

03062

18  
2 y

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Unidad Académica de los Ciclos Profesionales  
y de Postgrado del C.C.H.

ESTUDIO DE LA REGULACION DE LA EXPRESION DE LOS GENES COMUNES DE  
NODULACION nodBC DE Rhizobium leguminosarum BIOVAR phaseoli

T E S I S

Que para obtener el grado de:

MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

presenta

ALEJANDRO DE LAS PEÑAS NAVA

1990

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INTRODUCCION

### Importancia

En las últimas décadas ha aumentado la demanda de alimentos; para cubrir esta demanda incrementando la producción agrícola, se ha hecho necesaria la fertilización inorgánica de los suelos para una óptima producción en el campo. Sin embargo la utilización de fertilizantes presenta 3 grandes inconvenientes:

- a) la producción de fertilizantes nitrogenados comprende un proceso de alto consumo de energía lo que hace muy costoso su uso
- b) los fertilizantes presentan efectos negativos en los suelos cuando se usan indiscriminadamente ya que va empobreciendolos cada vez más ocasionando una mayor demanda de estos fertilizantes
- c) contaminan los mantos freáticos y nitrifican lagos y ríos

Sin embargo la naturaleza tiene resuelto desde hace mucho tiempo este problema mediante la fijación biológica del nitrógeno: que se da en organismos en vida libre como Klepsiella o Anabaena o en bacterias de la familia de las Rhizobiaceae que establecen una asociación con las raíces de las leguminosas donde forman un nuevo órgano, el nódulo, en el que fijan el nitrógeno atmosférico en amonio. Este proceso es muy específico, es decir, la bacteria se asocia solamente a un tipo de leguminosa implicando múltiples interacciones entre ambos organismos. Recientemente el estudio de la simbiosis entre Rhizobium y las leguminosas se ha incrementado debido no solo a su potencial en la agricultura, sino además de ser un proceso biológico fascinante que implica la relación entre un organismo eucariote (leguminosa) y un organismo procariote (Rhizobium).

El estudio de los nódulos de las raíces de las leguminosas se encuentra documentado a partir del siglo XVI:

- a) Dalechamps en 1586, apuntó sobre los abundantes nódulos de Ornitopodium tuberosum
- b) Malpighi en 1679, observó "tumores" en Pisum sativum
- c) Al principio del siglo XIX el concepto de que los nódulos eran estructuras provocadas por patógenos o por picaduras de insectos u hongos era ampliamente aceptada; y otros pensaban que eran raíces deformadas u órganos de almacenamiento o de absorción
- d) Trevinarus en 1851, pensaba que los nódulos no se debían a invasiones de patógenos sino que eran gemas adventicias
- e) Woronin en 1867 en sus estudios de anatomía de nódulos de

Lupinus mutabilis describió pequeños corpúsculos que se encontraban dentro del nódulo y que eran capaces de moverse en medio líquido. Aunque no los pudo cultivar, estuvo seguro de que estas "bacterias" eran la causa de la formación del nódulo. Pensaba además que los nódulos eran inducidos por mixomicetes y los "bacteroides" eran las esporas

- f) Eriksson y Frank en 1879, pensaron que el nódulo aparecía por una infección que comenzaba fuera de la raíz
- g) Hellriegel y Wilfarth en 1879, demostraron que las leguminosas eran noduladas por microorganismos que se encontraban en extractos de suelo y que podían fijar nitrógeno
- h) Ward y Prazmowski en 1890, describieron en Vicia faba y Pisum sativum el proceso de infección por el hilo de infección hasta el córtex de la raíz
- i) Beijerinck, Prazmowski y Frank en 1888 aislaron las bacterias
- j) Beijerinck llamó a las bacterias Bacillus radicicola que además dividió a los organismos del nódulo en grupos de crecimiento rápido y de crecimiento lento
- k) Nobbe en 1881, Atkinson en 1899, Kirchner en 1895 y Hiltner en 1900 se dieron cuenta de que existía cierta especificidad en cuanto a cuales leguminosas eran noduladas
- l) Wobbe y Hiltner en 1896 cultivaron Rhizobium en un medio al que llamaron Nitragin
- m) Fred, Baldwin y McCoy en 1932, reconocieron 8 grupos de inoculación cruzada

**El proceso de nodulación: la simbiosis Rhizobium - leguminosa**

Las bacterias del género Rhizobium definidas como aquellas que establecen una simbiosis con las raíces de las leguminosas han sido reclasificadas en 3 géneros distintos dentro de la familia de las Rhizobiaceae:

Rhizobium  
Bradyrhizobium  
Azorhizobium

Para que se lleve a cabo la simbiosis y la fijación de nitrógeno, es necesario que la bacteria infecte las raíces de las leguminosas mediante un proceso que comprende diferentes niveles (Long, 1984):

- a) colonización de la superficie de la raíz
- b) deformación y enroscamiento de los pelos radiculares
- c) mitosis de las células del córtex de la raíz
- d) penetración de las bacterias a través de los pelos radiculares por el hilo de infección, división y proliferación de las bacterias
- f) formación del nódulo
- g) liberación de las bacterias del hilo de infección dentro del nódulo rodeadas de una membrana de origen vegetal llamada membrana peribacteroidal

h) diferenciación de las bacterias en bacteroides y fijación de nitrógeno

i) funcionamiento del nódulo, estabilidad y persistencia

j) a su vez la planta empieza a sintetizar unas proteínas nódulo específicas llamadas nodulinas

Las especies de Rhizobium, Bradyrhizobium y Azorhizobium se clasifican de acuerdo con la planta a la que infectan y a su velocidad de crecimiento:

BACTERIA	PLANTA	CRECIMIENTO
<u>Rhizobium leguminosarum</u> bv. <u>phaseoli</u>	frijol	rápido
<u>Rhizobium leguminosarum</u> bv. <u>viceae</u>	chicharo, veza	rápido
<u>Rhizobium leguminosarum</u> bv. <u>trifolii</u>	trébol	rápido
<u>Rhizobium meliloti</u>	alfalfa	rápido
<u>Rhizobium fredii</u>	soya	lento
<u>Bradyrhizobium japonicum</u>	soya	lento
<u>Azorhizobium caulinodans</u>	sesbania	

### Genética de la nodulación

La identificación de los genes simbióticos abrió nuevas posibilidades de estudio en el proceso de la nodulación (Kondorosi, 1984). En la mayoría de las especies de Rhizobium la información genética para llevar a cabo la simbiosis (genes de nodulación comunes y de especificidad) y de fijación de nitrógeno (genes fix y nif) se encuentra localizada en plásmidos de alto peso molecular llamados plásmidos simbióticos (Banfalvi, 1981). Cuando los plásmidos simbióticos se transfirieron a cepas curadas de sus plásmidos, Nod<sup>-</sup> Fix<sup>-</sup> o a Agrobacterium, estas cepas adquirirían la capacidad de nodular y en algunos casos de fijar nitrógeno (Hooykaas, 1978). Además se han localizado otras funciones en plásmidos no simbióticos que pueden estar o no participando en la simbiosis:

-En Rhizobium meliloti GR en el plásmido pRmeGR4b se encuentran funciones de eficiencia para la formación del nódulo y parece ser

que estos genes están relacionados con nifA (Sanjuan, 1989)

-En un plásmido de Rhizobium meliloti 41 se encuentran los genes cac que pueden catabolizar la calistegina como única fuente de carbono y nitrógeno. Este compuesto no se encuentra en las raíces de las leguminosas sino sólo en 2 especies de Convolvulaceae y 1 especie de Solanaceae (Tepfer, 1988)

Los genes de nodulación localizados en estos plásmidos simbióticos se agrupan en 3 clases: los genes nod comunes, los genes de especificidad y los genes nodD.

a) los genes nod comunes, nodABC

Están involucrados en las primeras etapas de la nodulación. Son genes conservados funcional y estructuralmente entre los Rhizobia. Funcionan como alelos equivalentes a través de las diferentes especies de Rhizobium sin ningún efecto en el espectro de especificidad. Es decir mutantes en nodA, nodB y nodC tienen el mismo fenotipo: no inducen enroscamiento ni deformaciones en los pelos radiculares ni división celular en las células del córtex de la raíz, no hay nodulación (Nod<sup>-</sup>). Estas mutantes pueden ser complementadas por los genes nodABC de diferentes Rhizobia.

Los genes nodABC no se expresan en vida libre y se inducen en presencia del producto de nodD mas los compuestos flavonoides que se encuentran en exudados de las raíces o semillas de las leguminosas (Mulligan, 1985, Rossen, 1985). Estos genes nodABC se expresan exclusivamente en Rhizobium o en Agrobacterium y no en E. coli, Xantomonas ni Pseudomonas (Yelton, 1987). La ubicación física de estos genes se encuentra en la figura 1.

Características de los genes nod comunes:

nodA: codifica para un producto de 21.8 kd que se encuentra en citoplasma y también se puede encontrar asociado a membrana citoplásmica (Johnson, 1989) al principio de la nodulación y en el nódulo (Schmidt, 1986). Se encuentra en mayor cantidad que nodB y que nodC (Schmidt, 1988)

nodB: codifica para un producto de 23.8 kd que se encuentra en el citoplasma, junto con nodA se requiere para producir factores difusibles que a bajas concentraciones inducen la mitosis en protoplastos vegetales; se encuentra en una concentración mucho menor que nodA y que nodC (Schmidt, 1988)

nodC: codifica para un producto de 46.8 kd (John, 1988) que se ensambla en la membrana externa con un dominio extracelular (Johnson, 1989) y se encuentra en nódulos maduros en los bacteroides donde aparece procesada a una proteína de 34 kd (Schmidt, 1986), su función es de transducción de señales (Schmidt, 1988)

Para que se lleve a cabo la nodulación se necesita que los productos de nodABC no estén en grandes cantidades (Mulligan,

1989) ya que la sobreexpresión de estos genes inhibe la nodulación.

#### b) Los genes de especificidad

La característica principal de estos genes de especificidad es que parecen estar relacionados con la eficiencia de nodulación y con la selección sobre la planta hospedera. Pueden actuar positivamente para nodular una planta determinada o negativamente para prevenir esta asociación. No funcionan como alelos a través de las diferentes especies de Rhizobium.

El fenotipo de las mutantes en estos genes a diferencia de los genes nodABC es que causan ligeros cambios en la nodulación, afectan el espectro de especificidad (ampliándolo o reduciéndolo) y el porcentaje y frecuencia de formación de nódulos (Mulligan, 1989). Sin embargo mutantes en el gen nodH presentan fenotipo Nod<sup>-</sup>.

Los genes de especificidad hasta ahora descritos para Rhizobium meliloti, Rhizobium leguminosarum bv. viceae y Rhizobium leguminosarum bv. trifolii y cuya organización física se encuentra en la figura 1 son:

#### Para Rhizobium meliloti

nodH codifica para un producto de 28.5 kd, presenta un promotor con las características de una caja nod consenso, y mutantes en este gen da fenotipo Nod<sup>-</sup> y afectan el espectro de especificidad (Faucher, 1988). Se encuentra involucrado en la modificación de una señal extracelular específica de alfalfa (Banfalvi, 1989)

nodFEG forman parte de una misma unidad transcripcional y mutantes en estos genes presentan un fenotipo de retraso en la nodulación (Mulligan, 1989, Honma, 1990). nodF presenta un promotor con las características de una caja nod consenso y codifica para un producto muy hidrofílico (Debellé, 1986) de 97 kda (Shearman, 1986). nodE codifica para un producto de 41.7 kd (Debellé, 1986) que se encuentra asociado a la membrana citoplásmica que se transporta al exterior y cuya función seguramente es de transducción de señales (Spaink, 1989). nodG codifica para un producto de 26 kd (Debellé, 1986)

nodPQ se encuentran al extremo 3' de nodFEG (Schwedock, 1989) y codifican para productos de 34.7 kd y 70.6 kd respectivamente (Cervantes, 1989)

Para Rhizobium leguminosarum bv. viceae (Cremers, 1988, de Maagd, 1989, Spaink, 1989)

nodIJ se transcriben a partir del promotor de nodABC, mutantes en estos genes presentan un fenotipo de retraso en la nodulación. nodI codifica para un producto de 34.3 kd y nodJ codifica para un producto de 27.6 kd muy hidrofóbico (Evans, 1986)

nodFEL nodF tiene promotor con las características de una caja nod consenso y mutantes en estos genes presentan un fenotipo de retraso en la nodulación y reducen el espectro de plantas para nodular (Surin, 1988)

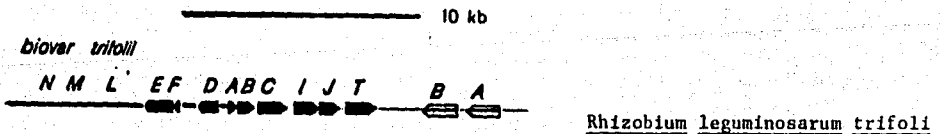
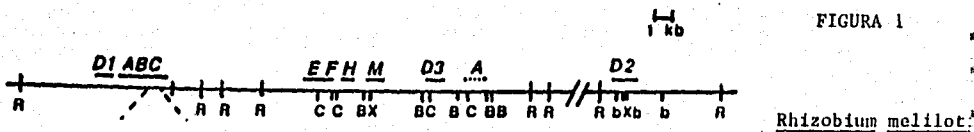
nodMNT nodM tiene promotor con las características de una caja nod consenso y mutantes en estos genes presentan un fenotipo de retraso en la nodulación

nodO tiene promotor con las características de una caja nod consenso y mutantes en este gen presenta un fenotipo de retraso en la nodulación

Para Rhizobium leguminosarum bv. trifolii (Surin, 1990)

nodFE nodF tiene promotor con las características de una caja nod consenso y mutantes en estos genes presentan un fenotipo de retraso en la nodulación

nodLMN nodL tiene promotor con las características de una caja nod consenso y mutantes en estos genes presentan un fenotipo de retraso en la nodulación y reducen el espectro de plantas hospederas (Surin, 1988)





## **Regulación de la expresión de los genes de nodulación: los genes nodD**

La regulación de la expresión de los genes nod es un mecanismo de control importante en la primera parte de la simbiosis (Mulligan 1985). Los genes nodD son los responsables de la regulación positiva de los genes nod comunes y de especificidad. Los genes de nodulación se inducen en presencia de la flavona específica mediado por el producto de nodD, NodD. Se han descrito 1, 2 ó 3 copias funcionales de nodD en las diferentes especies de Rhizobium y se encuentran generalmente a un lado de nodA a una distancia que puede variar entre 300 pb o hasta varias kb (Göttfert, 1989) (figura 1). Se transcribe en forma divergente de nodA y se expresan constitutivamente tanto en vida libre como en simbiosis (Mulligan, 1985) salvo en Rhizobium leguminosarum bv. viceae donde se autoregula (Rosen, 1985). NodD se encuentra asociado a la membrana citoplásmica independientemente de la presencia o ausencia de inductor (Schlaman, 1989). nodD se expresa solamente en bacterias de la familia de las Rhizobiaceae (Yelton, 1987).

Para que el producto de nodD active la transcripción de los genes de nodulación requiere de: la presencia de compuestos flavonoides que son exudados por la raíz o la semilla de las leguminosas y que los genes de nodulación que sean inducidos por NodD tengan el promotor consenso, la caja nod, donde se une NodD y que representa la región de control transcripcional para los genes nod (Mulligan, 1989). En general nodD se une a la caja nod e inicia la transcripción, en presencia de la flavona, entre 26 - 28 pares de bases al 3' de la caja (Mulligan, 1989) actuando como multimerizado cuando se pega al DNA (Fisher, 1989; Honma, 1990). Por experimentos a sensibilidad a DNasa, nodD forma una huella de alrededor de 50 - 60 pares de bases cuando se une a la caja nod y alrededor de 25 - 85 al 5' del sitio de inicio de la transcripción (Mulligan, 1989).

Se tiene solo evidencia indirecta de que NodD interactúa con la flavona:

- a) la sustitución de un nodD de un Rhizobium por otro nodD de otro Rhizobium puede determinar el espectro de compuestos que inducen la expresión de genes nod y por lo tanto cambiar el espectro de infección (Spaink, 1987)
- b) mutantes en nodD pueden ampliar el espectro de plantas a nodular o el espectro de compuestos que puedan inducir (Mulligan,

Existen en los diferentes Rhizobia una o más copias de nodD que son capaces de detectar diferentes compuestos flavonoides:

En Rhizobium meliloti se han descrito 3 genes nodD (Rodríguez-Quiñones) nodD1, nodD2, y nodD3 (figural) que por secuencia son muy similares entre si (Honma, 1987):

NodD1 induce los genes nod en presencia de luteolina que se encuentra en el exudado de raíz de alfalfa (Peters, 1986). Se han identificado otros compuestos como la chalcona y crisoeriol como inductores (Hartwig, 1990, Maxwell, 1989). Por experimentos de sensibilidad a DNasa no presenta diferencia en su huella de pegado al DNA (footprint) en presencia de luteolina o sin inductor. La relación parece ser mas bien con la RNA<sub>pol</sub> Y no con la unión al DNA (Fisher, 1989).

NodD2 induce los genes nod en presencia de algún compuesto del exudado de raíz de alfalfa (Mulligan, 1989, Honma, 1990) y requiere de una secuencia localizada a su extremo 5' para su funcionamiento

NodD3 requiere de la presencia del locus syrM para inducir los genes nod en ausencia de inductor (Mulligan, 1989, Honma, 1990). Por experimentos de sensibilidad a DNasa, se observa que NodD3 genera un patron diferente al de NodD1, lo que indica que nodD3 se une en un sitio distinto al de NodD1 y que la unión a este otro sitio es independiente de la presencia de inductor. También pudiera ser que este patron se deba a la forma de purificación de NodD3 (Fisher, 1989). Además no se ven diferencias entre nodD1 y nodD3 cuando inician la transcripción, es decir, el transcrito comienza en el mismo sitio (Fisher, 1989).

Mutantes sencillas o dobles en estos genes nodD tienen un fenotipo Nod<sup>+</sup> con retraso en la nodulación. Con una triple mutante nodD1<sup>-</sup>nodD2<sup>-</sup>nodD3<sup>-</sup> o nodD1<sup>-</sup>nodD2<sup>-</sup>syrM<sup>-</sup> se obtiene fenotipo Nod<sup>-</sup>.

En Rhizobium leguminosarum bv. viceae existe una copia de nodD (figura 1) cuyo producto induce los genes nod en presencia de luteolina o narigenina (Zaat, 1987). Este nodD se autoregula y mutantes en este gen tienen fenotipo Nod<sup>-</sup> (Rossen, 1985).

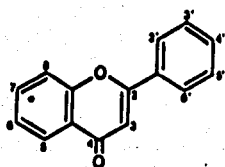
En Rhizobium leguminosarum bv. trifolii se ha descrito una copia de nodD (figura 1) cuyo producto induce a los genes nod en presencia de 7,4'-dihidroxi flavona (Redmond, 1986)

En Bradyrhizobium japonicum NodD1 induce a los genes nod en presencia de daidzeína o genisteína (Kosslak, 1987)

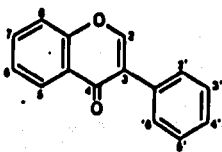
Se ha descrito además de nodD, otra molécula relacionada con la regulación de la expresión de nodABC (Kondorosi, 1989): en la cepa de Rhizobium meliloti AK631 existe una molécula represora de la expresión de nodABC que compite con la RNA<sub>pol</sub> por su sitio de unión entre los promotores sobrelapados de nodD y nodA. En ausencia de esta molécula aumentan los niveles de nodD y por lo tanto los niveles de nodABC se incrementan.

## Señales moleculares de la planta

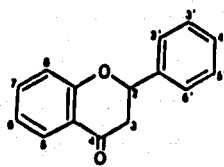
Las flavonas (figura 2), como se mencionó anteriormente, se necesitan para que se activen los genes de nodulación en presencia de NodD. Las raíces de las leguminosas producen una gran cantidad de compuestos flavonoides (Zaat, 1988) sin embargo la



FLAVONA



ISOFLAVONA



FLAVANONA

FIGURA 2

expresión de los genes nod es inducida por concentraciones muy bajas de flavonas y a los pocos minutos de su exposición (Zaat, 1987). Además de este efecto inductor de las flavonas, pueden presentar efectos represores sobre los genes nod dependiendo del Rhizobium:

las isoflavonas son inductores de los genes de nodulación de Rhizobia de crecimiento lento, pero inhiben la inducción de los nod en Rhizobia de crecimiento rápido (Firmin, 1986). Por otro lado la umbeliferona que es un compuesto flavonoide que se encuentra en el exudado de las raíces de trébol también tiene un efecto negativo sobre la inducción de los genes nod de Rhizobium leguminosarum bv. trifolii (Djordjevic, 1987).

Se ha demostrado por lo menos para el caso de la narigenina, que la entrada de la flavona a la célula no es un paso limitante para llevar a cabo la inducción de los genes nod (Recourt, 1989): la acumulación de narigenina en la célula no requiere de ninguna conversión metabólica ni del pSim, no se inhibe por otras flavonas, no hay sitios de alta afinidad, no se ve afectada por cambios de temperatura, no se satura y es muy reversible

## ANTECEDENTES

En el laboratorio hemos estado interesados en el proceso de nodulación entre Phaseolus vulgaris - Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli. Se han estado investigando 2 líneas principalmente:

-el estudio de las proteínas nódulo específicas de frijol, nodulinas

-el estudio de los genes bacterianos involucrados en el proceso de la nodulación específicamente nodD, nodA, nodB y nodC

El estudio de los genes de nodulación de Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli comenzó al construirse un banco genómico de DNA de la cepa silvestre CFN42 en cósmidos cuyo vector fue el pSUP205 (Simon, 1983). El tamaño promedio de los insertos iba de 30 - 50 kb. Con la idea de identificar a los cósmidos que llevaran los genes nodDABC, se hizo una primera selección probando el banco de cósmidos por hibridización contra un probador de nifHDK de Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli (pCQ12) (Quinto, 1982), dado que en otros sistemas descritos los genes nif se encuentran cerca de los genes nod. Posteriormente los cósmidos que dieron señal positiva se transfirieron por conjugación a la cepa CFN2001 curada del plásmido simbiótico (Nod<sup>-</sup> Fix) derivada de la cepa silvestre, con el objeto de hacer un ensayo de complementación para nodulación. Sólo 2 cósmidos, el pSM991 y el pSM927, complementaron para nodulación pero no para fijación de nitrógeno. Estos cósmidos se caracterizaron por enzimas de restricción y se hibridizaron con un probador de nodDABC de Rhizobium meliloti (pKSK5) (Kondorosi, 1984) identificandose los siguientes fragmentos en EcoR I:

pSM991(35 kb)	<u>nodD</u> 5.5 kb
	<u>nodABC</u> 7.2 kb (6.8 kb, Cevallos, 1989)
	<u>nifHDK</u> 4.6 kb
pSM927(30 kb)	<u>nodABC</u> 7.2 kb
	<u>nifHDK</u> 4.6 kb

El pSM927 era capaz de complementar para nodulación a la CFN2001 pero sorprendentemente no hibridizaba contra el probador de nodD.

Se caracterizaron de igual modo los cósmidos pSM828 y pSM367 debido a que hibridizaron con los genes nifb y nifc respectivamente, y contra nodD pero no complementaban la CFN2001 para nodular (Cevallos, 1989).

Del pSM991 se hicieron digestiones parciales con EcoR I para obtener deleciones y así conseguir el paquete mínimo de nodulación. Se obtuvieron entre otros el pSM991-40 de 5.5 kb, pSM991-B2 de 7.2 kb, pSM991-32 de 13.3 kb y el pSM991-25 de 18.8 kb que fue el único que seguía complementando a la cepa CFN2001 para nodulación. Con la caracterización de deleciones derivadas del pSM991 se identificaron 2 bandas esenciales para que se lleve

a cabo la complementación para nodular en la CFN2001:

nodABC 7.2 kb EcoR I

? 3.5 kb EcoR I

el resto de los derivados que no contenían estas dos bandas no complementaban para nodulación a la CFN2001. (Tesis de doctorado de Miguel Angel Cevallos y Cevallos, 1989).

Posteriormente se mutagenizó el pSM991-25 (Tesis de maestría de Martha Vázquez) con la cual se delimitaron los fragmentos esenciales de:

7.2 kb EcoR I que hibridiza con nodABC a 4 kb

3.5 kb EcoR I a 1 kb y cuyos productos se desconocían

Paralelamente al presente trabajo de maestría, Araceli Dávalos (tesis de maestría) y Martha Vázquez (tesis de doctorado) secuenciaron la banda de 7.2 kb EcoR I que hibridizaba con nodABC y la banda de 3.5 kb EcoR I respectivamente. Los resultados de las secuencias fueron sorprendentes:

a) en el fragmento de 7.2 kb EcoR I se encuentra un promotor con las características de una caja nod consenso, ORF1, ORF2, nodB y nodC

b) en el fragmento de 3.5 kb EcoR I se encuentra un promotor con las características de una caja nod consenso y nodA

Estos resultados eran sorprendentes ya que en los otros Rhizobia los genes comunes de nodulación nodA, nodB y nodC se encuentran formando un operón, sin embargo aún cuando en Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli estos genes nodBC y nodA no forman parte de la misma unidad transcripcional, tienen una alta homología con el resto de los nodABC descritos y posiblemente estén sujetos a la misma regulación.

## OBJETIVO

Dados estos antecedentes, se conocía la localización de nodA y nodBC así como su función esencial en la nodulación. Por otro lado se desconocía cómo eran regulados y cual era el papel de nodD(s) en dicha regulación ya que se tenía el cósmido pSM927 que no hibridizaba contra nodD pero complementaba para nodulación a la CFN2001 y los cósmidos pSM828 y pSM367 que no complementaban para nodulación a la CFN2001 pero daban señal de hibridización contra el probador de nodD indicando la posibilidad de más de una copia de nodD en la CE-3.

Para poder estudiar la regulación de los genes comunes de nodulación nodBC se hicieron inserciones en estos genes con el gen lacZ de Escherichia coli como gen reportero de la expresión de nodBC y se utilizaron la cepa silvestre CE-3 (Nod<sup>+</sup> Fix<sup>+</sup>) y la cepa curada del plásmido simbiótico derivada de la silvestre CFN2001 (Nod<sup>-</sup> Fix<sup>-</sup>).

De esta manera el objetivo del presente trabajo fue el de conocer cómo era la regulación de la expresión de los genes nodBC de Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli y el efecto de nodD en la regulación de estos genes.

## RESULTADOS

### 1. Aislamiento de fusiones del promotor de ORF1-ORF2-nodBC con el gen lacZ

Para poder estudiar la regulación de la expresión de nodBC y el papel de nodD en Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli, se mutagenizaron los plásmidos PSM991-B2 (ORF1-ORF2-nodBC) y el PSM991-32 (nodD, ORF1-ORF2-nodBC) con el bacteriófago MudIIPR13 (Ratet, 1989) formando fusiones traduccionales con el gen lacZ de Escherichia coli usándose como gen reportero de la expresión de los genes nodBC.

Se seleccionaron 3 inserciones en PSM991-B2:

PAP4 inserción en ORF1

PAP7 inserción en nodC

PAP11 inserción al extremo 3' de nodC, fuera de este gen

Se seleccionaron 3 inserciones en PSM991-32:

PAP21 inserción en nodB

PAP25 inserción en nodC (análoga a la PAP7)

PAP27 inserción al extremo 3' de nodC, fuera de este gen (análoga a la PAP11)

Se seleccionaron además fusiones en PSM991-25 (Cevallos, 1989):

PMV13.2 inserción en el extremo 5' de nodC

PMV16.1 inserción en el extremo 3' de nodC (análoga a la PAP7 y PAP25)

PMV17.1 inserción al extremo 3' de nodC, fuera de este gen (análoga a la PAP11 y PAP27)

Los mapas de los plásmidos y de las mutantes se encuentran en la figura 3.

### 2. Expresión del promotor de ORF1-ORF2-nodBC en PSM991-B2 en las cepas CE-3 y CFN2001

Como primer experimento para determinar la expresión e inducción de nodBC, las mutantes PAP4, PAP7 y PAP11 se introdujeron como cointegrados con el pNC206 por conjugación a la cepa CE-3 y a la cepa curada del plásmido simbiótico derivada de la cepa silvestre, CFN2001. Las actividades específicas de  $\beta$  galactosidasa se determinaron en presencia de naringenina 120 nM y genisteína 440 nM. Estas concentraciones se utilizaron por lo

reportado por una colaboración con el grupo del Dr. B.J.J. Lugtenberg de la Universidad de Leiden, Holanda. Los resultados se encuentran en la tabla 2 y en las figuras 4 y 5.

En CE-3pAP4 se observó una inducción de 11 y 14 veces, en CE-3pAP7 de 8 y de 10 veces y en CE-3pAP11 de 3 y 4 veces con naringenina y genisteina respectivamente. Mientras que en CFN2001pAP4, CFN2001pAP7 y CFN2001pAP11 no presentaron inducción con ninguno de los inductores.

Estos datos indican que las moléculas regulatorias se encuentran en el plásmido simbiótico. Se observa también que las fusiones estando en multicopia y en menor número de copias los reguladores se logra obtener la inducción. Si se pone en menor número de copias las fusiones se sigue obteniendo inducción pero con menor número de veces de inducción.

### 3. Complementación en CFN2001pMP154 con los cósmidos pSM927, pSM367 y pSM828 para la identificación de nodD(s)

Como se pudo observar en el experimento anterior, en el plásmido simbiótico de la CE-3 van las moléculas responsables (nodD) de inducir los genes nodBC. Para ubicar el gen(es) nodD se buscó por complementación a la cepa CFN2001pMP154 este gen (nodD) que pudiera complementar para la inducción que se observa en la cepa silvestre CE-3pAP7, con los cósmidos pSM927 que complementa para nodulación a la CFN2001 pero no da señal de hibridización contra un probador de nodD, con el pSM828 y el pSM367 que no complementan para nodulación a la CFN2001 pero hibridizan contra un probador de nodD. El pMP154 lleva una fusión del promotor de nodA de Rhizobium leguminosarum bv. viceae con lacZ (Zaat, 1987) que se induce 10 y 13 veces con naringenina 120 nM y genisteina 440 nM respectivamente de forma similar a la CE-3pAP4. Por esta razón de presentar un número similar de veces de inducción se utilizó este plásmido. Como inductores se utilizaron naringenina, genisteina y exudado de raíz de frijol concentrado 10 veces. Los resultados se encuentran en la tabla 3 y en la figura 6.

Ninguno de los cósmidos complementó para inducción indicando que el pSM828 y el pSM367 que dan señal de hibridización contra nodD no llevan una copia funcional de este gen y el pSM927 tampoco lleva una copia funcional de nodD pero es capaz de complementar para nodulación la CFN2001 posiblemente por la síntesis de escape de nodA, y nodBC amplificada por el efecto multicopia del plásmido pNC206.

### 4. Expresión del promotor de ORF1-ORF2-nodBC en pSM991-25 en las cepas CE-3 y CFN2001

El pSM991-25 lleva al igual que el pSM991-B2 ORF1-ORF2-nodBC (7.2 kb EcoR I) pero a diferencia de este lleva además nodA (3.5 kb EcoR I), 0.6 kb EcoR I, 2.0 kb EcoR I y nodD (5.5 kb EcoR I) lo que le permite complementar para nodulación a la CFN2001. Por esta razón nos interesaba saber cómo se encontraba la expresión de nodBC con el nodD putativo que se encuentra en



esta construcción. Se introdujeron como cointegrados con el pNC206 por conjugación a la CFN2001 y CE-3 las mutantes pMV13.2, pMV16.1 y pMV17.1 y se determinaron las actividades específicas de  $\beta$  galactosidasa de cada una en presencia de naringenina y genisteína. Los resultados se encuentran en la tabla 4 y en las figuras 7 y 8.

Las 3 fusiones en los plásmidos pMV13.2, pMV16.1 y pMV17.1 tanto en CE-3 como en CFN2001 se encuentran expresandose en forma alta (niveles de inducción) y constitutiva (en ausencia de inductor) indicando que el pSM991-25 se encuentra desregulado, es decir, ya no se requiere de inductor para su expresión. Se observa una inhibición de la expresión con naringenina en los 3 plásmidos, pMV13.2, pMV16.1 y pMV17.1, de 44%, 37% y de 30% respectivamente en CE-3 y de 46%, 37% y de 12% respectivamente en CFN2001. Aunque el porcentaje de inhibición por naringenina en ambas cepas es semejante, las expresiones en CFN2001 son menores que en CE-3 indicando posiblemente que en CE-3 hay más moléculas involucradas en la regulación o esto es un fenómeno de expresiones basales de estas dos cepas que podría contribuir en esta diferencia.

##### **5. Expresión del promotor de ORF1-ORF2-nodBC en pSM991-32 en CE-3 y CFN2001**

Para ir delimitando en que parte del pSM991-25 va la secuencia responsable de esta desregulación en la expresión de nodBC, se utilizaron las mutantes en nodBC en el pSM991-32 que lleva los fragmentos de nodD (5.5 kb EcoR I), de 0.6 kb EcoR I y ORF1-ORF2-nodBC (7.2 kb EcoR I) eliminando los fragmentos de nodA (3.5 kb EcoR I) y el de 2.0 kb EcoR I que van en el pSM991-25. Se determinaron las actividades específicas de  $\beta$  galactosidasa en presencia de naringenina y genisteína. Los resultados se encuentran en la tabla 5 y en las figuras 9 y 10.

Los resultados demuestran que la desregulación de la expresión, alta constitutiva, se mantiene presente en estas construcciones apuntando al fragmento de 5.5 kb y/o al de 0.6 kb como responsables de este fenotipo. La inhibición de la expresión por naringenina también se repite en los 3 plásmidos pAP21, pAP25 y pAP27 en CE-3 de 61%, 50% y 44% respectivamente y en CFN2001 en pAP25 es de 32%. La inhibición por naringenina es mayor en estas fusiones que las que se encuentran en pSM991-25 (pMV13.2, pMV16.1 y pMV17.1) debido posiblemente a que es menor la expresión en estas mutantes que las que se encuentran en pSM991-25. Pudiera deberse esta diferencia también a que las fusiones se encuentran en lugares distintos o por ser fusiones traduccionales presentarían una estabilidad distinta.

## 6. Caracterización de la desregulación de la expresión de nodBC.

Como se había observado, nodBC en pSM991-25 y pSM991-32 se encuentra desregulada su expresión (alta constitutiva) tanto en CE-3 como en CFN2001 a diferencia del pSM991-B2 que no se expresa ni se induce en CFN2001 pero si hay inducción en CE-3 en presencia de inductor. Para determinar cual de los fragmentos es el responsable de la desregulación de la expresión de nodBC en estas construcciones, si es el de 5.5 kb EcoR I o el de 0.6 kb EcoR I ya que estos fragmentos son los que comparten estos 2 plásmidos (el pSM991-25 y el pSM991-32), se complementó la cepa CFN2001pMP154 con el pSM991-40 que lleva solo el fragmento de 5.5 kb EcoR I y que hibridiza contra nodD, con el pSM991-25 que lleva los fragmentos de 5.5 kb EcoR I, 0.6 kb EcoR I, 7.2 kb EcoR I (ORF1-ORF2-nodBC), 2.0 kb EcoR I y 3.5 kb EcoR I (nodA) y con el pSM991 que es el plásmido de donde se obtuvieron los anteriores, y que lleva además de lo que tiene el pSM991-25, nifHDK, y varios fragmentos en EcoR I equivalentes a casi 19 kb. Se determinaron las actividades específicas de  $\beta$  galactosidasa con narigenina, genisteína y exudado de raíz de frijol concentrado 10 veces. Los resultados se encuentran en la tabla 6 y en la figura 11. El pSM99-40 y el pSM991-25 presentan en esta complementación la desregulación de la expresión del pMP154, alta constitutiva, lo que indica que en el fragmento de 5.5 kb EcoR I va codificada la molécula(s) responsable(s) de este fenómeno. También se repite la inhibición por narigenina con el pSM991-25 y el pSM991-40 de 49% y 37% respectivamente y también el pSM991-25 presentó inhibición con el exudado de raíz de frijol de 36%. Esta inhibición demuestra que en el exudado va la narigenina a una concentración suficiente para inhibir y que las otras flavonas que van también en el exudado no compiten con la narigenina. Por otro lado el cósmido pSM991 de donde se obtuvieron las deleciones no complementa para la desregulación, es decir, no presenta niveles altos constitutivos pero tampoco es posible su inducción. Al parecer en las casi 19 kb que se le quitaron al pSM991 para dar el pSM991-25 va la molécula(s) responsables de regular la expresión o actividad del activador que se encuentran en el fragmento de 5.5 kb EcoR I (posiblemente un nodD) y además esto sugiere que en el resto del plásmido simbiótico fuera de lo cubre el pSM991 se encuentra codificada la molécula responsable de desactivar este represor para liberar la actividad de este posible nodD y activar los genes nod.

## 7. Inhibición e inducción por narigenina de la expresión de nodC en pSM991-25 y pSM991-B2 en CE-3 y CFN2001.

Hasta este momento se tenían 2 fenómenos interesantes: la desregulación de la expresión de nodBC, alta constitutiva, en el pSM991-25 y la inhibición de esta expresión por narigenina. Para tratar de determinar a que nivel se da esta inhibición que presenta la narigenina sobre la expresión de nodBC en el pSM991-25 se hizo una cinética con narigenina a diferentes tiempos usando el pMV16.1 tanto en CE-3 como en CFN2001 y el pAP7 en CE-3: Control, 18 hrs de crecimiento sin narigenina, Tratados a) 18 hrs de crecimiento con narigenina, b) se agregó narigenina a las 14 hrs de crecimiento y se incubó hasta las 18 hrs (4 hrs con narigenina), c) se agregó narigenina a las 16 hrs de crecimiento y se incubó hasta las 18 hrs (2 hrs con narigenina), y d) se

agregó narigenina a las 18 hrs de crecimiento y se detuvo el crecimiento inmediatamente (0 hrs con narigenina). Se determinaron las actividades específicas de  $\beta$  galactosidasa y los resultados se encuentran en la tabla 7 y en las figuras 12, 13 y 14. La inhibición que se da por narigenina en CE-3pMV16.1 a los tiempos 18 hrs, 4 hrs, 2 hrs y 0 hrs es de 36%, 46%, 44% y 50% respectivamente y para la CFN2001pMV16.1 con los mismos tiempos la inhibición fue de 37%, 48%, 48% y 38%. El efecto de la narigenina es inmediato y se da probablemente no a nivel de transcripción de nodBC sino a nivel postranscripcional. Esto se puede afirmar ya que a las 18 hrs sin narigenina en el medio se tiene el 100% de expresión de nodBC fusionada con  $\beta$  galactosidasa y que al agregar narigenina a las 0 hrs a 4<sup>o</sup> C, temperatura a la que se para la transcripción, del 100% se baja a aproximadamente a un 40%. Si fuera a nivel de transcripción esta inhibición en estas mismas condiciones no sucedería, se debería tener el 100% de la actividad. En cuanto a la CE-3pAP7 a las 2 hrs y 4 hrs con narigenina se obtiene aproximadamente un 60% de la inducción y a 0 hrs no se obtiene ninguna inducción indicando esta velocidad de inducción probablemente que para que comience la inducción se requiere de síntesis de nov de alguna otra molécula.

## DISCUSION

Las bacterias de la familia de las Rhizobiaceae son capaces de infectar las raíces de las leguminosas y establecer una asociación específica, la simbiosis, destinada para fijar nitrógeno atmosférico dentro de un nuevo órgano formado por la raíz de la planta para este fin, el nódulo. Los genes nod comunes y de especificidad de Rhizobium se inducen cuando la bacteria se pone en contacto con los compuestos flavonoides exudados por las raíces de las leguminosas mas el producto de una proteína regulatoria codificada por el gen nodD, NodD, la cual activa los genes nod.

Para el estudio de la inducción de los genes nodABC por medio de NodD y el compuesto flavonoide, la estrategia que mas se ha usado es la de construir fusiones nodC::lacZ en los diferentes Rhizobia. En Rhizobium meliloti se han descrito 3 copias de nodD: NodD1 induce nodC::lacZ en presencia de luteolina (Peters, 1986) NodD2 induce nodC::lacZ con algún compuesto del exudado de raíz (Mulligan, 1989, Honma, 1990) NodD3 induce nodC::lacZ en ausencia de inductor, pero requiere de la presencia de otro locus, syrM (Mulligan, 1989, Honma, 1990) Rhizobium leguminosarum bv. viceae tiene una copia de nodD y cuyo producto induce nodC::lacZ en presencia de naringenina o luteolina (Zaat, 1987) Rhizobium leguminosarum bv. trifolii tiene una copia de nodD y cuyo producto induce nodC::lacZ en presencia de 7,4'-dihydroxiflavona (Redmond, 1986) Bradyrhizobium japonicum tiene dos copias de nodD: NodD1 induce nodC::lacZ en presencia de daidzeína o genisteína (Kossiak, 1987) Se requiere entonces para la inducción de nodABC por lo menos una copia de nodD y la flavona correspondiente.

Para el estudio de la regulación de la expresión de ORF1-ORF2-nodBC de Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli se utilizaron dos cepas: CE-3 cepa silvestre Nod<sup>+</sup> Fix<sup>+</sup> (Noel, 1984) CFN2001 cepa curada del plásmido simbiótico, Nod<sup>-</sup> Fix<sup>-</sup> (Palacios, 1983)

### **Inducción de los genes nodBC de Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli**

Para poder estudiar la regulación de los genes nodBC de Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli e identificar las moléculas involucradas en la dicha regulación se mutagenizó el pSM991-B2 (ORF1-ORF2-nodBC) con el bacteriófago MudiIPR13 (figura 17) para formar fusiones traduccionales con el gen lacZ y usarlo como gen reportero del promotor de ORF1-ORF2-nodBC (figura 3). Por los datos de la secuencia del fragmento de 7.2 kb EcoR I del pSM991-

B2 (tesis de maestría de Araceli Dávalos) se demostró que nodA no se encuentra en la misma unidad transcripcional con nodBC que van precedidos por 2 ORFs. Estos genes ORF1-ORF2-nodBC se encuentran contiguos y posiblemente formen un operón. Se seleccionaron 3 mutantes en pSM991-B2 (figura 3) y por los datos de las actividades específicas de  $\beta$  galactosidasa (figura 4) se observó inducción de estos genes nod en CE-3:

el pAP4 tiene más veces de inducción tanto con naringenina como genisteína (10 veces y 14 veces de inducción respectivamente) que el pAP7 y el pAP11 posiblemente debida a su cercanía al promotor, el pAP7 presenta 8 veces y 10 veces de inducción y el pAP11 se induce menos que el pAP4 y pAP7 (3 veces y 4 veces). Esta inserción pAP11 se encuentra fuera de nodC e inserciones análogas a esta mutante en pSM991-25 son Nod<sup>+</sup> (ie pmV17.1) en la cepa CFN2001. Puede deberse su expresión a que: a) sea un "read through" ya que por secuencia no hay posibles terminadores de la transcripción después de nodC; de 8 veces y 10 veces de inducción que presenta la CE-3pAP7 con naringenina y genisteína, la CE-3pAP11 presenta una reducción drástica en número de veces de inducción, de 3 veces y 4 veces con naringenina y genisteína; b) o que se encuentre en este sitio algún otro gen nod no esencial para la nodulación como sería el caso de nodIJ de Rhizobium leguminosarum bv. viceae que se encuentran al extremo 3' de nodC, se transcriben a partir del promotor de nodA y mutantes en estos genes retrasan la nodulación.

No se observó ninguna inducción de estas inserciones (pAP4, pAP7 y pAP11) ni con naringenina ni genisteína en la cepa CFN2001 (figura 5). Este resultado confirmó que en el plásmido simbiótico, pSim, de la CE-3 van las moléculas regulatorias (nodD(s)) responsables de la inducción de los genes ORF1-ORF2-nodBC. Aún cuando al estar en multicopia las fusiones y en menor número las moléculas regulatorias en el pSim, es posible lograr la inducción, indicando que se requieren de pocas moléculas regulatorias para poder llevar a cabo la inducción. Por datos de Martha Vázquez, al recombinar una fusión en nodA en el pSim, el número de veces de inducción que se observa como cointegrado baja de 10 a 5 veces.

Tanto la naringenina (flavanona) como la genisteína (isoflavona) a pesar de las diferencias estructurales que presentan (Zaat, 1989) el doble enlace entre C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub> y el anillo B pegado en C<sub>2</sub> o C<sub>3</sub> (figura 2) son buenos inductores de ORF1-ORF2-nodBC de Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli considerado como Rhizobium de crecimiento rápido. Estos compuestos se encuentran formando parte del exudado de semilla y de raíz de frijol (comunicación personal con Ma. Angela Hungría). Sin embargo las

isoflavonas, como la genisteína, que son inductores de los genes nod de Rhizobia de crecimiento lento como Bradyrhizobium japonicum o Rhizobium fredii (Kosslack, 1987) son inhibidores de la inducción de los genes nod de Rhizobia de crecimiento rápido como Rhizobium leguminosarum bv. viceae (Firmin, 1986). Esto no se puede generalizar ya que las isoflavonas son buenos inductores de los genes de nodulación de Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli considerado de crecimiento rápido. Debería de buscarse una relación de consensos específicos con los genes nodD y con las cajas nod entre Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli y los Rhizobia de crecimiento lento y tratar de ubicar esta relación tan particular que existe entre estas 2 especies de Rhizobium.

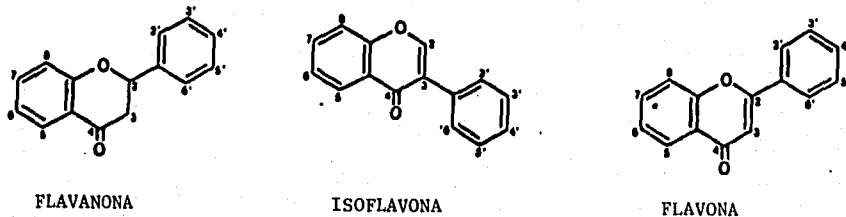


FIGURA 2

### El gen nodD

Como se pudo observar, es en el pSim donde van codificadas las moléculas reguladoras (nodD(s)) de los genes nod. Como se estaba interesado en identificar estas moléculas se buscó la presencia del gen nodD(s) que pudiera inducir a nodBC con naringenina, genisteína o exudado de frijol tal como sucede en CE-3pAP4. en los cósmidos pSM828 y pSM367 que daban señal de hibridación contra un probador de nodD pero no complementaban para nodulación a la CFN2001 y en el cósmido pSM927 que no hibridaba contra el probador de nodD pero complementaba para nodulación a la CFN2001 (Cevallos, 1989). El cósmido pSM991 que da señal positiva de hibridación contra nodD se discutirá mas adelante. Para este fin se utilizó la CFN2001 con el pMP154 que lleva una fusión del promotor de nodA de Rhizobium leguminosarum bv. viceae con lacZ (Zaat, 1987) complementado en trans con estos cósmidos. Los cósmidos pSM828 y pSM367 no complementaron para la inducción del pMP154 con los inductores probados: naringenina, genisteína o exudado de frijol (figura 6). En estos cósmidos por lo tanto no se encuentra ninguna otra copia funcional de nodD. Esto se puede afirmar debido a que con sólo la presencia de un nodD y su inductor específico es suficiente para inducir los genes nod (Honma, 1987, Mulligan, 1989, Honma, 1990). El pSM927 no da señal de hibridación contra nodD y además no complementa para la función de nodD a la cepa CFN2001pMP154 (figura 6), sin embargo a la CFN2001 es capaz de complementarla para nodulación (Cevallos, 1989). Esto se debe a que la síntesis de escape de los genes nodBC y nodA amplificada por el efecto multicopia del pNC206 permite la complementación para nodulación a la cepa CFN2001. Se tiene evidencia de que se requiere muy poco transcrito de nodABC para nodular ya que con una mutación en

nodD1 en Rhizobium meliloti casi no se induce nodC, pero sigue nodulando esta mutante:

La cepa JM57 derivada de la cepa de Rhizobium meliloti Rm1021 lleva una fusión nodC::lacZ; la cepa JM81 lleva nodD1::Tn5 y nodC::lacZ. La JM57 se induce 5 veces con inductor y la JM81 se induce 1.6 veces con inductor. Por datos de hibridización (comunicación personal con Maluye Girard) con un probador intra nodD, se sabe que hay otra banda que da señal positiva de aproximadamente 13 kb BamH I al extremo 5' del inicio de nodA. Habría que complementar con esta clona la CFN2001pMP154 para saber si este fragmento lleva una copia funcional de nodD.

### **Expresión alta constitutiva y represión de nodBC.**

Faltaba saber cómo se estaban expresando nodBC en el pSM991 y sus derivados ya que este hibridizaba contra nodD. La expresión de nodBC se analizó entonces mediante inserciones en estos genes en los plásmidos a) pMV13.2, pMV16.1 y pMV17.1 (pSM991-25 que complementa para nodulación a la CFN2001 y que lleva en fragmentos de EcoR I nodA (3.5 kb), 2.0 kb, ORF1-ORF2-nodBC (7.2 kb), 0.6 kb, nodD (5.5 kb por hibridización), b) PAP21, PAP25 y PAP27 (pSM991-32 que lleva en fragmentos de EcoR I ORF1-ORF2-nodBC (7.2 kb), 0.6 kb, nodD (5.5 kb)) en CE-3 y en CFN2001 y por complementación a la cepa CFN2001pMP154 con el pSM991-25 y el pSM991-40 (5.5 kb nodD) en presencia de narigenina, genisteína y exudado de raíz de frijol.

La expresión de nodBC en estas 8 construcciones se encuentra a niveles altos constitutivos en ausencia de inductor tanto en CE-3 como en CFN2001 (figuras 7, 8, 9, 10, 11), es decir, se encuentra desregulada su expresión. Esto indica que el activador de nodBC se encuentra presente y en forma activa, no requiere de la flavona para inducir estos genes y se encuentra codificada en el fragmento de 5.5 kb EcoR I. Se tienen identificadas 2 inserciones en el fragmento de 5.5 kb en pSM991-25 (pMV3 y pMV4) que cubren una distancia de aproximadamente 1.5 kb cerca del sitio BamH I y dichas inserciones en CFN2001pMP154 no complementan para la expresión alta constitutiva del pMP154 como se ve en el pSM991-25. Esto indica que en esas 1.5 kb va codificado el activador de la expresión de nodBC o posiblemente también el activador del activador. En R. meliloti nodC presenta también niveles de expresión altos constitutivos en ausencia de inductor por efecto de nodD3 y de syRM (Mulligan, 1989, Honma, 1990). De igual manera es posible que al aumentar las copias de syRM y nodD3 ya no se requiera del inductor (Honma, 1990), pero por otro lado se tiene

evidencia de que al aumentar el número de copias de nodC y nodD en Rhizobium leguminosarum bv. viceae no hay expresión de nodC a niveles de inducción sin inductor (Rossen, 1985; Zaat, 1987; Maagd, 1989). Sin embargo en el presente caso no se puede descartar la posibilidad de que en el fragmento de 5.5 kb EcoR I vaya una pareja de genes como nodD3-syrM.

Las expresiones de pmV13.2, pmV16.1 y pmV17.1 en CE-3 son mayores que en CFN2001 indicando probablemente que si bien es un efecto real que apuntaría a más moléculas regulatorias en el pSim o un efecto propio de expresión basal de la CFN2001 y de la CE-3. Además estas fusiones pmV13.2, pmV16.1 y pmV17.1 en CE-3 son también mayores que las fusiones pAP21, pAP25 y pAP27 en CE-3. Esto podría explicarse de 2 maneras: o en el pSM991-25 en el fragmento de 3.5 kb o en el de 2.0 kb, va codificada alguna molécula que contribuya a una mejor expresión de nodBC, o que las diferencias que se ven se debe a que las inserciones no son las mismas y que como son fusiones traduccionales, la proteína híbrida puede tener un comportamiento distinto. Esta es la razón del porque es muy difícil compara una fusión traduccional con otra. Comparando cada grupo de mutantes (pmV13.2, pmV16.1, pmV17.1) (pAP21, pAP25, pAP27) entre ellas mismas, se observa que la que tiene más expresión es la que esta más cercana al promotor y la que menos expresión tiene es la que se encuentra al extremo 3'.

La presencia de este activador que esta desregulando la expresión de nodBC indicaría que en el resto del pSim fuera de lo que cubre el pSM991-25 va la molécula responsable de evitar que esta desregulación suceda. La existencia del represor fue evidente cuando se complementó el pSM991, el cósmido del cual se obtuvieron las demas construcciones (tabla 1), con la CFN2001pMP154. El pSM991 en esta cepa sorprendentemente no presentó esta expresión desregulada, alta constitutiva, aún cuando lleva el fragmento de 5.5 kb EcoR I (figura 6). Este cósmido pSM991 tiene 3 veces más actividad que el control (CFN2001pMP154) debido posiblemente a que la relación represor-activador no es total, es decir, puede haber un escape de esta relación y esto verse en las 3 veces más de expresión que la CFN2001pMP154 (figura 15). Posiblemente este represor podría estar actuando en CE-3 o bien a nivel de la regulación de la transcripción de nodBC o de nodD (el activador) o bien a nivel de actividad de la molécula activadora. En las casi 19 kb que se le quitaron al pSM991 para dar el pSM991-25 va este represor que regula la actividad del gen(es) codificado en el fragmento de 5.5 kb EcoR I (nodD). Sorprendentemente el pSM991 no solo no presentó los niveles altos constitutivos sino que la información que lleva no es suficiente para inducir la CFN2001pMP154 con narigenina, genisteina ni con exudado de raíz de frijol. La presencia de este represor en el pSM991 implica además que se requiere de otra molécula probablemente un sensor del inductor que debe de encontrarse en el plásmido simbiótico fuera de lo que cubre el pSM991 puesto que ni aún con inductor es posible la inducción. Se ha descrito en una cepa de Rhizobium meliloti AK631 la presencia de un represor que compite con la RNA polimerasa por su sitio de unión entre los promotores sobrelapados de nodD y nodA (Kondorosi, 1989). En ausencia de



este represor aumentan los niveles de nodD y por lo tanto aumentan los niveles de nodC inducido. Pareciera que este represor está relacionado en la regulación fina de la expresión de nodABC en la cepa de Rhizobium meliloti AK631 dado que las mutantes en este represor nodulan menos que las silvestres.

### **Inhibición de la expresión de nodBC por naringenina**

La naringenina es una flavanona que funciona como inductor como se puede ver en las fusiones pMP154, pAP4, pAP7 y pAP11 en CE-3 que se inducen 10, 10, 8 y 3 veces respectivamente. Sin embargo la naringenina presenta un fenómeno de inhibición en las expresiones de nodBC en: a) pSM991-25 (pMV13.2, pMV16.1 y pMV17.1) de 44%, 36% y 30% en CE-3 y de 45%, 36% y 12% en CFN2001 respectivamente (figuras 7 y 8), b) pSM991-32 (pAP21, pAP25 y pAP27) de 61%, 50% y 43% en CE-3 respectivamente y de 32% en CFN2001pAP25 (figuras 9 y 10), c) CFN2001pMP154 complementado con pSM991-25 y pSM991-40 de 49% y 37% respectivamente (figura 11). También el exudado de raíz de frijol presentó una inhibición de la actividad en CFN2001pMP154pSM991-25 de 36% indicando que la cantidad de naringenina que va en el exudado de la raíz de frijol es suficiente para inhibir y que no se ve afectada por las otras flavonas que van también en el exudado (figura 11). El porcentaje de inhibición que presentan estos 2 grupos de mutantes en pSM991-25 (pMV13.2, pMV16.1 y pMV17.1) y en pSM991-32 (pAP21, pAP25 y pAP27) es similar para cada grupo tomando en cuenta la desviación estandar de cada uno, tanto en CE-3 como en CFN2001. Sin embargo comparando los porcentajes de inhibición entre las mutantes en pSM991-25 y pSM991-32 se observa que hay una mayor inhibición por naringenina en pSM991-32. Esto podría explicarse de igual manera que las diferencias de expresión que se ven entre estas 2 construcciones: a) o bien hay algo en el pSM991-25 que permita una menor inhibición de la expresión de nodBC por naringenina, b) o que las fusiones en pSM991-25 no son las mismas que en pSM991-32 dando una actividad diferente, c) o dado que son fusiones traduccionales, presentarían las proteínas fusionadas con  $\beta$  galactosidasa un comportamiento distinto, d) o se debe a que las fusiones en pSM991-25 se expresan más que las del pSM991-32.

Esta inhibición por naringenina sugiere algún tipo de regulación debido a que aún cuando presentan diferencias en sus expresiones estas inserciones sin naringenina, es decir, presenta más expresión la inserción más 5' y menor expresión la más 3', al agregarle naringenina hay una nivelación en las expresiones de estas inserciones. Por este efecto de la naringenina era importante

este represor aumentan los niveles de nodD y por lo tanto aumentan los niveles de nodC inducido. Pareciera que este represor está relacionado en la regulación fina de la expresión de nodABC en la cepa de Rhizobium meliloti AK631 dado que las mutantes en este represor nodulan menos que las silvestres.

### Inhibición de la expresión de nodBC por naringenina

La naringenina es una flavanona que funciona como inductor como se puede ver en las fusiones pMP154, pAP4, pAP7 y pAP11 en CE-3 que se inducen 10, 10, 8 y 3 veces respectivamente. Sin embargo la naringenina presenta un fenómeno de inhibición en las expresiones de nodBC en: a) pSM991-25 (pMV13.2, pMV16.1 y pMV17.1) de 44%, 36% y 30% en CE-3 y de 45%, 36% y 12% en CFN2001 respectivamente (figuras 7 y 8), b) pSM991-32 (pAP21, pAP25 y pAP27) de 61%, 50% y 43% en CE-3 respectivamente y de 32% en CFN2001pAP25 (figuras 9 y 10), c) CFN2001pMP154 complementado con pSM991-25 y pSM991-40 de 49% y 37% respectivamente (figura 11). También el exudado de raíz de frijol presentó una inhibición de la actividad en CFN2001pMP154pSM991-25 de 36% indicando que la cantidad de naringenina que va en el exudado de la raíz de frijol es suficiente para inhibir y que no se ve afectada por las otras flavonas que van también en el exudado (figura 11). El porcentaje de inhibición que presentan estos 2 grupos de mutantes en pSM991-25 (pMV13.2, pMV16.1 y pMV17.1) y en pSM991-32 (pAP21, pAP25 y pAP27) es similar para cada grupo tomando en cuenta la desviación estándar de cada uno, tanto en CE-3 como en CFN2001. Sin embargo comparando los porcentajes de inhibición entre las mutantes en pSM991-25 y pSM991-32 se observa que hay una mayor inhibición por naringenina en pSM991-32. Esto podría explicarse de igual manera que las diferencias de expresión que se ven entre estas 2 construcciones: a) o bien hay algo en el pSM991-25 que permita una menor inhibición de la expresión de nodBC por naringenina, b) o que las fusiones en pSM991-25 no son las mismas que en pSM991-32 dando una actividad diferente, c) o dado que son fusiones traduccionales, presentarían las proteínas fusionadas con  $\beta$  galactosidasa un comportamiento distinto, d) o se debe a que las fusiones en pSM991-25 se expresan más que las del pSM991-32.

Esta inhibición por naringenina sugiere algún tipo de regulación debido a que aún cuando presentan diferencias en sus expresiones estas inserciones sin naringenina, es decir, presenta más expresión la inserción más 5' y menor expresión la más 3', al agregarle naringenina hay una nivelación en las expresiones de estas inserciones. Por este efecto de la naringenina era importante

saber a que nivel se esta dando esta regulaci3n. Para contestar esta pregunta se hizo una cin3tica de inhibici3n por narigenina a la CE-3pMV16.1 y la CFN2001pMV16.1 y se us3 como control de inducci3n la CE-3pAP7. Los tiempos que se tomaron fueron: a) 18 hrs totales con narigenina, b) 18 hrs sin narigenina, c) se agreg3 narigenina a las 14 hrs de crecimiento y se incub3 4 hrs m3s, d) se agreg3 narigenina a las 16 hrs de crecimiento y se incub3 2 hrs m3s y e) se agreg3 narigenina a las 18 hrs de crecimiento y se detuvo el crecimiento inmediatamente. No se ve diferencia en los porcentajes de inhibici3n por narigenina en cualquiera de los tiempos tomados (figuras 12 y 13). La inhibici3n del 40% de la actividad no se puede explicar por un evento de la transcripci3n de nodC, mas bien lo que se observa se puede deber a una regulaci3n postranscripcional. En el tiempo de 0 hrs antes de agregarle la narigenina se tiene el 100% de actividad, es decir, expresi3n de nodBC fusionada con lacZ, y al agregarle la narigenina y detener el crecimiento inmediatamente a 4°C se registra la inhibici3n de la actividad. Probablemente la narigenina se pegue a la prote3na fusionada y modifique su actividad. El mecanismo de la inhibici3n de la expresi3n del pMP154 que se ve en CFN2001pMP154pSM991-25/pSM991-40 a las 18 hrs podr3a ser diferente al del sistema de inhibici3n que se ve sobre la expresi3n de nodBC en pSM991-25, ya que la fusi3n que va en el pMP154 es transcripcional y se tendr3a que hacer la misma cin3tica del exprimento anterior y esperando que al tiempo de 0 hrs no haya inhibici3n. En este caso la narigenina se pegar3a a la prote3na naciente e inhibir3a la continuaci3n de la transcripci3n. Como control de inducci3n se us3 la CE-3pAP7 usando los mismos tiempos: 18 hrs. con narigenina, y se agreg3 narigenina a las 3ltimas 4hrs., 2 hrs., y 0 hrs.. En las 3ltimas 4 hrs. y 2 hrs. de crecimiento con narigenina se llega a un 61% de actividad mientras que a 0 hrs. no hay ninguna inducci3n (figura 14). Esta velocidad de inducci3n sugiere que debe de haber un s3ntesis de novo de otro producto en la c3lula para llevar a cabo la inducci3n. Ya que no hay mol3cula activadora presente que requiera de la modificaci3n de la flavona para inducir porque si s3 hubiera, el efecto activador v3a narigenina deber3a de verse inmediatamente dada su r3pida entrada a la c3lula y a su r3pido efecto sobre la expresi3n de nodBC. La entrada de narigenina no es un paso limitante debido a las caracter3sticas que presenta la narigenina para entrar a la c3lula (Recourt. 1989): la narigenina se acumula en la c3lula sin ninguna conversi3n metab3lica hasta 80 veces, no se requiere del pl3smido simbi3tico, no se satura y es muy reversible, no se inhibe por otras flavonas, no hay sitios de alta afinidad, entra la narigenina en 1 3 2 minutos a una concentraci3n de 100 nM fuera de la c3lula y la entrada no se ve afectada por cambios en la temperatura a 4°C o a 28°C. Esta inhibici3n de la actividad que presenta la narigenina no es un efecto inespecifico ni general ya que inserciones en el pSM991-25 en nodA que ocasionan fenotipo Nod<sup>-</sup> en la cepa CFN2001, y que tienen la misma caracter3stica de expresarse constitutivamente en ausencia de inductor, su expresi3n no se ve modificada por la narigenina. Se tendr3a que buscar en los extremos 5' de nodA y nodBC diferencias en su secuencia y tratar de explicar en base a esto esta diferencia. En otros sistemas hay tambi3n evidencia de inhibici3n de la expresi3n de los nod como en Rhizobium leguminosarum bv. trifolii

donde la expresión de nodA se reprime drásticamente por un compuesto flavonoide, la umbeliferona, que se encuentra en el exudado de raíz de trébol (Djordjevic, 1987).

La genisteína además de ser un buen inductor de nodBC en las fusiones PAP4, PAP7 y PAP11 en CE-3, no afecta la expresión de pSM991-25 (pMV13.2, pMV16.1 y pMV17.1), ni del pSM991-32 (pAP21, pAP25 y pAP27), ni de la CPN2001pMP154 complementado con el pSM991-25 o el pSM991-40, se mantienen los niveles de inducción. Parecería que ya no se necesita inductor para inducir ya que los genes nod están ya expresándose.

#### CONCLUSION

Las conclusiones sobre la regulación de nodBC de Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli cepa CE-3 son las siguientes:

-las moléculas reguladoras de la expresión de nodBC se encuentran codificadas en el pSim de la CE-3.

-en el fragmento de 5.5 kb EcoR I, en un segmento de aproximadamente 2 kb, que va en el pSM991, pSM991-25, pSM991-32 y pSM991-40 va codificada la molécula responsable que desregula la expresión de nodBC para dar expresión alta constitutiva

-en el fragmento de 18 kb que va en el pSM991 y no en el pSM991-25 va codificada la molécula que regula la actividad o la expresión de la molécula activadora, el represor

-en las construcciones pSM991-25 y pSM991-32, la actividad de nodBC presenta un fenómeno de inhibición por narigenina apuntando posiblemente a una regulación postranscripcional

-no se puede excluir todavía la existencia de algún otro nodD en el plásmido simbiótico fuera de lo que cubren los cósmidos pSM991, pSM927, pSM828 y pSM367 y que sea el responsable de la activación que se ve con narigenina y genisteína en CE-3pAP4/pAP7/pAP11 y que el nodD del fragmento de 5.5 kb EcoR I active en algún otro momento de la nodulación.

-no se puede excluir la posibilidad de que en el fragmento de 5.5 kb EcoR I vaya un nodD tipo nodD3 de Rhizobium meliloti y por lo tanto que también vaya el locus syRM, y que activen la expresión de nodBC sin inductor.

-la evidencia que se tiene para pensar que el nodD que va en el

fragmento de 5.5 kb EcoR I interviene en la primera activación de los genes nod es la siguiente:

los niveles de inducción que presenta nodC (pAP7) en CE-3 en presencia de narigenina son semejantes a los niveles de inhibición que presenta nodC cuando va en el pSM991-25 (pMV16.1) en CE-3. Lo mismo sucede con el pMP154, los niveles de inducción por narigenina en CE-3pMP154 son semejantes a los niveles de inhibición por narigenina que presenta la cepa 2001pSM991-25 y 2001pSM991-40 (figura 16).

-puede existir una molécula sensora que va en el plásmido simbiótico que al contacto con la flavona pudiera degradar, desactivar, o reprimir la transcripción del represor liberando así la actividad del nodD (fragmento de 5.5 kb EcoR I) o posiblemente su transcripción (por los datos de la cinética de inducción con narigenina), al liberarse la actividad de nodD, activaría a nodBC, pero a la vez sensaría a la narigenina que no le permitiría una expresión mas alta como lo es en ausencia del represor o con genisteína. Esta puede ser la razón de porque la narigenina activa menos que la genisteína.

#### Perspectivas del trabajo

-Habría que mutagenizar en el pSim la región donde va codificado el activador en el fragmento de 5.5 kb EcoR I (recombinar los plásmidos pMV3 o pMV4)

-Si el fenotipo de esta recombinación es de Nod<sup>-</sup>, indicaría que es el único nodD funcional; pero si no tiene este fenotipo, habría que complementar la CFN2001pMP154 con el fragmento de 13 kb BamH I que hibridiza con nodD

-Habría que delimitar al represor y complementarlo con una cepa que llevara nodD::lacZ y ver si la represión es a nivel de transcripción de nodD o complementar una cepa que llevara nodD, nodC::lacZ con el represor y ver si la represión es a nivel de transcripción de nodC

Tabla 1  
Bacteriófagos, cepas y plásmidos usados en este trabajo.

CEPAS BACTERIANAS	CARACTERISTICAS	REFERENCIA
<u>Rhizobium leguminosarum</u> bv. <u>phaseoli</u>		
CE-3	Cepa Sm <sup>R</sup> derivada de la cepa silvestre CFN42, Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup>	Noel (1984)
CFN2001	Cepa Rif <sup>R</sup> derivada de la CFN42 curada del plásmido simbiótico Nod <sup>-</sup> Fix <sup>-</sup>	Palacios (1983)
<u>Escherichia coli</u>		
MC4100(Mucts)	<u>araD139</u> , <u>d(argF-lac)U169</u> , <u>rpsL150</u> , <u>relA1</u> , <u>flbB5301</u> , <u>pstF25</u> , <u>deoC1</u> , (Mucts), lisógena para mini-Mu	Ratet (1986)
M8820 (Mu)	<u>araD139</u> , <u>d(araCOIBA-leu)7679</u> , <u>d(proAB, argF-lacIPOZYA)XIII</u> , <u>rpsL</u> , (Mu), cepa receptora para la transducción del mini-Mu	Casadaban (1975)
PLASMIDOS		
pMP190	Derivado de 15 kb del pKT214 <u>lacZ</u> sin promotor, fusión transcripcional, Cm <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> <u>mob</u> <sup>+</sup>	Zaat (1987)
pMP154	Fusión promotor <u>nodA::lacZ</u> de <u>Rhizobium leguminosarum</u> bv. <u>viceae</u> en pMP190	Zaat (1987)
pNC206	IncP1, Cb <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Tra <sup>+</sup> , <u>mob</u> <sup>+</sup> cointegra con pSUP205 para replicación en <u>Rhizobium</u>	A. Pühler
PRK2013	Km <sup>R</sup> , <u>incP</u> , Tra <sup>+</sup> , <u>mob</u> <sup>+</sup> , plásmido ayudador para cruzas triparentales	Ditta (1980)
pSUP205	Tc <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , ColE1, <u>cos</u> , <u>mob</u> <sup>+</sup>	Simon (1983)
pSM991	pSUP205 que lleva la región <u>nifa</u> , ORF1-ORF2- <u>nodBC</u> , <u>nodA</u> , <u>nodD</u> , 35 kb, Nod <sup>+</sup> Fix <sup>-</sup>	Cevallos (1989)

PSM927	psUP205 que lleva la región <u>nifa</u> , ORF1-ORF2- <u>nodBC</u> , <u>nodA</u> , 30.5 kb, Nod <sup>+</sup> Fix <sup>-</sup>	Cevallos (1989)
PSM828	psUP205 que lleva la región <u>nifb</u> , 40 kb Nod <sup>-</sup>	Cevallos (1989)
PSM367	psUP205 que lleva la región <u>nifc</u> , 40 kb Nod <sup>-</sup>	Cevallos (1989)
PSM991-25	delección del pSM991, lleva <u>nodD</u> , ORF1-ORF2- <u>nodBC</u> , <u>nodA</u> , 18.8 kb, Nod <sup>+</sup> Fix <sup>-</sup>	Cevallos (1989)
PSM991-32	delección del pSM991, lleva <u>nodD</u> , ORF1-ORF2- <u>nodBC</u> , 13.3 kb, Nod <sup>-</sup>	Cevallos (1989)
PSM991-40	delección del pSM991, lleva <u>nodD</u> , 5.5 kb, Nod <sup>-</sup>	Cevallos (1989)
PSM991-B2	delección del pSM991, lleva ORF1-ORF2- <u>nodBC</u> , 7.2 kb, Nod <sup>-</sup>	Cevallos (1989)
pAP4	PSM991-B2, ORF1:: <u>lacZ</u>	Este trabajo
pAP7	PSM991-B2, <u>nodC</u> :: <u>lacZ</u>	Este trabajo
pAP11	PSM991-B2, inserción <u>lacZ</u> al 3' de <u>nodC</u> , fuera de <u>nodC</u>	Este trabajo
pAP21	PSM991-32, <u>nodB</u> :: <u>lacZ</u>	Este trabajo
pAP25	PSM991-32, <u>nodC</u> :: <u>lacZ</u>	Este trabajo
pAP27	PSM991-32, inserción <u>lacZ</u> al 3' de <u>nodC</u> , fuera de <u>nodC</u>	Este trabajo
pmV13.2	PSM991-25, <u>nodC</u> :: <u>lacZ</u> al 5' Nod <sup>-</sup>	Cevallos (1989)
pmV16.1	PSM991-25, <u>nodC</u> :: <u>lacZ</u> , al 3' Nod <sup>-</sup>	Cevallos (1989)
pmV17.1	PSM991-25, inserción <u>lacZ</u> al 3' de <u>nodC</u> , fuera de <u>nodC</u> Nod <sup>+</sup>	Cevallos (1989)
<b>BACTERIOFAGO</b>		
MudIIPR13	Mini-Mu, <u>lacZ</u> , Cm <sup>R</sup> , fusiones traduccionales	Ratet (1988)
<u>Mucts</u>	<u>Mucts62</u>	Howe (1973)

### Abreviaturas de fenotipos

$Sm^R$	resistente a estreptomicina	$Tc^R$	resistente a tetraciclina
$Cm^R$	resistente a cloranfenicol	$Km^R$	resistente a kanamicina
$Rif^R$	resistente a rifampicina	$Ch^R$	resistente a carbenicilina
$Nod^+$	nodulación	$Fix^+$	fijación de nitrógeno
$Nod^-$	no hay nodulación	$Fix^-$	no hay fijación de nitrógeno



**Tabla 2**

**Expresión del promotor ORF1-ORF2-nodBC de Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli en pSM991-B2 (pSUP205::ORF1-ORF2-nodBC) en las cepas CE-3 y CFN2001**

CEPA	ACTIVIDAD ENZIMATICA: $\beta$ - GALACTOSIDASA		
	CONTROL	NARINGENINA	GENISTEINA
CE-3	13.8 $\pm$ 1.9	13.8 $\pm$ 1.9	13.8 $\pm$ 1.9
CE-3pAP4	16.9 $\pm$ 3.3	191.2 $\pm$ 43.1	244.5 $\pm$ 33.0
CE-3pAP7	60.4 $\pm$ 0.7	489.1 $\pm$ 16.4	656.8 $\pm$ 52.5
CE-3pAP11	27.0 $\pm$ 1.7	100.9 $\pm$ 11.0	118.0 $\pm$ 8.9
CFN2001	15.2 $\pm$ 4.8	15.2 $\pm$ 4.8	15.2 $\pm$ 4.8
CFN2001pAP4	12.9 $\pm$ 1.5	11.3 $\pm$ 0.8	14.7 $\pm$ 0.3
CFN2001pAP7	34.2 $\pm$ 2.9	32.0 $\pm$ 5.8	51.3 $\pm$ 16.0
CFN2001pAP11	24.9 $\pm$ 4.0	23.0 $\pm$ 1.9	21.1 $\pm$ 1.2

Promedio de 3 experimentos hechos por duplicado

Actividad específica expresada en nmol/min/mg de proteína

Naringenina 120 nM

Genisteína 440 nM

Control      medio de inducción

pAP4      pSM991-B2 (pSUP205::ORF1-ORF2-nodBC)      ORF1::lacZ  
 pAP7      pSM991-B2 (pSUP205::ORF1-ORF2-nodBC)      nodC::lacZ  
 pAP11      pSM991-B2 (pSUP205::ORF1-ORF2-nodBC)      fusión lacZ al 3' de nodC, fuera de nodC

**Tabla 3**

**Expresión del promotor *nodA* de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (pMP154, *nodAp::lacZ*) en la cepa CE-3 y en la cepa CFN2001 en presencia de pSM927 (pSUP205::ORF1-ORF2-*nodBC*, *nifHDK*, *nodA*, 35 kb, *Nod*<sup>+</sup>), pSM828 (pSUP205 que lleva la región *nifB*, 35 kb, *Nod*<sup>-</sup>) y pSM367 (pSUP205 que lleva la región *nifC*, 35 kb, *Nod*<sup>-</sup>)**

CEPA	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA : CONTROL	NARINGENINA	$\beta$ - GALACTOSIDASA GENISTEINA	EXUDADO
CE-3pMP154	279.2 $\pm$ 25.4	2894.2 $\pm$ 490.4	3658.5 $\pm$ 299.9	ND
CFN2001 pMP154	112.5 $\pm$ 26.0	121.1 $\pm$ 7.3	109.6 $\pm$ 6.8	ND
CFN2001 pMP154 pSM927	80.9 $\pm$ 10.0	88.5 $\pm$ 24.0	102.3 $\pm$ 12.0	109.7 $\pm$ 2
CFN2001 pMP154 pSM828	61.6 $\pm$ 12.7	88.1 $\pm$ 5.2	87.1 $\pm$ 24.7	101.0 $\pm$ 1
CFN2001 pMP154 pSM367	100.2 $\pm$ 8.7	125.7 $\pm$ 10.8	117.2 $\pm$ 5.9	83.9 $\pm$

Promedio de 2 y 3 experimentos hechos por duplicado  
 Actividad específica expresada en nmol/min/mg de proteína  
 Naringenina 120 nM  
 Genisteina 440 nM  
 Exudado de raíz de frijol concentrado 10 veces  
 Control medio de inducción  
 ND no se determinó

**Tabla 4**

**Expresión del promotor ORF1-ORF2-nodBC de Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli en pSM991-25 (pSUP205::nodD,ORF1-ORF2-nodBC, nodA, Nod<sup>+</sup>) en 1 cepas CE-3 y CFN2001**

CEPA	ACTIVIDAD ENZIMATICA: $\beta$ - GALACTOSIDASA		
	CONTROL	NARINGENINA	GENISTEINA
CE-3pMV13.2	716.9 $\pm$ 52.5	401.9 $\pm$ 88.0	694.5 $\pm$ 41.0
CE-3pMV16.1	732.7 $\pm$ 50.1	466.0 $\pm$ 41.2	759.4 $\pm$ 3.8
CE-3pMV17.1	518.8 $\pm$ 3.1	360.7 $\pm$ 32.4	540.3 $\pm$ 59.1
CFN2001pMV13.2	715.8 $\pm$ 23.6	393.0 $\pm$ 6.9	678.8 $\pm$ 42.3
CFN2001pMV16.1	447.6 $\pm$ 8.7	283.4 $\pm$ 25.9	478.3 $\pm$ 27.1
CFN2001pMV17.1	223.9 $\pm$ 15.1	197.4 $\pm$ 1.5	205.4 $\pm$ 10.0

Promedio de 2 y 3 experimentos hechos por duplicado

Actividad especifica expresada en nmol/min/mg de proteina

Naringenina 120 nM

Genisteina 440 nM

Control medio de inducción

- pMV13.2 pSM991-25 (pSUP205::nodD,ORF1-ORF2-nodBC, nodA) nodC::  
lacZ Nod<sup>-</sup>
- pMV16.1 pSM991-25 (pSUP205::nodD,ORF1-ORF2-nodBC, nodA) nodC::  
lacZ Nod<sup>-</sup>
- pMV17.1 pSM991-25 (pSUP205::nodD,ORF1-ORF2-nodBC, nodA) fusión  
lacZ al 3' de nodC, fuera de nodC Nod<sup>+</sup>

**Tabla 5**  
**Expresión del promotor ORF1-ORF2-nodBC de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* en pSM991-32 (pSUP205::nodD,ORF1-ORF2-nodBC) en las cepas CE-CFN2001**

CEPA	ACTIVIDAD ENZIMATICA: $\beta$ - GALACTOSIDASA		
	CONTROL	NARINGENINA	GENISTEINA
CE-3pAP21	455.5 $\pm$ 15.8	175.5 $\pm$ 20.9	428.6 $\pm$ 9.6
CE-3pAP25	414.1 $\pm$ 6.0	206.9 $\pm$ 3.8	467.5 $\pm$ 69.2
CE-3pAP27	342.6 $\pm$ 27.4	192.7 $\pm$ 27.9	323.1 $\pm$ 33.4
CFN2001pAP21	ND	204.2 $\pm$ 4.0	377.0 $\pm$ 63.0
CFN2001pAP25	372.1 $\pm$ 45.3	252.8 $\pm$ 14.6	351.8 $\pm$ 8.1
CFN2001pAP27	ND	ND	ND

Promedio de 2 y 3 experimentos hechos por duplicado  
 Actividad específica expresada en nmol/min/mg de proteína  
 Naringenina 120 nM  
 Genisteína 440 nM  
 Control medio de inducción  
 ND no se determinó

pAP21 pSM991-32 (pSUP205::nodD,ORF1-ORF2-nodBC) nodB::lacZ  
 pAP25 pSM991-32 (pSUP205::nodD,ORF1-ORF2-nodBC) nodC::lacZ  
 pAP27 pSM991-32 (pSUP205::nodD,ORF1-ORF2-nodBC) fusión lacZ  
 al 3' de nodC, fuera de nodC

**Tabla 6**

**Expresión del promotor nodA de Rhizobium leguminosarum bv. viceae (pMP154, nodAp::lacZ) en la cepa CE-3 y en la cepa CFN2001 en presencia de pSM991 (pSUP205::nodD, ORF1-ORF2-nodBC, nifHDK, nodA 35 kb Nod<sup>+</sup>), pSM991-25 (pSUP205::nodD, ORF1-ORF2-nodBC, nodA 25 kb Nod<sup>+</sup>) y pSM991-40 (pSUP205::nodD 5.5 kb)**

CEPA	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA : CONTROL	NARINGENINA	$\beta$ - GALACTOSIDASA GENISTEINA	EXUDADO
CFN2001 pMP154	112.5 $\pm$ 26.0	121.1 $\pm$ 7.3	109.6 $\pm$ 6.8	ND
CE-3pMP154	279.2 $\pm$ 25.4	2894.2 $\pm$ 490.4	3658.5 $\pm$ 299.9	ND
CFN2001 pMP154 pSM991-25	4649.6 $\pm$ 395.3	2370.9 $\pm$ 60.8	4333.3 $\pm$ 549.1	2954.9 $\pm$ 24
CFN2001 pMP154 pSM991-40	4259.6 $\pm$ 931.3	2680.5 $\pm$ 259.0	4849.0 $\pm$ 10007.0	ND
CFN2001 pMP154 pSM991	372.2 $\pm$ 54.9	220.4 $\pm$ 23.7	315.3 $\pm$ 25.0	271.0 $\pm$ 2

Promedio de 2 y 3 experimentos hechos por duplicado  
 Actividad específica expresada en nmol/min/mg de proteína  
 Naringenina 120 nM  
 Genisteína 440 nM  
 Exudado de raíz de frijol concentrado 10  
 Control medio de inducción  
 ND no se determinó

Tabla 7

Expresión de nodC de Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli en pSM991-B2 (pSUP205::ORF1-ORF2-nodBC) y pSM991-25 (pSUP205::nodD,ORF1-ORF2-nodC nodA, Nod<sup>+</sup>) con naringenina en las últimas 4 hrs., 2 hrs., y 0 hrs. de crecimiento en las cepas CE-3 y CFN2001

CEPA	ACTIVIDAD ENZIMATICA: $\beta$ - GALACTOSIDASA	
	CONTROL	NARINGENINA
CE-3pMV16.1 <sup>1</sup>	732.7 $\pm$ 50.1	466.0 $\pm$ 41.2
CE-3pMV16.1 <sup>2</sup>		388.4 $\pm$ 37.2
CE-3pMV16.1 <sup>3</sup>		410.5 $\pm$ 82.8
CE-3pMV16.1 <sup>4</sup>		366.9 $\pm$ 60.5
CFN2001pMV16.1 <sup>1</sup>	447.6 $\pm$ 8.7	283.4 $\pm$ 25.9
CFN2001pMV16.1 <sup>2</sup>		232.9 $\pm$ 2.4
CFN2001pMV16.1 <sup>3</sup>		230.7 $\pm$ 17.3
CFN2001pMV16.1 <sup>4</sup>		278.2 $\pm$ 22.9
CE-3pAP7 <sup>1</sup>	60.4 $\pm$ 0.7	489.1 $\pm$ 16.4
CE-3pAP7 <sup>2</sup>		302.1 $\pm$ 18.4
CE-3pAP7 <sup>3</sup>		278.6 $\pm$ 32.3
CE-3pAP7 <sup>4</sup>		60.7 $\pm$ 6.0

Promedio de 2 y 3 experimentos hechos por duplicado  
 Actividad específica expresada en nmol/min/mg de proteína  
 Naringenina 120 nM

Control medio de inducción

- 1 18 hrs. de crecimiento con naringenina
- 2 Se agregó naringenina a las 14 hrs. de crecimiento y se incubó 4 hr. más con naringenina
- 3 Se agregó naringenina a las 16 hrs. de crecimiento y se incubó 2 hrs. más con naringenina
- 4 Se agregó naringenina a las 18 hrs. de crecimiento y se detuvo el crecimiento inmediatamente, 0 hrs. con naringenina

pAP7 pSM991-B2 (pSUP205::ORF1-ORF2-nodBC) nodC::lacZ  
 pMV16.1 pSM991-25 (pSUP205::nodD,ORF1-ORF2-nodBC, nodA)  
 nodC::lacZ Nod<sup>-</sup>

## MATERIAL Y METODOS

### 1. Bacteriófagos, cepas bacterianas y plásmidos

Los bacteriófagos, las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en el presente trabajo se encuentran descritos en la tabla 1.

### 2. Aislamiento y manipulación de DNA

El aislamiento y transformación del DNA, electroforesis y la digestión con enzimas de restricción del DNA se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito por Maniatis (1982).

### 3. Medios y condiciones de crecimiento

Rhizobium se creció en medio PY a 30° C (Noel, 1984) y E. coli en medio LB a 30° C ó 37° C (Maniatis, 1982) o en LBC, LB con CaCl<sub>2</sub> y MgS (Murooka, 1981). Los medios de cultivos para determinar las actividades  $\beta$ -galactosidasa fueron YM sólido (Hooyskaas, 1979) y medio de inducción líquido. El medio de inducción consiste en medio Jensen (Vincent, 1970) complementado con 20% de medio sin tiamina, manitol-nitrato (Van Bruss 1977). Las concentraciones de los antibióticos utilizados en  $\mu$ g/ml fueron:

	<u>Escherichia coli</u>	<u>Rhizobium</u>	
	LB	PY	YM
Tc	10	5	2
Cm	30	15	5
Km	30	30	
Sm	100	100	100
Rif		25	25
Nal		10	10

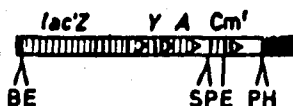
Se utilizó medio mínimo (Horvath, 1987)) con X-gal, 5-Bromo-4-cloro-3-indolil  $\beta$ -D-galactopiranosido, (25 $\mu$ g/ml), como indicador de actividad d  $\beta$ -galactosidasa y naringenina como inductor, para la selección de las mutantes.

### 4. Cruzas

Las cruzas para movilizar y expresar plásmidos de E. coli a Rhizobium se hicieron de la siguiente manera: las cepas receptora, donadora y ayudadora se crecieron en medio adecuado hasta la fase estacionaria. Se mezclaron (1:1:1 ml) en cajas de PY y se incubaron 16 hrs. a 30° C. Se tomó la mezcla de células y se resuspendieron en Twe .01% y 10mM MgSO<sub>4</sub>, diluciones y se platearon en medio selectivo apropiado. Para permitir la expresión estable de pSUP205 se utilizó el pNC206 para formar cointegrados que permitan su replicación y expresión dentro de Rhizobium.

### 5. Aislamiento de mutantes

pSM991-B2 y pSM991-32 se mutagenizaron con el bacteriófago MudIIP (Ratet, 1989) que es un mini-Mu que forma fusiones traduccionales con gen lacZ de E. coli y confiere resistencia



MudIIPR13

a Cm. Los plásmidos se introdujeron a la cepa MC4100 (Mucts) (MudIIPR13) por conjugación triparental usando el pRK2013 como plásmido ayudador. Para la inducción de transposición del MudIIPR13 al plásmido se usó un modificación del método reportado por Groisman (1986) y por Murooka (1981):

- Las cepas MC4100pSM991-B2 y MC4100pSM991-32 se crecieron 12 hrs. en L TcCm a 30° C
- La cepa M8820 se creció en LBC (LB, 5mM CaCl<sub>2</sub> y 10mM MgSO<sub>4</sub>) a 30° C 1 hrs.
- La M8820 se diluyó 1:100 en LBC y se dejó a 30° C hasta que se obtuvo lisado de la MC4100

#### Lísis

- Se diluyeron las cepas MC4100pSM991-B2 y MC4100pSM991-32 1:100 en LBC (LB, 5mM CaCl<sub>2</sub> y 200mM MgSO<sub>4</sub>) y se crecieron a 30° C hasta .22 D.O.
- Se incubaron a 37° C 20 min. con agitación a 140 rpm
- Se incubaron a 42° C de 40 - 80 min. en agitación hasta ver lisis
- Se agregó cloroformo 1%, 20 mM CaCl<sub>2</sub> y 2mM MgSO<sub>4</sub>. Vortex y se centrif

#### Transducción

- Se tomaron de la cepa M8820 y del lisado diferentes concentraciones (10:1, 10:2, v/v, moi 2.5 y 5) se mezclaron y se incubaron a 30° C sin agitación 30 min.
- Se agregó 2 ml de LB a 30° C con agitación entre 60 - 75 min.
- Se lavaron las células con 10mM NaCl y se resuspenden en .4 ml de 10 NaCl
- Se platearon en LBC<sup>2</sup> Cm sólido (LB, 5mM CaCl<sub>2</sub>, Cm) y se incubaron 16 hrs. a 30° C

Mas del 95% de las transductantes son Tc<sup>R</sup> lo que indica que la transposición del MudIIPR13 fue al plásmido. La mayoría de las mutantes analizadas eran diferentes, por lo que no paracer haber sitios preferenciales de inserción en la transposición ("hot spots").

La selección de las mutantes se hizo introduciendo a la cepas CE-CFN2001 las mutantes como cointegrados con el pNC206 y se identificaro las clonas positivas en medio mínimo X-gal y medio mínimo X-gal naringina.

#### 6. Ensayo de inducción de los genes ORF1-ORF2-nodBC

El ensayo de inducción se llevó a cabo de la siguiente manera (Za 1987):

- Las células se precrecieron en YM sólido por 3 días a 30° C
- Una colonia de la caja de YM se creció en 2 ml de medio de inducción (MI) por 48 hrs. a 30° C con agitación vigorosa



-Se midieron las D.O.<sub>600</sub> y se llevó el cultivo a .05 D.O.<sub>600</sub> en MIN (medio de inducción más 120 nM de narigenina), MIG (medio de inducción más 440nM de genisteína) y MIEx (medio de inducción más exudado de raíz de frijol concentrado 10 veces) y MI (medio de inducción sin inductor) se dejaron crecer 18 hrs. a 30<sup>0</sup> C con agitación.

-La actividad específica de  $\beta$  - galactosidasa se determinó cuantificando la proteína usando el método descrito por Lowry (1951) y se BSA (albúmina de suero de bovino fracción V) como estandar

#### Medios de Cultivo

LB  
 Peptona de caseína 10 gr  
 Extracto de levadura 5 gr  
 NaCl 10 gr  
 H<sub>2</sub>O 1000 ml

PY  
 Peptona de caseína 5 gr  
 Extracto de levadura 3 gr  
 CaCl<sub>2</sub> 7 mM  
 H<sub>2</sub>O 1000 ml

YM  
 Manitol 10.0 gr  
 Extracto de levadura 0.4 gr  
 NaCl 0.1 gr  
 MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.2 gr  
 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 gr  
 H<sub>2</sub>O 1000 ml  
 pH 6.8

#### Medio sin Tiamina, Manitol - Nitrato

Manitol	1.40%	autoclave
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	.03%	autoclave
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	.10%	autoclave
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	.055%	autoclave
KNO <sub>3</sub>	.055%	autoclave
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	.13%	autoclave por separado
Biotina	1 ug%	filtrar
Elementos traza	.25%	filtrar
FeCl <sub>3</sub>	.001%	filtrar
pH	6	

Jensen		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0 gr	autoclave
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	.2 gr	autoclave
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	.2 gr	autoclave
NaCl	.2 gr	autoclave
FeCl <sub>3</sub>	.01 gr	filtrar
Elementos traza	2.5 ml	filtrar
H <sub>2</sub> O	1000 ml	

#### Elementos traza (filtrar):

CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	.0035%
MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	.061%
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	.0097%

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	.127%
NaMoO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	.0398%

Medio mínimo

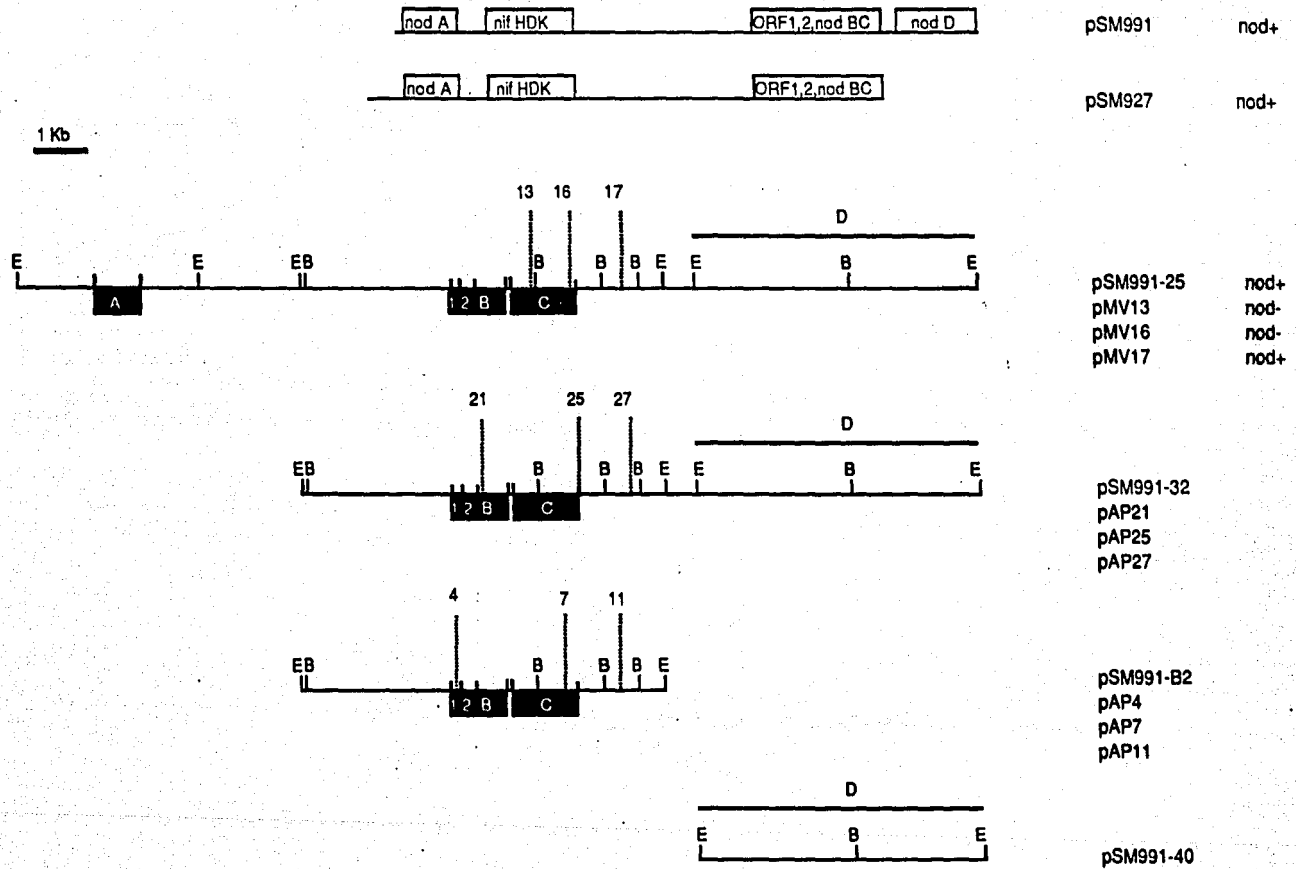
Glucosa	2.0 gr	autoclave
CaCl <sub>2</sub>	.22 gr	autoclave por separado
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	.2 gr	autoclave
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	.18 gr	autoclave
FeCl <sub>3</sub>	270 ug	filtrar
Succinico	2.0 gr	autoclave por separado
Glutámico	1.1 gr	autoclave por separado
H <sub>2</sub> O	1000 ml	
pH	6.8	

Trazas (filtrar):

CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	20 ug
MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	20 ug
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	20 ug
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2 ug
NaMoO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	10 ug
CoCl <sub>3</sub>	20 ug

Biotina	10 ug	filtrar
Pantotenato	10 ug	filtrar
Tiamina	10 ug	filtrar
H <sub>2</sub> O	1000 ml	

### Figura 3. PLASMIDOS Y MUTANTES



# Expresion del promotor nodBC de R.leg.

phaseoli en pSM991-B2 en CE-3

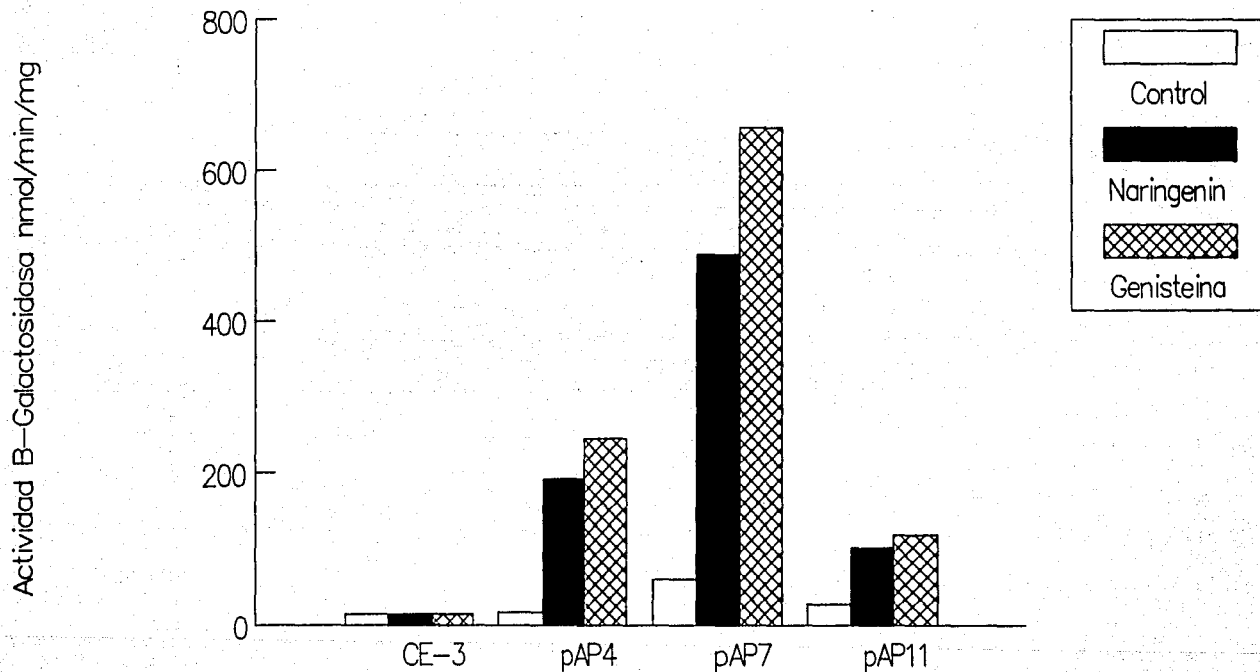


Figura 4

# Expresión del promotor nodBC de *R.leg.*

phaseoli en pSM991-B2 en CFN2001

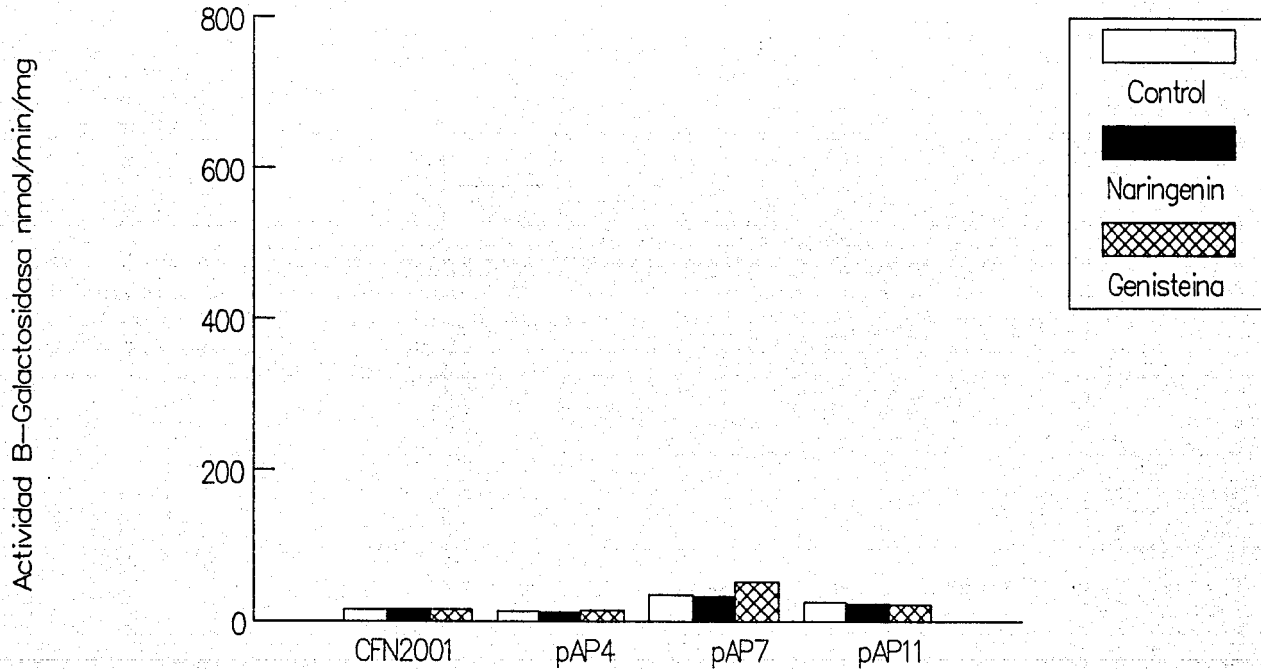


Figura 5

# Expresion de nodAp de *R.leg.viceae* en

CE-3, 2001 y 2001pSM927,828,367

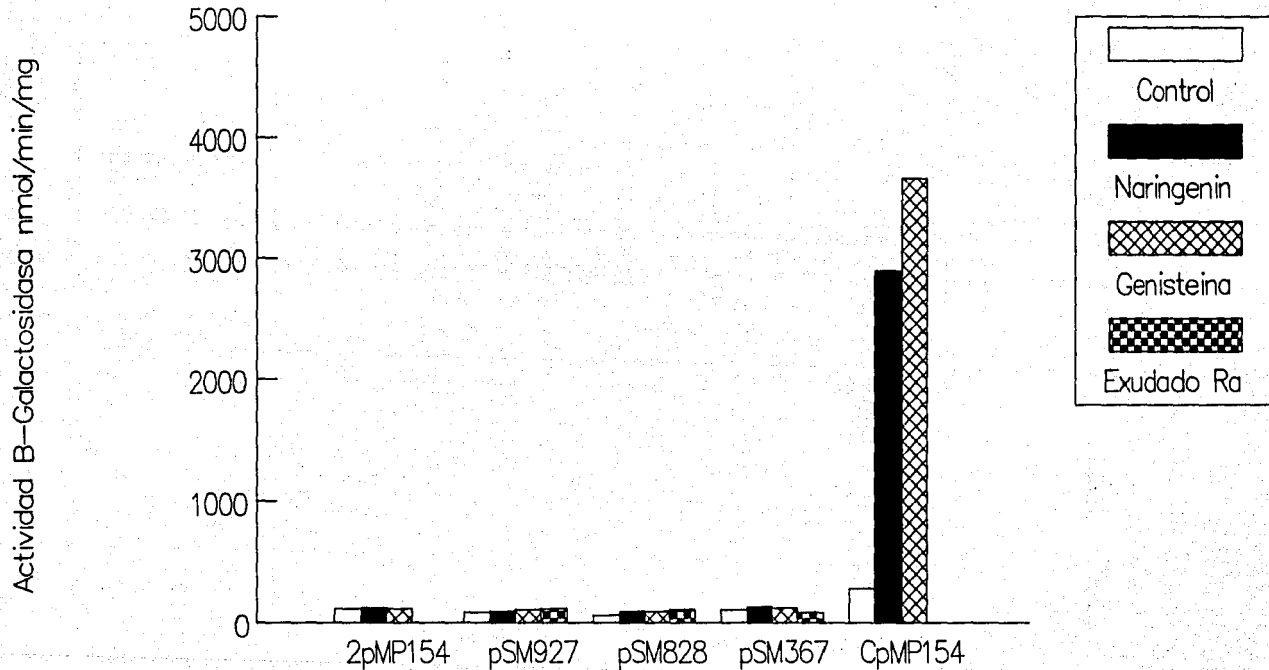


Figura 6

# Expresion del promotor nodBC de R.leg.

phaseoli en pSM991-25 en CE-3

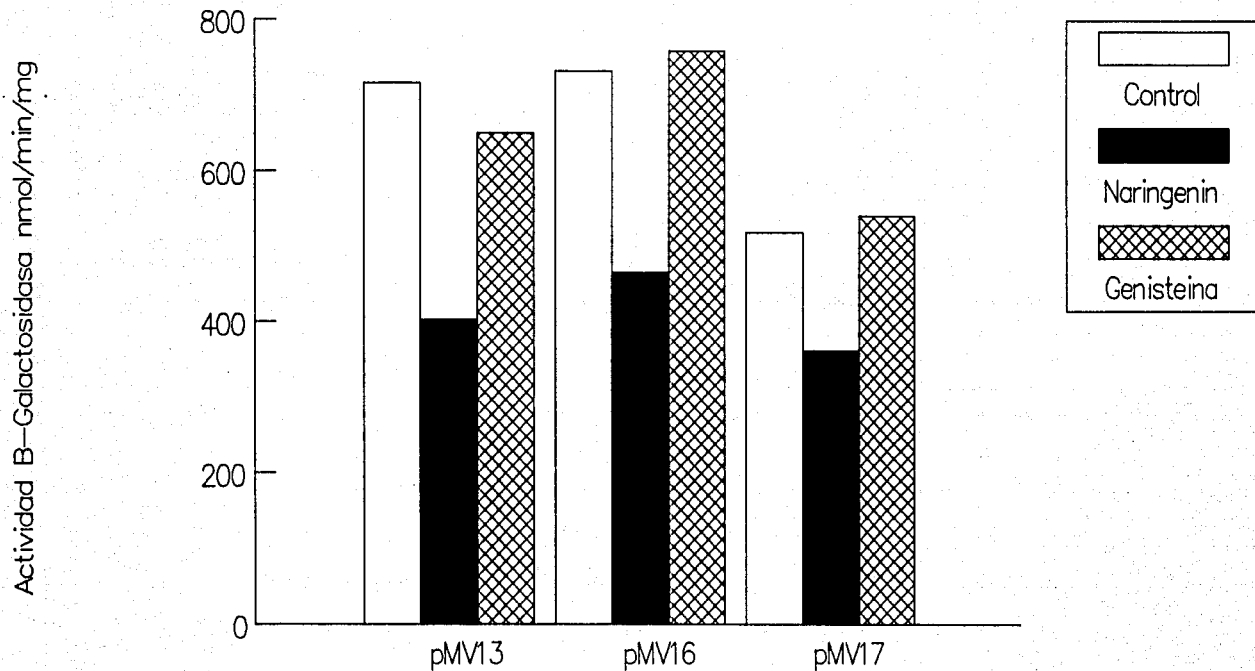


Figura 7

# Expresion del promotor nodBC de R.leg.

phaseoli en pSM991-25 en CFN2001

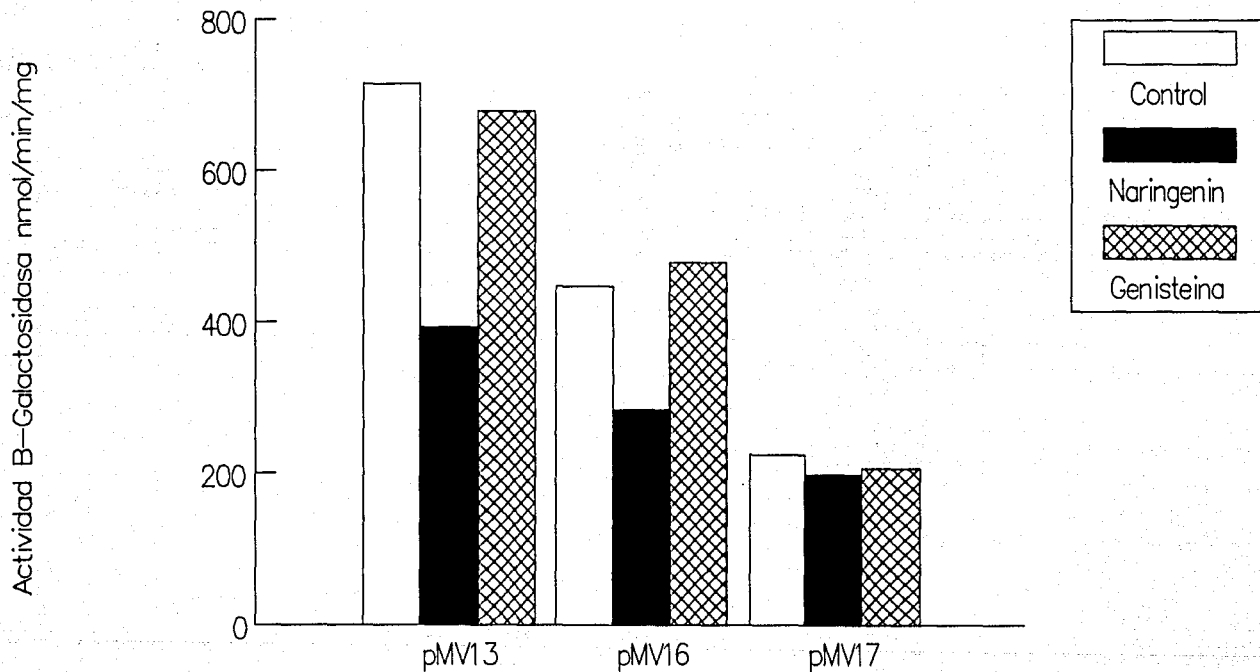


Figura 8



# Expresion del promotor nodBC de R.leg.

phaseoli en pSM991-32 en CE-3

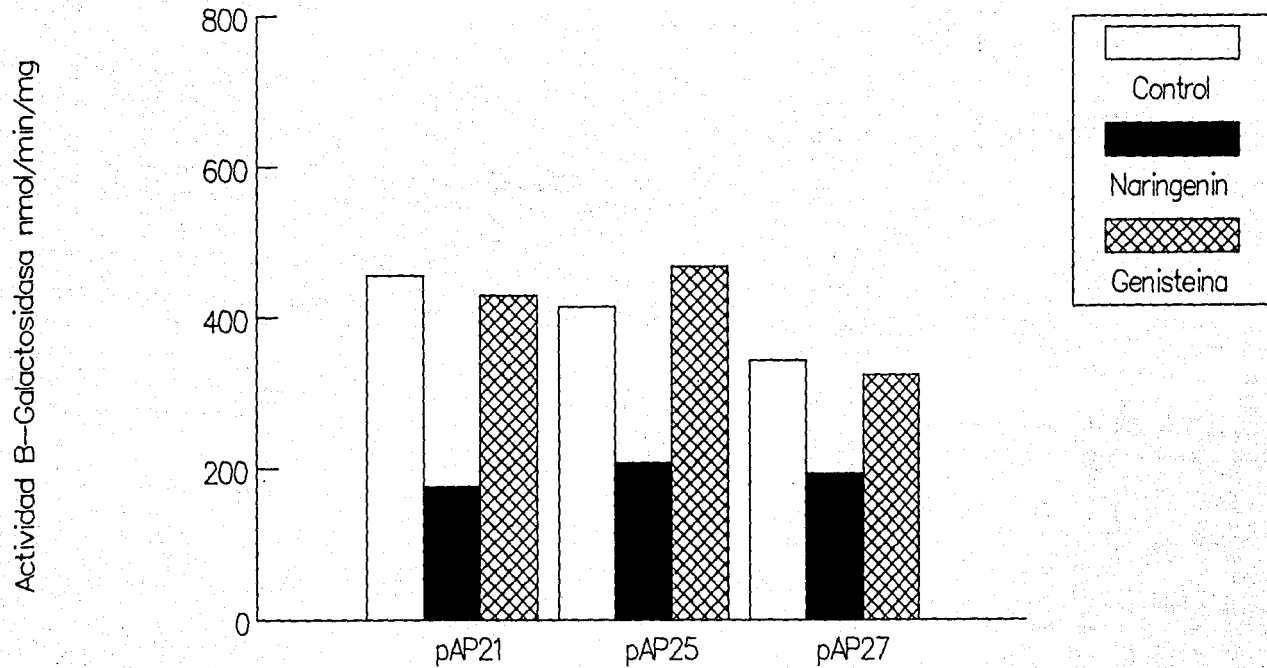


Figura 9

# Expresion del promotor nodBC de R.leg.

phaseoli en pSM991-32 en CFN2001

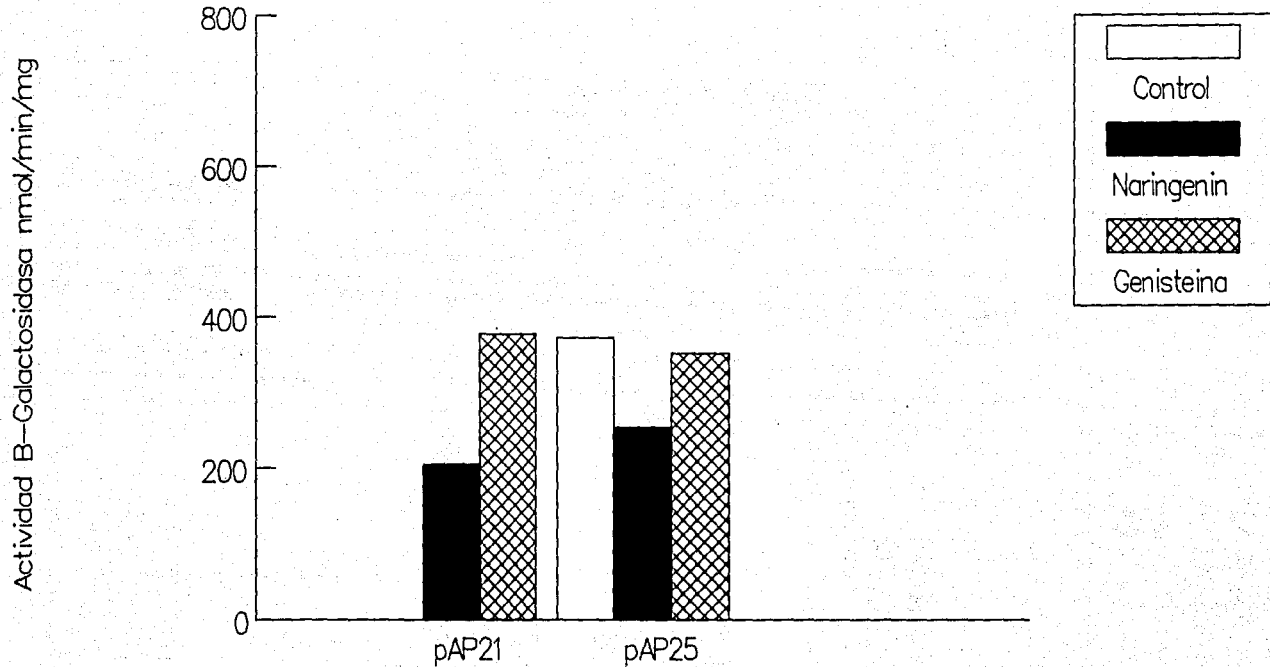


Figura 10

# Expresion de nodAp de *R.leg.viceae* en

CE-3, 2001 y 2001pSM991-25,-40, 991

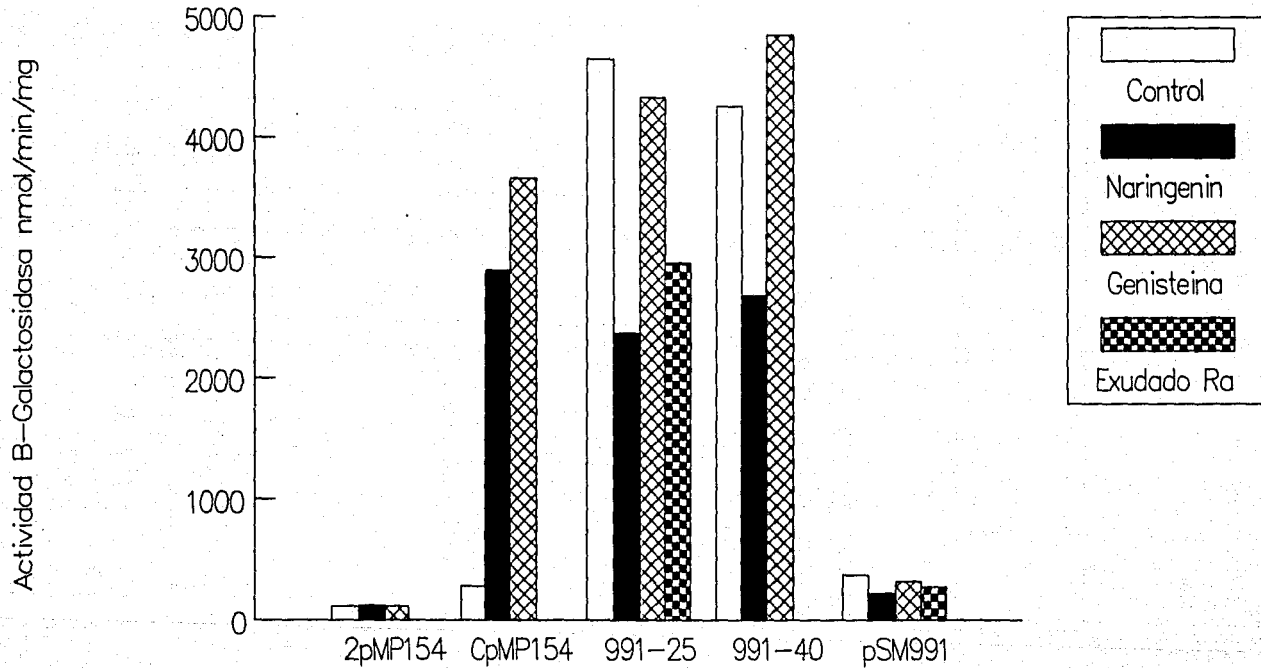


Figura 11

# Expresion de nodC de *R.leg.phaseoli*

en pSM991-25 en CE-3

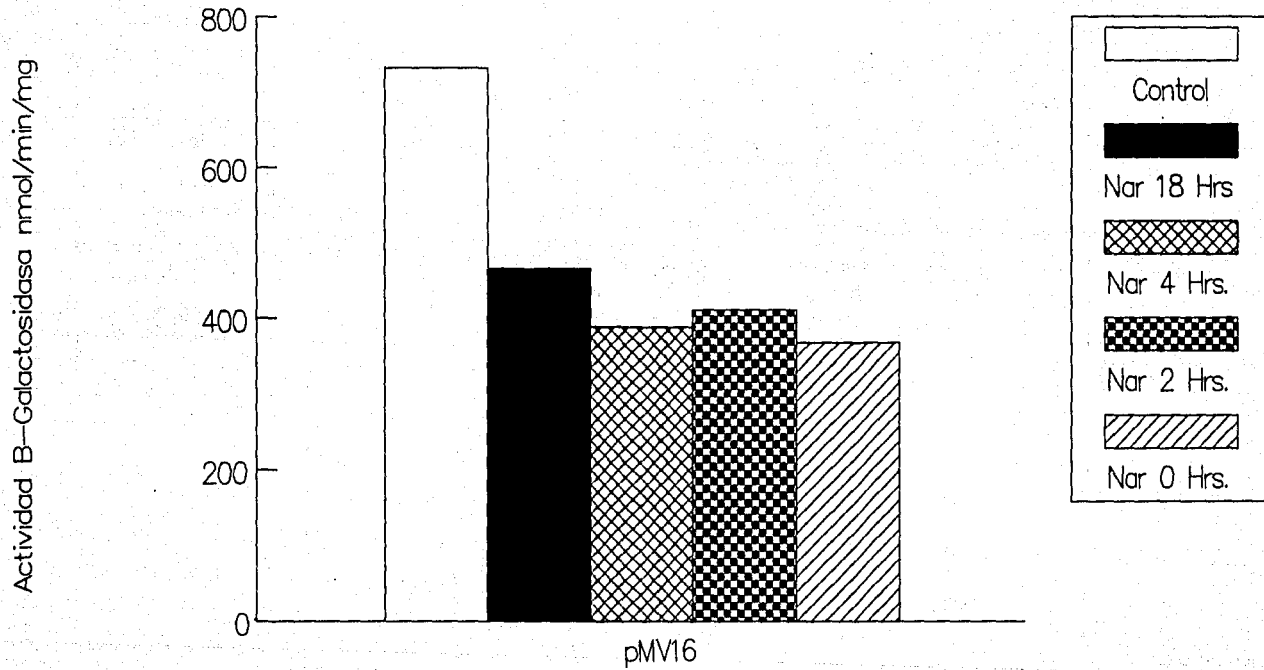


Figura 12

# Expresion de nodC de R.leg.phaseoli

en pSM991-25 en CFN2001

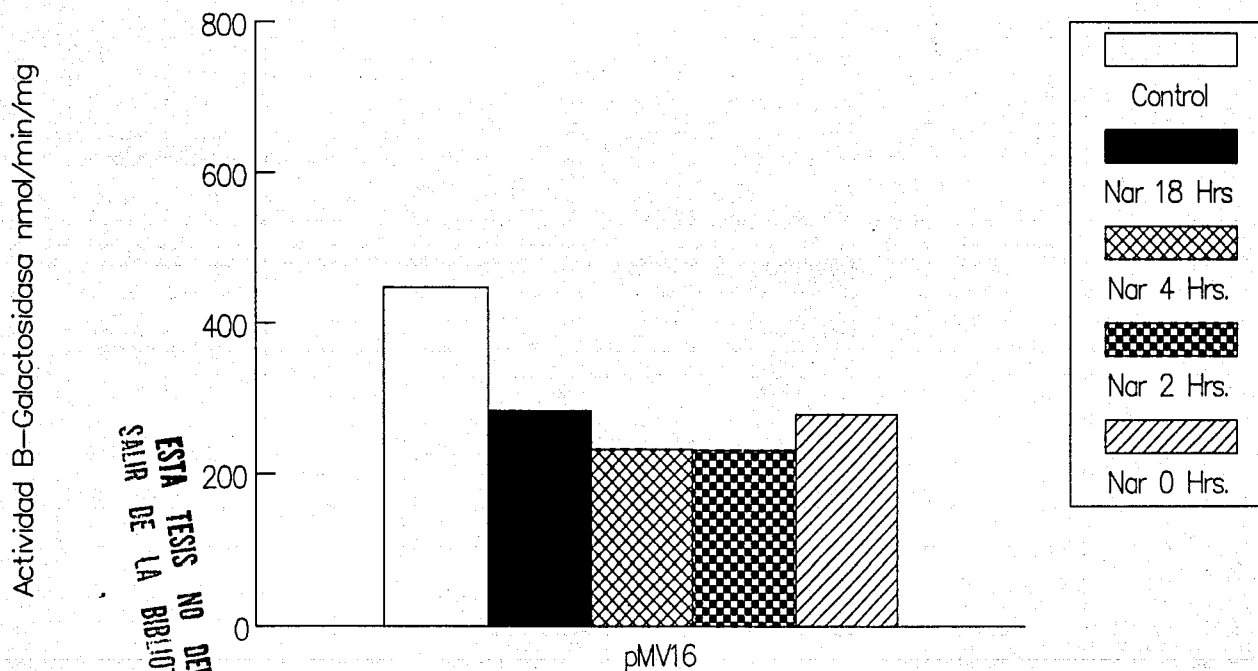


Figura 13

NO DEBE  
ESTA TESIS  
SALIR DE LA  
BIBLIOTECA

# Expresion de nodC de R.leg.phaseoli

pSM991-B2 en CE-3

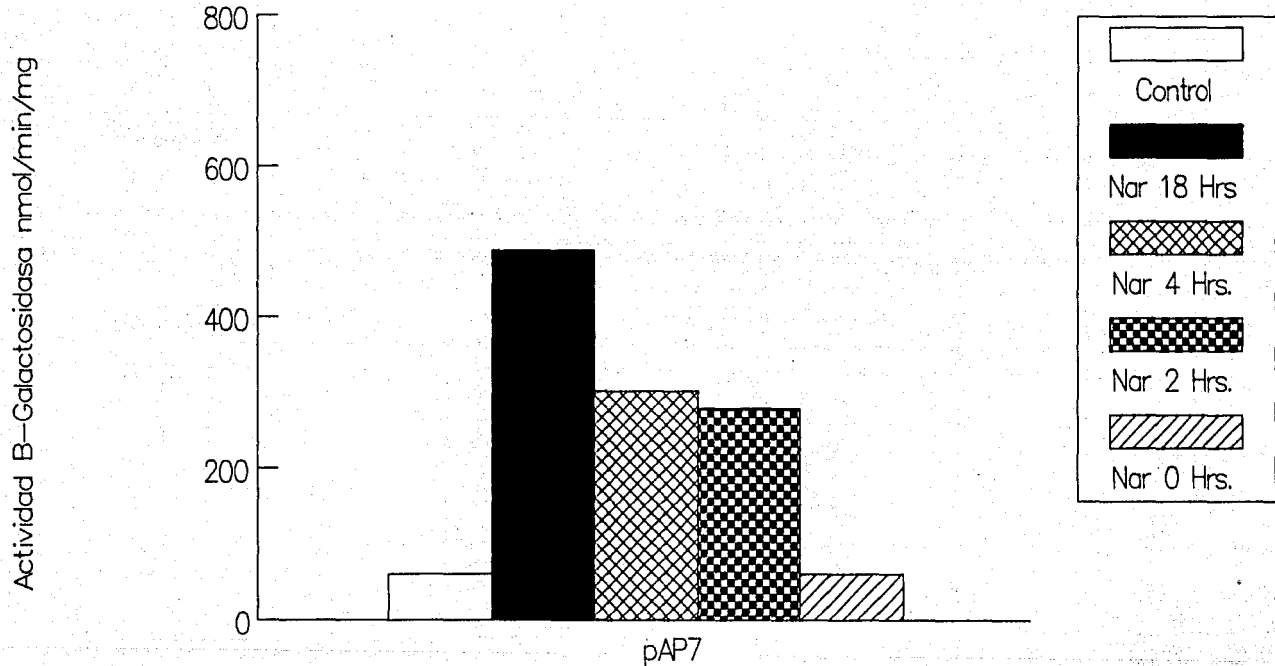


Figura 14

# Expresion de nodAp de *R.leg.viceae* en

2001 y 2001pSM991, 927, 828, 367

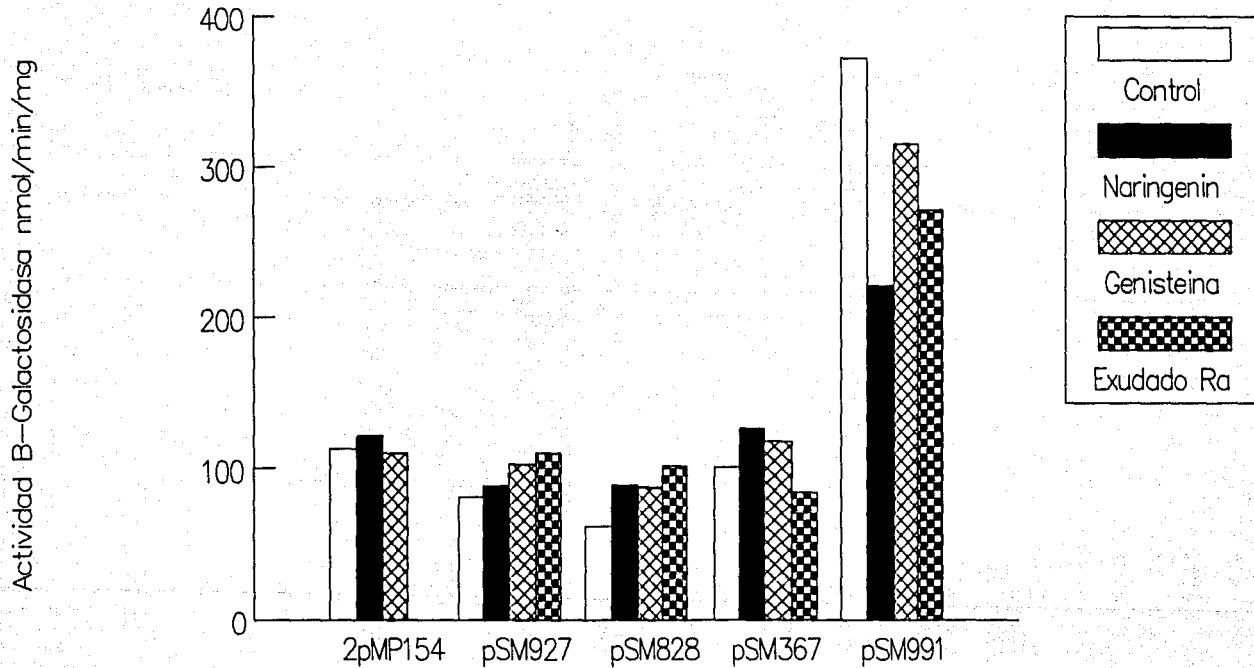


Figura 15

# Efecto de la Naringenina en CE-3pAP7,

pMV13,16,pMP154,2001pMP154pSM991-25,-40

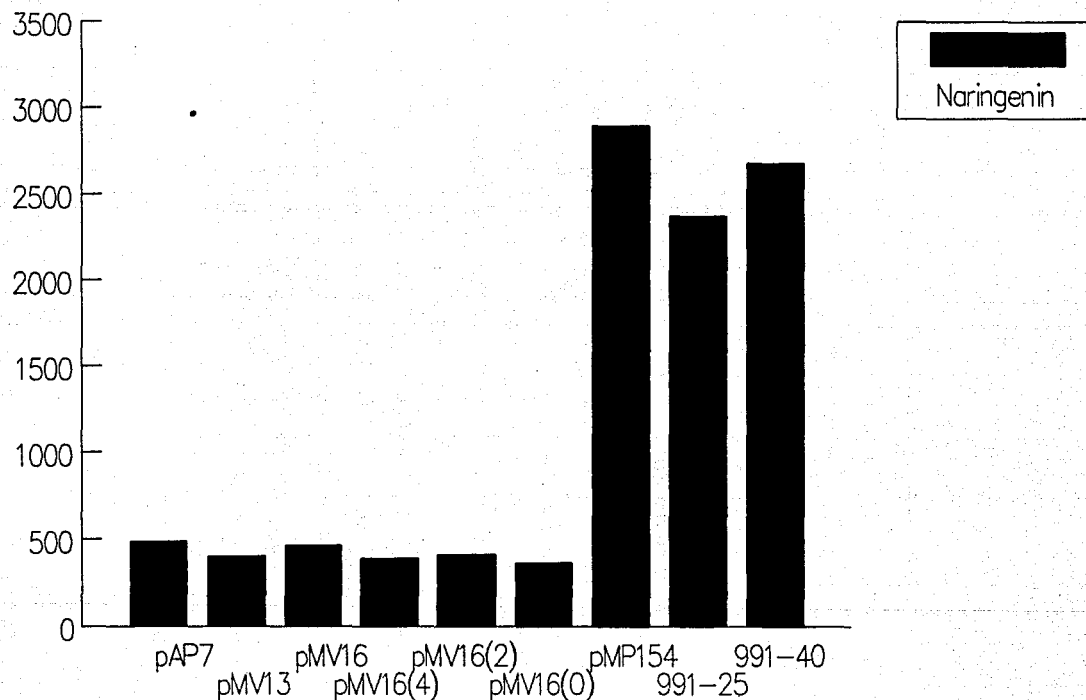
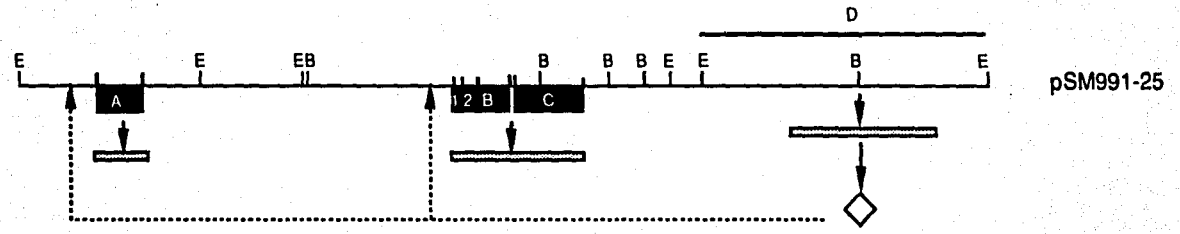


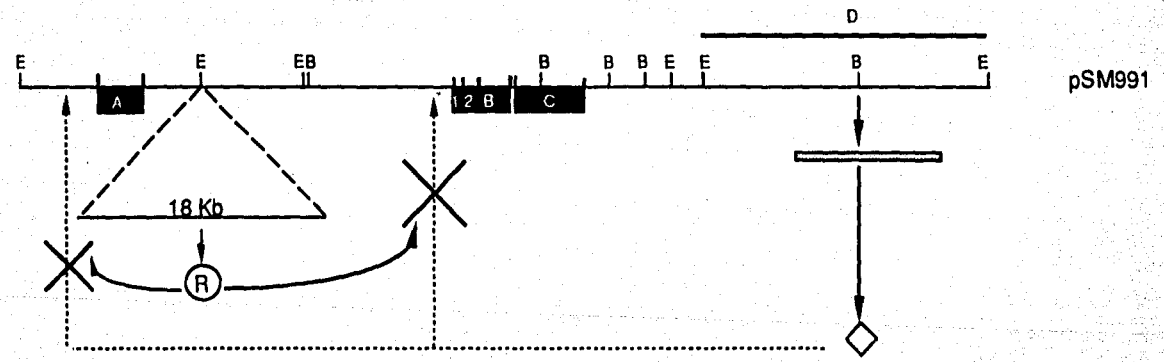
Figura 16



# POSIBLE REGULACION DE *nodA* Y *nodBC* DE *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*



pSM991-25



pSM991

## BIBLIOGRAFIA

- Banfalvi, Z., Sakanyan, V., Koncs, C., Kiss, A., Dkusha, I. and A. Kondorosi. 1981. Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of Rhizobium meliloti. Mol Gen Genet **184**: 318 - 325.
- Banfalvi, Z. and A. Kondorosi. 1989. Production of root hair deformation factors by Rhizobium meliloti nodulation genes in Escherichia coli: HsnD(nodH) is involved in the plant host-specific modification of the NodABC factor. Plant Mol Biol **13**: 1 - 12.
- Casadaban, M.J. 1975. Fusion of the Escherichia coli lac genes to the ara promoter: a general technique using bacteriophage Mu-1 insertions. Proc Natl Acad Sci USA **72**: 809 - 813.
- Cervantes, E., Sharma, S.B., Maillet, F., Vasse, J., Trouchet, G. and C. Rosenberg. 1989. The Rhizobium meliloti host range nodO gene encodes a protein which shares homology with translational elongation and initiation factors. Mol Microbiol **3**: 745 - 755.
- Cevallos, M.A., Vázquez, M., Dávalos, A., Espin, G., Sepúlveda, J. and C. Quinto. 1989. Characterization of Rhizobium phaseoli Sym plasmid regions involved in nodule morphogenesis and host-range specificity. Mol Microbiol **3**: 879 - 889.
- Cremers, H.C.J.C., Wijffelman, C.A., Pees, E., Rolfe, B.G., Djordjevic, M.A. and B.J.J. Lugtenberg. 1988. Host specific nodulation of plants of the pea cross-inoculation group is influenced by genes in fast growing Rhizobium downstream nodC. J Plant Physiol **132**: 398 - 404.
- Debelle, F. and S.B. Sharma. 1986. Nucleotide sequence of Rhizobium meliloti RCR2011 genes involved in host specificity of nodulation. Nucl Ac Res **14**: 7453 - 7472.
- De Maagd, R.A., Wijffjes, A.H.M., Spaank, H.P., Ruiz-Sainz, J.E., Wijffelman, C.A., Okker, R.J.H. and B.J.J. Lugtenberg. 1989. nodO, a new nod gene of the Rhizobium leguminosarum biovar viceae sym plasmid pRL1JI, encodes a secreted protein. J Bacteriol **171**: 6764 - 6770.
- Ditta, G., Corbin, D. and D.Helinski. 1980. Broad host range DNA cloning system for gram negative bacteria: Construction of a gene bank of Rhizobium meliloti. Proc Natl Acad Sci USA **77**: 7347 - 7351.

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

Evans, I.J. and J.A. Downie. 1986. The nodI gene product of Rhizobium leguminosarum is closely related to ATP-binding bacterial transport proteins; nucleotide sequence analysis of the nodI and nodJ genes. Gene 43: 95 - 101.

Fisher, R.F. and S.R. Long. 1989. DNA footprint analysis of the transcription activator proteins NodD1 and NodD3 on inducible nod gene promoters. J Bacteriol 171: 5492 - 5502.

Faucher, C., Maillet, F., Vasse, J., Rosenberg, C., van Brussel, A.A.N., Truchet, G. and J.Dénarié. 1988. Rhizobium meliloti host range nodH gene determines production of an alfalfa-specific extracellular signal. J Bacteriol 170: 5489 - 5499.

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

Göttfert, M., Lamb, J.W., Gasser, R., Semenza, J. and H. Hennecke. 1989. Mutational analysis of the Bradyrhizobium japonicum common nod genes and further nod box-linked genomic DNA regions. Mol Gen Genet 215: 407 - 415.

Groisman, E.A. and M.J.Casadaban. 1986. Mini-Mu bacteriophage with plasmid replicons for in vivo cloning and lac gene fusions. J Bacteriol 168: 357 - 364.

Hartwig, U.A., Maxwell, C.A., Joseph, C.M. and D.A. Phillips. 1990. Chrysoeriol and luteolin released from alfalfa seeds induce nod genes in Rhizobium meliloti. Plant Physiol 92: 122 - 126.

Honma, M.A. and F.M. Ausubel. 1987. Rhizobium meliloti has three functional copies of the nodD symbiotic regulatory gene. Proc Natl Acad Sci USA 84: 8558 - 8562.

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

Hooykaas, P.J.J., Klapwijk, P.M., Nuti, M.P., Schilperoort, R.A. and A.Rörsch. 1979. Transfer of the Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid to avirulent agrobacteria and to Rhizobium ex planta. J Gen Microbiol 98: 477 - 484.

Hooykaas, P.J.J., Ledebur, A.M., Wikijne, J., Schilperoort, R.A., Nuti, M.P., Lepidi, A.A., Casse, F., Bouchar, C., Julliot, J.S. and J. Dénarié. 1978. Detection, isolation and characterization of large plasmids in Rhizobium. In Nitrogen Fixation Research Progress, I.H.J. Evans, P.J. Bottomley and W.E. Newton (Ed). Nijhoff Publishers.

Horvath, B., Bachem, C.W.B., Schell, J. and A. Kondorosi. 1987. Host-specific regulation of nodulation genes in Rhizobium is mediated by a plant-signal, interacting with the nodD gene product. EMBO 6: 841 - 848.

Howe, M.M. 1973. Transduction by bacteriophage MU-1. Virology 55: 103 - 117.

John, M., Schmidt, J., Wieneke, U., Krüssmann, H.D. and J. Schell. 1988. Transmembrane orientation and receptor-like structure of the Rhizobium meliloti common nodulation protein NodC. EMBO 7: 583 - 588.

Johnson, D., Roth, E. and G. Stacey. 1989. Immunogold localization of the NodC and NodA proteins of Rhizobium meliloti. J Bacteriol 171: 4583 - 4588.

Kondorosi, E., Banfalvi, Z. 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., Schmidt, J., John, M., Duda, E., Hofmann, B., Schell, J. and A. Kondorosi. 1989. Positive and negative control of nod gene expression in Rhizobium meliloti is required for optimal nodulation. EMBO 8: 1331 - 1340.

Kosslak, R.M., Bookland, R., Barkei, J., Paaren, H.E. and E.R. Applebaum. 1987. Induction of Bradyrhizobium japonicum nod genes by isoflavones isolated from Glycine max. Proc Natl Acad Sci USA 84: 7428 - 7432.

Long, S.R. 1984. Genetics of Rhizobium nodulation. In Plant Microbe Interaction. E. Nester and T. Kosuge (ed). MacMill Publishers, New York.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and R.J. Raudall. 1951. Protein measurements with folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265 - 275.

Maxwell, C.A., Hartwig, U.A., Joseph, C.M. and D.A. Phillips. 1989. A chalcone and two related flavonoids released from alfalfa roots induce nod genes of Rhizobium meliloti. Plant Physiol 91: 842 - 847.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. and J. Sambrook. 1982. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Miller, J.H. 1972. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 352 - 355.

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

Mulligan, J.T. and S.R. Long. 1989. A family of activator genes regulates expression of Rhizobium meliloti nodulation genes. Genetics 122: 7 - 18.

Murooka, Y., Takizawa, N. and T. Harada. 1981. Introduction of Bacteriophage Mu into bacteria of various genera and intergeneric gene transfer by RP4::Mu. J Bacteriol 145: 358 - 368.

Noel, K.D., Sánchez, A., Fernández, L., Leemans, J. and M.A.Cevallos. 1984. Rhizobium phaseoli symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. J Bacteriol 158: 148 - 155.

Palacios, R., Quinto, C., de la Vega, H., Flores, M., Fernández, L., Hernández, M., Ballado, T. and G. Soberón. 1983. General organization of nitrogen fixation genes in Rhizobium phaseoli. In Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interactions.

Pühler, A. (Ed.). Berlin: Springer Verlag, 164 - 168.

Peters, N., Frost, J. and S.R. Long. 1986. A plant flavone, luteolin, induces expression of Rhizobium meliloti nod genes. Sciences 233: 977 - 980.

Quinto, C., de la Vega, H., Flores, M., Fernández, L., Ballado, T., Soberón, G. and R. Palacios. 1982. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in Rhizobium phaseoli. Nature 299: 724 - 726.

Ratet, P. and F. Richaud. 1986. Construction and uses of a new transposable element whose insertion is able to produce gene fusions with the neomycin-phosphotransferase-coding region of Tn903. Gene 42: 185 - 192.

Ratet, P., Schell, J. and F.J. de Bruijn. 1988. Mini-Mulac transposons with broad-host-range origins of conjugal transfer and replication designed for gene regulation studies in Rhizobiaceae. Gene 63: 41 - 52.

Recourt, K., van Brussel, A.A.N., Driessen, A.J.M. and B.J.J. Lugtenberg. 1989. Accumulation of a nod gene inducer, the flavonoid naringenin, in the cytoplasmic membrane of Rhizobium leguminosarum biovar viceae is caused by the pH-dependent hydrophobicity of naringenin. J Bacteriol 171: 4370 - 4377.

Redmond, J., Batley, J., Djordjevic, M., Innes, R., Kuempel, P. and B. Rolfe. 1986. Flavones induces expression of nod genes in Rhizobium. Nature 323: 632 - 635.

Rodriguez-Quiñones, F., Banfalvi, Z., Murphy, P. and A. Kondorosi. 1987. Interspecies homology of nodulation gene in Rhizobium. Plant Mol Biol 8: 61 - 75.

Rossen, L., Shearman, C.A., Johnston, A.W.B. and J.A. Downie. 1985. The nodD gene of Rhizobium leguminosarum is autoregulatory and in the presence of plant exudate induces the nodA, B, C genes. EMBO 4: 3369 - 3373.

Sanjuan, J. and J. Olivares. 1989. Implication of nifA in regulation of genes located on a Rhizobium meliloti cryptic plasmid that affect nodulation efficiency. J Bacteriol 171: 4154 - 4161.

Schlaman, H.R.M., Spaink, H.P., Okker, R.J.H. and B.J.J. Lugtenberg. 1989. Subcellular localization of the nodD gene product in Rhizobium leguminosarum. J Bacteriol 171: 4686 - 4693.

Schmidt, J., John, M., Wieneke, U., Krüssmann, H.D. and J. Schell. 1986. Expression of the nodulation gene nodA in Rhizobium meliloti and localization of the gene product in the cytosol. Proc Natl Acad Sci USA 83: 9581 - 9585.

Schmidt, J., Wingender, R., John, M., Wieneke, U. and J. Schell. 1988. Rhizobium meliloti nodA and nodB genes are involved in generating compounds that stimulate mitosis of plant cells. Proc Natl Acad Sci USA 85: 8578 - 8582.

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.

Shearman, C.A., Rossen, L., Johnston, A.W.B. and J.A. Downie. 1986. The Rhizobium leguminosarum nodulation gene nodF encodes a polypeptide similar to acyl-carrier protein and is regulated by nodD plus a factor in pea root exudate. EMBO 4: 647 - 652.

Simon, R., Priefer, U. and A. Pühler. 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. Biotechnol 1: 784 - 791.

Spaink, H.P., Wijffelman, C.A., Pees, E., Okker, R.J.H. and B.J.J. Lugtenberg. 1987. Rhizobium nodulation gene nodD as a determinant of host specificity. Nature 328: 337 - 339.

Spaink, H.P., Weinman, J., Djordjevic, M.A., Wijffelman, C.A., Okker, R.J.H. and B.J.J. Lugtenberg. 1989. Genetic analysis and cellular localization of the Rhizobium host specificity-determining NodE protein. EMBO 8: 2811 - 2818.

Surin, B.P. and J.A. Downie. 1988. Characterization of the Rhizobium leguminosarum genes nodLMN involved in efficient host-specific nodulation. Mol Microbiol 2: 173 - 183.

Surin, B.P., Watson, J.M., Hamilton, W.J.O., Economou, A. and J.A. Downie. 1990. Molecular characterization of the nod gene nodT, from two biovars of Rhizobium leguminosarum. Mol Microbiol 4: 245 - 252.

Tepfer, D., Goldmann, A., Pamboukdjian, N., Maille, M., Lepingle, A., Chevalier, D., Dénarié, J. and C. Rosenberg. 1988. A plasmid of Rhizobium meliloti 41 encodes catabolism of two compounds from root exudate of Calystegium sepium. J Bacteriol 170: 1153 - 1161.

Van Brussel, A.A.N., Planqué, K. and A. Quispel. 1977. The wall of Rhizobium leguminosarum in bacteroid and free-living forms. J Gen Microbiol 101: 51 - 56.

Vincent, J.M. 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. International Biological Program Handbook No. 15. Blackwell Scientific Publications, Ltd., Oxford. 75 - 76'

Yelton, M., Mulligan, J.T. and S.R. Long. 1987. Expression of Rhizobium meliloti nod genes in Rhizobium and Agrobacterium backgrounds. J Bacteriol 169: 3094 - 3098.

Zaat, S.A.J., Wijffelman, C.A., Spaink, H.P., Van Brussel, A.A.N., Okker, R.J.H. and B.J.J. Lugtenberg. 1987. Induction of the nodA promoter of Rhizobium leguminosarum Sym plasmid pRL1JI by plant flavanones and flavones. J Bacteriol 169: 198 - 204.

Zaat, S.A.J., Wijffelman, C.A., Mulders, I.H.M., van Brussel, A.A.N. and B.J.J. Lugtenberg. 1988. Root exudates of various host plants of Rhizobium leguminosarum contain different sets of inducer of Rhizobium nodulation genes. Plant Physiol 86: 1298 - 1303.