, A.F., M. Weinstein, G.S. Ditta, and D.R. Helinski. 1993. Autophosphorylation and phosphatase activities of the oxygen-sensing protein FixL of *Rhizobium melliloti* are coordinately regulated by oxygen. J. Biol. Chem. 268: 4370-4375.

Lugtenberg, B.J.J., G.V. Bloemberg, A.A.N. Van Brussel, J.W., Kijne, J.E. Thomas-Oates, and H.P. Spaink. 1995. Signals involved in nodulation and nitrogen fixation. p. 37. En : Nitrogen Fixation : Fundamentals and Applications. Tikhonovich, I.A., N.A. Provorov, V.I. Romanov, and W.E. Newton. (ed.). Kluwer Acad. Publishers. The Netherlands.

- Malek, W.** 1992. The role of motility in the efficiency of nodulation by *Rhizobium meliloti*. Arch. Microbiol. **158** : 26-28.
- Mandon, K., H. Hillebrand, C. Mougel, N. Desnoues, B. Dreyfus, P.A. Kaminski, and C. Elmerich.** 1993. Characterization of *fixK*-regulated *Azorhizobium caulinodans* genes. p.478. En: New horizons in nitrogen fixation. Palacios, R., J. Mora, and W.E. Newton (ed.). Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Mandon, K., P.A. Kaminski., and C. Elmerich.** 1994. Functional analysis of the *fixNOQP* region of *Azorhizobium caulinodans*. J. Bacteriol. **176**: 2560-2568.
- Martínez, E., D. Romero, and R. Palacios.** 1990. The *Rhizobium* genome. Crit. Rev. Plant Sci. **9** : 59-93.
- Masepohl, B., W. Klipp, and A. Pühler.** 1988. Genetic characterization and sequence analysis of the duplicated *nifA/nifB* gene region of *Rhodobacter capsulatus*. Mol. Gen. Genet. **212**: 27-37.
- Mellor, H. Y., A. R. Glenn, R. Arwas, and M. J. Dilworth.** 1987. Symbiotic and competitive properties of motility mutants of *Rhizobium trifolii* TA1. Arch. Microbiol. **148** : 34-39.
- Merrick, M.J.** 1992. Regulation of nitrogen fixation genes in Free-living and symbiotic bacteria. Pp. 835-876. En: Biological Nitrogen Fixation. Stacey, G., R.H. Burris, and H.J. Evans (Edit.). Chapman & Hall. New York, London.
- Michiels, J., I. D'hooghe, C. Verreth, H. Pelemans, and J. Vanderleyden.** 1994. Characterization of the *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* *nifA* gene, a positive regulator of *nif* gene expression. Arch. Microbiol. **161**: 404-408.

Monson, E.K., M. Weinstein, G.S. Ditta, and D.R. Helinski. 1992. The FixL protein of *Rhizobium meliloti* can be separated into a heme-binding oxygen-sensing domain and a functional C-terminal kinase domain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **89**: 4280-4284.

Morett, E., and M. Buck. 1988. NifA-dependent *in vitro* protection demonstrates that the upstream activator sequence of *nif* promoters is a protein binding site. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **85**: 9401-9405.

Morett, E., and M. Buck. 1989. *In vivo* studies on the interaction of RNA polymerase σ^{54} with the *Klebsiella pneumoniae* and *Rhizobium meliloti nifH* promoters. J. Mol. Biol. **210**: 65-77.

Mulligan, J.T., and S.R. Long. 1985. Induction of *Rhizobium meliloti*: *nodC* expression by plant exudates requires *nodD*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **82**: 6609-6613.

Nap, J. P., and T. Bisseling. 1990. Developmental biology of a plant-prokaryote symbiosis : the legume root nodule. Science. **250** : 948-954.

Nees, D. W., P. A. Stein and R. A. Ludwig. 1988. The *Azorhizobium caulinodans nifA* gene: identification of upstream-activating sequences including a new element, the "anaerobox". Nucleic Acids Res. **16**: 9839-9853.

Parniske, M., B. Ahlborn, and D. Werner. 1991. Isoflavonoid-inducible resistance to the phytoalexin glycoceollin in soybean rhizobia. J. Bacteriol. **173**: 3432-3439.

Patschkowski, T., A. Schlüter, and U. B. Priefer. 1996. *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* contains a second *fnr/fixK*-like gene and an unusual *fixL*homologue. Mol. Microbiol. **21**: 267-280.

- Pawlowski, K., P. Ratet, J. Schell, and F.J. de Buijn.** 1987. Cloning and characterization of *nifA* and *ntrC* genes of the stem nodulation bacterium ORS571, the nitrogen fixing symbiont of *Sesbania rostrata*: regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes in the free-living versus symbiotic state. *Mol. Gen. Genet.* **206**: 207-219.
- Peters, K.N., J.W. Frost, and S.R. Long.** 1986. A plant flavone luteolin induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science* **223**: 977-979.
- Peters, N.K., and D.P.S. Verma.** 1990. Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5** : 33-37.
- Poupot, R., E. Martínez-Romero, and J-C. Promé.** 1993. Nodulation factors from *Rhizobium tropici* are sulfated or nonsulfated chitopentasaccharides containing *N*-methyl-*N*-acylglucosaminyl terminus. *Biochemistry.* **32**: 10430-10435.
- Poupot, R., E. Martínez-Romero, N. Gautier, and J-C. Promé.** 1995. Wild type *Rhizobium etli*, a bean symbiont, produces acetyl-fucosylated, *N*-methylated, carbamoylated nodulation factors. *J. of Biol. Chem* **270**: 6050-6055.
- Ratet, P., K. Pawlowski, J. Schell, and F. J. de Bruijn.** 1989. The *Azorhizobium caulinodans* nitrogen-fixation regulatory gene, *nifA*, is controlled by the cellular nitrogen and oxygen status. *Mol. Microbiol.* **3**: 825-838.
- Redmond, J.W., M. Batley, M.A. Djordjevic, R.W. Innes, P.L. Kuempel, and B.G. Rolfe.** 1986. Flavones induce the expression of nodulation genes in *Rhizobium*. *Nature* **323**: 632-635.

Rivilla, R., J.M. Sutton, 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.

Roelvink, P. W., J. G. J. Hontelez, A. van Kammen, and R.C. van den Bos. 1989. Nucleotide sequence of the regulatory *nifA* gene of *Rhizobium leguminosarum* PRE: transcriptional control sites and expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 3: 1441-1447.

Rolfe, B.G. , and P. Gresshoff. 1988. Genetic analysis of legume nodule initiation. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39 : 297-319.

Ronson, C.W., B.T. Nixon, and F.M. Ausubel. 1987. Conserved domains in bacterial regulatory proteins that respond to environmental stimuli. *Cell* 49: 579.

Rosenberg, C., P. Boistard, J. Dénarié, F. Casse-Delbart. 1981. Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* 184 : 326-333.

Rushing, B.G., M.M. Yelton, and S.R. Long. 1991. Genetic and physical analysis of the *nodD₃* region of *Rhizobium meliloti*. *Nucleic Acids Res.* 19: 921-927.

Sadowsky, M.J., E.R. Olson, V.E. Foster, R.M. Kossak, and D.P.S. Verma. 1988. Two host-inducible genes of *Rhizobium fredii* and characterization of the inducing compound. *J. Bacteriol.* 170: 171-178.

Sanjuan, J., S. Luka, and G. Stacey. 1993. Genetic maps of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species. En: Genetic maps, p. 2136-2145. O'Brien, S. (ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Sanjuan, J., P. Grob, Göttfert, H. Hennecke, and G. Stacey. 1994.

NodW is essential for full expression of the common nodulation genes in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7: 364-369.

Schultze, M., E. Kondorosi, R. Pascal., M. Buiré, and A. Kondorosi. 1994. Cell and molecular biology of *Rhizobium*-plant interactions. *International Rev. of Cytol.* 156 : 1-75.

Schwedock, J., and S.R. Long. 1989. Nucleotide sequence and protein products of two new nodulation genes of *Rhizobium meliloti*, *nodP* and *nodQ*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2: 181-194.

Scott, D.B., C.A Young, J.M. Collins-Emerson, E.S. Rockman, P.E. Lewis, and C.E. Pankhurst. 1996. Novel and complex chromosomal arrangement of *Rhizobium loti* nodulation genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9: 187-197.

Scott-Craig, J.S., M.L. Guerinot, and B. K. Chelm. 1991. Isolation of *Bradyrhizobium japonicum* DNA sequences that are transcribed at high levels in bacteroids. *Mol. Gen. Genet.* 228: 356-360.

Shigematsu, T., M. Hidaka, H. Massaki, and T. Uozumi. 1992. EMBL database accession no. D.13799.

Soupène, E., M. Foussard, P. Boistard, G. Truchet, and J. Batut. 1995. Oxygen as a key developmental regulator of *Rhizobium meliloti* N₂-fixation gene expression within the alfalfa root nodule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 3759-3763.

Souza, E. M., S. Funayama, L. U. Rigo, M.G. Yates, and F. O. Pedrosa. 1991. Sequence and structural organization of a *nifA*-like gene and part of a *nifB*-like gene of *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. *J. Gen. Microbiol.* 137: 1511-1522.

- Spaink, H.P., R.J.H. Okker, C.A. Wijffelman, E. Pees, and B.J.J. Lugtenberg. 1987. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. *Plant Mol. Biol.* 9: 27-39.
- Spaink, H. P., D. M. Sheeley, A. A. N. van Brussel, J. Glushka, W. S. York, T. Tak, O. Geiger, E. P. Kennedy, V. N. Reinhold, and B. J. J. Lugtenberg. 1991. A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipooligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature* 354 : 125-130.
- Spiro, S., and J.R. Guest. 1990. FNR and its role in oxygen regulated gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* 75: 399-428.
- Thöny, B., H.M. Fischer, D. Anthamatten, T. Bruderer, and H. Hennecke. 1987. The symbiotic nitrogen fixation regulatory operon (*fixRnifA*) of *Bradyrhizobium japonicum* is expressed aerobically and is subject to a novel, *nifA*-independent type of activation. *Nucleic Acids Res.* 15: 8479-8499.
- Valderrama, B., A. Dávalos, L. Girard, E. Morett, and J. Mora. 1996. Regulatory proteins and *cis*-acting elements involved in the transcriptional control of *Rhizobium etli* reiterated *nifH* genes. *J. Bacteriol.* 178: 3119-3126.
- Van de Wiel, C., J.H. Norris, B. Bochenek, R. Dickstein, T. Bisseling, and A.M. Hirsch. 1990. Nodulin gene expression and ENOD2 localization in effective nitrogen-fixing and ineffective, bacteria-free nodules of alfalfa. *Plant Cell* 2 : 1009-1017.
- Van Rhijn, P., and J. Vanderleyden. 1995. The *Rhizobium*-Plant Symbiosis. *Microbiol. Rev.* 59 : 124-142.
- Vasse, J., F. de Billy, S. Camut, and G. Truchet. 1990. Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in

alfalfa nodules. J. Bacteriol. **172** : 4296-4306.

Vázquez, M., A. Dávalos, A. de las Peñas, F. Sánchez, and C. Quinto. 1991. Novel organization of the common nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli strains. J. Bacteriol. **173**: 1250-1258.

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

Verma, D.P.S. 1992. Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of *Rhizobium*. Plant Cell **4** : 373-382.

Verma, D.P.S., M.G. Fortin, J. Stanley, V.P. Mauro, S. Purohit, and N. Morrison. 1986. Nodulins and nodulin genes of *Glycine max*. Plant Mol. Biol. **7** : 51-66.

Virts, E.L, S.W. Stanfield, D.R. Helinski, and G.S. Ditta. 1988. Common regulatory elements control symbiotic and microaerobic induction of *nifA* in *Rhizobium meliloti*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **85**: 3062-3065.

Young J.P.W., H.L. Downer, and B.D. Eardly. 1991. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain Btail by polymerase chain reaction-based sequencing of the 16 rRNA segment. J. Bacteriol. **173** : 2271-2277.