



Universidad Nacional Autónoma de México
Doctorado en Ciencias Biomédicas
Centro de Ciencias Genómicas

**Estudio de los reguladores OmpR/PhoB y su participación en
la simbiosis *Rhizobium etli* – *Phaseolus vulgaris*.**

Tesis
para optar por el grado de:

Doctor en Ciencias

Presenta:

Susana Rodríguez Rojas Vertiz

Director de tesis:
Dra. María de Lourdes Girard Cuesy
Doctorado en Ciencias Biomédicas

Comité tutor:
Dr. Dimitris Georgellis, Instituto de Fisiología Celular UNAM
Dr. David S. Zamorano Sánchez, Centro de Ciencias Genómicas UNAM

Cuernavaca, Mor., 15 de Marzo del 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fue realizado en el Programa de Biología Sintética y Biología de Sistemas del Centro de Ciencias Genómicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Parte de los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral están publicados en el artículo científico:

Susana Rodríguez, David Correa-Galeote, Mishael Sánchez-Pérez, Mario Ramírez, Mariel C. Isidra-Arellano, María del Rocío Reyero-Saavedra, David Zamorano-Sánchez, Georgina Hernández, Oswaldo Valdés-López and Lourdes Girard. 2020. A Novel OmpR-type Response Regulator Controls Multiple Stages of the *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* N₂-Fixing Symbiosis. *Front. Microbiol.* 11:615775. doi: 10.3389/fmicb.2020.615775

Este trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. María de Lourdes Girard Cuesy.

El comité tutorial que evaluó el avance del presente trabajo de investigación se conformó por la Dra. María de Lourdes Girard Cuesy, el Dr. Dimitris Georgellis y el Dr. David S. Zamorano Sánchez.

El jurado de candidatura estuvo conformado por los Doctores Dimitris Georgellis (IFC), David Romero Camarena (CCG), Isabel Lara López (CCG), Elda Guadalupe Espín Ocampo (IBT) y Bertha González Pedrajo (IFC).

Participaron como jurados del examen de grado los doctores David Romero Camarena (CCG), María de Lourdes Girard Cuesy, Gloria Soberón Chávez (Instituto de Investigación Biomédicas), Edmundo Calva Mercado (IBt) y Ma. del Carmen Monserrat Quinto Hernandez (IBt).

Susana Rodríguez Rojas Vertiz recibió una beca para estudios de doctorado otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con número de becario 595292. Realizó una estancia de investigación en el Departamento de Microbiología Ambiental y Biodegradación de la Estación Experimental del Zaidín del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (EEZ-CSIC) en Granada, España, con apoyos del Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado UNAM (PAEP) y una Beca de Movilidad 2018 para estancia en el extranjero otorgada por el CONACyT (291250). Así mismo recibió financiamiento por parte de PAEP-UNAM para asistir a congresos nacionales e internacionales donde se presentaron los avances de este trabajo.

Este trabajo fue parcialmente financiado por los Proyectos PAPIIT IN206017 y IN204320 de la DGAPA UNAM.

Agradecimientos

A mis papás y mi hermano por todo su apoyo, ánimo, cariño y amor incondicional que me dan cada día. A mis primos, tíos y mi abuela por su cariño y apoyo. A todos mis amigos de Cuernavaca por compartir momentos inigualables, por sus alegrías, risas, bailes, juegos, apoyos y consejos. A mis amigos de Xicotepec que los aprecio mucho. Les agradezco con todo mi corazón por estar ahí presentes.

A la Dra. Girard por todo su apoyo, trabajo, paciencia, dedicación, impulso y amistad incondicional durante el doctorado.

A María de la Paz Elizabeth Salas Ocampo y Marisa Rodríguez Padilla por su invaluable ayuda, y al Dr. David Correa Galeote, que estuvo realizando una estancia posdoctoral en nuestro grupo de trabajo, por su apoyo, disponibilidad, consejos, paciencia y su gran amistad.

A Mishael Sánchez Pérez por su contribución y apoyo en los análisis bioinformáticos del proyecto.

A la Dra. Georgina Hernández, al Dr. Mario Ramírez Yáñez, al Dr. Alfonso Leija Salas y a la MIBB. Sara I. Fuentes Membreño del Programa de Genómica Funcional de Eucariotes del CCG-UNAM por su apoyo y enseñanzas a lo largo de mi doctorado.

Al Dr. Oswaldo Valdés López, Mariel C. Isidra Arellano y María del Rocío Reyero Saavedra del Laboratorio de Genómica Funcional de Leguminosas de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM por su colaboración.

Al Dr. Jaime Mora Celis por facilitarnos el uso del invernadero.

A la Dra. Guadalupe Zavala, encargada de la Unidad de Microscopia Electrónica del IBt-UNAM, por su apoyo en el uso del microscopio electrónico de transmisión.

Al Dr. Tino Krell y al Dr. Miguel Matilla de la EEZ-CSIC Granada, España por su amabilidad, hospitalidad, disponibilidad y consejos durante mi estancia de investigación en su laboratorio.

A los integrantes de mi comité tutorial, el Dr. David S. Zamorano Sánchez y el Dr. Dimitris Georgellis, por sus aportaciones y comentarios a lo largo del desarrollo del proyecto.

A los miembros del jurado de grado conformado por los doctores David Romero Camarena (CCG), María de Lourdes Girard Cuesy (CCG), Gloria Soberón Chávez (Instituto de Investigación Biomédicas), Edmundo Calva Mercado (IBt) y Ma. del Carmen Monserrat Quinto Hernandez (IBt), por el tiempo y el esfuerzo dedicados para leer y corregir el presente escrito.

Al Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM y a toda su comunidad por su amistad y apoyo.

Índice

Resumen

Abstract

1. Introducción

1.1 Fijación biológica de nitrógeno	1
1.2 Fijación simbiótica de nitrógeno	2
1.3 Etapas del establecimiento de la simbiosis leguminosa- <i>Rhizobium</i>	3
1.4 El oxígeno como señal para la expresión de genes involucrados en la fijación simbiótica de nitrógeno	7
1.5 Regulación de la fijación simbiótica de nitrógeno: genes <i>nif</i> y <i>fix</i>	8
1.6 Transporte y metabolismo del carbono y del nitrógeno en los nódulos fijadores de nitrógeno	11
1.7 Sistemas de bombas de eflujo de resistencia a multidrogas en bacterias y su participación en la simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosa	12
1.8 Sistemas de dos componentes	14
1.9 Reguladores OmpR/PhoB en <i>Rhizobia</i>	17
1.10 <i>Rhizobium etli</i> como modelo de estudio	26

2. Hipótesis y objetivos

2.1 Hipótesis	29
2.2 Objetivo general	29
2.3 Objetivos particulares	29

3. Material y métodos

3.1 Cepas bacterianas y plásmidos	31
3.2 Cultivos bacterianos	32
3.3 Antibióticos	33
3.4 Oligonucleótidos	33
3.5 Técnicas de biología molecular para la construcción de plásmidos recombinantes	35
3.6 Obtención de plásmidos recombinantes	36
3.6.1 Plásmidos para homogenotización	
3.6.2 Fusiones transcripcionales con el gen reportero <i>uidA</i>	
3.6.3 Plásmidos de expresión de genes bajo el control de un promotor inducible por cumato	
3.6.4 Plásmidos para complementación de fenotipos	
3.6.5 Plásmidos de expresión de proteínas recombinantes con etiquetas His ₆	
3.7 Obtención de mutantes derivadas de <i>Rhizobium etli</i> CE3	38
3.8 Ensayo de motilidad por nado de <i>Rhizobium etli</i>	39
3.9 Análisis de flagelos por microscopía electrónica de transmisión	39

3.10 Formación y cuantificación de biofilm	39
3.11 Ensayo de actividad específica de β -glucuronidasa	39
3.12 Experimento de simbiosis frijol- <i>Rhizobium</i>	40
3.12.1 Esterilización de semillas de frijol y germinación	
3.12.2 Preparación de inóculos bacterianos	
3.12.3 Cultivo de planta de frijol en hidroponía	
3.12.4 Cultivo de planta de frijol en bolsas de germinación	
3.12.5 Cultivo de planta para el análisis de expresión de genes	
3.12.6 Contenido de Leghemoglobina	
3.12.7 Contenido de Leghemoglobina en nódulos de frijol	
3.12.8 Adhesión a raíz y deformación de pelos radicales	
3.12.9 Histología de nódulos	
3.13 Análisis de expresión	43
3.13.1 Purificación de ARN de cultivos bacterianos	
3.13.2 Purificación de ARN vegetal (raíz y nódulo)	
3.13.3 Síntesis de ADN complementario	
3.13.4 Análisis cuantitativo de expresión génica	
3.14 RT-PCR del operón <i>RetPC57-RetPC58</i>	44
3.15 Fosforilación de proteínas <i>in vitro</i>	44
3.15.1 Purificación de proteínas recombinantes His ₆ -HKPC58 y His ₆ -RetPC57	
3.15.2 Ensayo de fosforilación <i>in vitro</i>	
3.16 Ortología, filogenia y análisis comparativo del contexto genómico de RetPC57	45
3.17 Análisis estadísticos	45
4. Resultados	
4.1 Análisis fenotípico de mutantes OmpR/PhoB de <i>R. etli</i> CE3	46
4.2 El ORF <i>RetPC57</i> de <i>R. etli</i> codifica para un regulador respuesta altamente conservado en rizobiales pertenecientes al grupo <i>Rhizobium/Agrobacterium</i>	51
4.3 El regulador RetPC57 y la histidina quinasa RetPC58 forman un sistema de dos componentes	53
4.4 El regulador RetPC57 y la condición simbiótica son necesarios para la expresión del locus <i>RetPC57</i>	56
4.5 La ausencia del regulador RetPC57 afecta la simbiosis <i>R. etli</i> – <i>Phaseolus vulgaris</i>	58
4.6 RetPC57 se requiere para una infección apropiada de <i>Rhizobium</i> en la raíz de <i>P. vulgaris</i>	60
4.7 La ausencia de RetPC57 afecta la expresión de genes de la bacteria y de la planta involucrados en el proceso de infección	62
4.8 Genes esenciales para la fijación simbiótica de nitrógeno se sobre-expresan en nódulos formados por la mutante en RetPC57	67

5. Discusión	69
6. Conclusiones	74
7. Perspectivas	77
8. Referencias	78
9. Anexo I. Artículo publicado	89

Índice de figuras

Figura 1.1 El mecanismo enzimático de la nitrogenasa	2
Figura 1.2 Mecanismos moleculares de la señalización leguminosa- <i>Rhizobium</i>	4
Figura 1.3 Formación del nódulo en las raíces de las leguminosas	6
Figura 1.4 Mecanismos de protección ante el O ₂ en los nódulos	8
Figura 1.5 Redes de regulación de los genes <i>fix</i> y <i>nif</i> en algunas rhizobia	10
Figura 1.6 Metabolismo del carbono y el nitrógeno en nódulos determinados e indeterminados	11
Figura 1.7 Bombas de eflujo de resistencia a multidrogas (MDR) en bacterias gram-negativas	13
Figura 1.8 Esquema general de los sistemas de dos componentes	15
Figura 1.9 Esquema de la regulación de la motilidad en <i>S. meliloti</i> y <i>R. leguminosarum</i>	19
Figura 1.10 Regulación del ciclo celular de <i>Caulobacter crescentus</i> y <i>Sinorhizobium meliloti</i>	22
Figura 1.11 Cascada de regulación de los genes <i>fix</i> en <i>S. meliloti</i> y <i>R. etli</i>	25
Figura 4.1 El regulador OmpR/PhoB RHE_PC00057 participa en la motilidad de <i>R. etli</i>	47
Figura 4.2 Microscopia electrónica de transmisión de flagelos de <i>R. etli</i>	48
Figura 4.3 Formación de biofilm por mutantes OmpR/PhoB de <i>R. etli</i>	49
Figura 4.4. Análisis de contexto genómico del locus <i>RetPC57</i> y genes ortólogos	52
Figura 4.5 Árbol filogenético de genes relacionados de la región genómica de <i>RetPC57</i>	53
Figura 4.6 <i>RetPC57</i> y <i>RetPC58</i> están codificados en un operón	54
Figura 4.7 <i>RetPC57</i> y <i>RetPC58</i> son un sistema de dos componentes	55
Figura 4.8 Análisis de expresión de genes de la región genómica de <i>RetPC57</i>	57
Figura 4.9 Cinética del número de nódulos formados por las cepas WT y Δ <i>RetPC57</i> de <i>R. etli</i>	58
Figura 4.10 Fenotipo simbiótico de la mutante Δ <i>RetPC57</i> de <i>R. etli</i>	59
Figura 4.11 <i>RetPC57</i> se requiere para una apropiada adhesión de <i>R. etli</i> en las raíces de frijol	61
Figura 4.12 <i>RetPC57</i> participa en el proceso de infección de las raíces de frijol	62
Figura 4.13 <i>RetPC57</i> es necesario para una expresión adecuada de los genes <i>nodA</i> y <i>nodB</i> en raíces de frijol	63
Figura 4.14 <i>RetPC57</i> regula positivamente la expresión de los genes <i>RetPC55</i> , <i>RetPC56</i> y <i>nodTc</i> en las raíces de frijol	64
Figura 4.15 Patrón de expresión relativa de los genes <i>rmrA</i> , <i>rmrR</i> y <i>RHE_CH03357</i> en raíces y nódulos de frijol	65
Figura 4.16 Expresión relativa de los genes <i>RHE_CH01192</i> y <i>RHE_CH01305</i> en raíces y nódulos de frijol	65

Figura 4.17 RetPC57 regula negativamente la expresión de los genes <i>mexE1</i> y <i>mexF1</i> relacionados con la síntesis de bombas de eflujo RND	66
Figura 4.18 Expresión de genes de frijol común relacionados con la infección por rhizobia y nodulación temprana en raíces de frijol	67
Figura 4.19 Expresión de genes simbióticos esenciales para la FSN en bacteroides de nódulos de <i>P. vulgaris</i> formados por las cepas WT y Δ RetPC57	68
Figura 4.20 Expresión de genes simbióticos esenciales para el metabolismo del nitrógeno y del carbono en nódulos de <i>P. vulgaris</i> inducidos por las cepas WT y Δ RetPC57 de <i>R. etli</i>	68
Figura 6.1 Participación del regulador RetPC57 en las etapas tempranas de la simbiosis <i>R. etli</i> – <i>P. vulgaris</i>	75
Figura 6.2 Participación del regulador RetPC57 en la etapa de fijación de nitrógeno de la simbiosis <i>R. etli</i> – <i>P. vulgaris</i>	76

Índice de tablas

Tabla 1.1 Análisis de comparación de los sistemas de dos componentes y reguladores OmpR/PhoB entre diversas especies de los rhizobia	17
Tabla 1.2 Distribución de los genes que codifican a las HKs y los RRs en el genoma de <i>R. etli</i> CFN42	27
Tabla 3.1. Cepas bacterianas y plásmidos	31
Tabla 3.2. Oligonucleótidos usados en este trabajo	33
Tabla 3.3. Procedimiento de PCR para generar productos sobrelapados	36
Tabla 4.1. Análisis de ortología de los reguladores tipo OmpR/PhoB de <i>R. etli</i> CFN42	46
Tabla 4.2 Fenotipo simbiótico de plantas <i>P. vulgaris</i>	50
Tabla 4.3 Análisis de expresión de los genes <i>RetPC57</i> , <i>RetPC58</i> , <i>RetPC56</i> y <i>nodTc</i> en diferentes derivadas de <i>R. etli</i>	56

Resumen

Una relación simbiótica efectiva entre plantas leguminosas y rhizobia fijadoras de nitrógeno requiere determinantes genéticos tanto de la planta como de la bacteria. Los sistemas de dos componentes (SDC) forman parte de las cascadas de regulación genética de las bacterias en respuesta a señales del medio ambiente. Están formados por una proteína histidina quinasa y un regulador de respuesta. Los reguladores OmpR/PhoB forman una de las familias de reguladores de respuesta mejor caracterizadas, e incluye reguladores transcripcionales con una variedad de funciones fisiológicas incluido el control de la fijación simbiótica de nitrógeno (FSN). El genoma de *Rhizobium etli* CE3 codifica 18 reguladores tipo OmpR, cuya función en la mayoría de ellos es desconocida. En este trabajo, demostramos que el regulador de la respuesta RetPC57 (RHE_PC00057) de *R. etli* CE3 es importante para la motilidad de la bacteria y tiene un papel funcional a lo largo de las diferentes etapas del proceso simbiótico con plantas de frijol. La eliminación del gen *RetPC57* (Δ RetPC57) provoca una disminución en el nivel de expresión de genes bacterianos involucrados en la producción de factores de nodulación (*nodA* y *nodB*) y de genes de la planta que se expresan en las etapas tempranas de la nodulación (*NSP2*, *NIN*, *NF-YA* y *ENOD40*). Mientras que los nódulos formados en plantas de frijol inoculadas con la mutante Δ RetPC57 presentan una mayor actividad de fijación de nitrógeno coincidente con una mayor expresión de los genes *PEPC* y *GOGAT*, relevantes para el metabolismo del carbono/nitrógeno en el nódulo, y de los genes bacterianos involucrados directamente en la FSN (*hfixL*, *fixKf*, *fnrN*, *fixN*, *nifA* y *nifH*). RetPC57 regula su propia expresión y la de sus genes vecinos (*RHE_PC00055*, *RHE_PC00056*, *RHE_PC00058* y *RHE_PC00059*) en respuesta a las condiciones simbióticas y contribuye a la expresión apropiada de genes cuyos productos forman parte de las bombas de eflujo de múltiples drogas (MDR). En conjunto, nuestros datos muestran que el regulador RetPC57, previamente no caracterizado, es un jugador clave en el desarrollo de la simbiosis *R. etli* – *P. vulgaris*.

Abstract

An effective symbiotic relationship between legume plants and nitrogen fixing rhizobia requires genetic determinants from both plant and bacteria. Two component systems (TCS) are part of the genetic regulatory cascades of bacteria that respond to signals from the environment. TCS typically consist of a histidine kinase and a response regulator. The OmpR/PhoB regulators form one of the best characterized response regulators and include transcriptional regulators with a variety of physiological functions including the control of symbiotic nitrogen fixation (SNF). The *Rhizobium etli* CE3 genome encodes 18 OmpR-type regulators, whose function in most of these is unknown. In this work, we demonstrated that the response regulator RetPC57 (RHE_PC00057) of *R. etli* CE3 is important for the bacterial motility and has a functional role throughout the different stages of the symbiotic process with bean plants. Elimination of the *RetPC57* gene (Δ RetPC57) provokes a decrease in the level of expression of bacterial genes involved in the production of nodulation factors (*nodA* and *nodB*) and also affect the expression of plant genes that are expressed in the early stages of nodulation (*NSP2*, *NIN*, *NF-YA* and *ENOD40*). Interestingly, nodules elicited by Δ RetPC57 showed increased expression of genes relevant for Carbon/Nitrogen nodule metabolism (*PEPC* and *GOGAT*) and Δ RetPC57 bacteroids showed higher nitrogen fixation activity as well as increased expression of key genes directly involved in SNF (*hfixL*, *fixKf*, *fnrN*, *fixN*, *nifA* and *nifH*). RetPC57 regulates its own expression and that of its neighboring genes (RHE_PC00055, RHE_PC00056, RHE_PC00058 and RHE_PC00059) in response to symbiotic conditions and contributes to the appropriate expression of genes whose products are part of multi-drug efflux pumps. Taken together, our data show that the previously uncharacterized regulator RetPC57 is a key player in the development of the *R. etli* - *P. vulgaris* symbiosis.

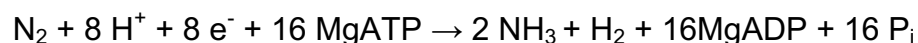
1. Introducción

1.1 Fijación biológica de nitrógeno

El nitrógeno es un elemento esencial para los seres vivos debido a que es un componente de los ácidos nucleicos, proteínas, algunos carbohidratos y lípidos. A pesar de ser el elemento más abundante en la atmósfera terrestre (80% en volumen), es una fuente nutritiva muy escasa ya que se encuentra en forma de gas (N₂), y para poder ser asimilado por los organismos debe de ser convertido en amoníaco o en nitrato. Sin embargo, algunos microorganismos conocidos como diazótrofos son capaces de reducir el nitrógeno atmosférico en amonio, ya sea en vida libre o bien estableciendo una relación simbiótica con las raíces de plantas leguminosas. Este proceso es conocido como fijación biológica de nitrógeno (FBN).

El complejo enzimático dinitrogenasa o nitrogenasa, cataliza la reducción del nitrógeno a amoníaco. Este complejo consiste de una proteína de hierro (componente II, o dinitrogenasa reductasa) y de una proteína de hierro-molibdeno (componente I, o dinitrogenasa) (Figura 1.1). La nitrogenasa reductasa es codificada por el gen *nifH* y está formada por solo una proteína de hierro (Fe-proteína); mientras que, la dinitrogenasa es codificada por los genes *nifD* y *nifK*, y está formada por dos proteínas, una de hierro (Fe) y otra de molibdeno (Mo). Dependiendo de la disponibilidad de Mo en el medio, éste puede ser sustituido por vanadio (V). La expresión del operón de la nitrogenasa, *nifHDK*, es controlado por el regulador NifA y por la concentración de O₂ en el medio (Halbleib and Ludden, 2000; Dixon and Kahn, 2004; Rutten and Poole, 2019).

La estequiometría de la reacción de fijación de N₂ es la siguiente:



en la que se produce una molécula de H₂ por cada mol de N₂ reducido, y se hidrolizan dos moléculas de ATP por cada electrón transferido (Halbleib and Ludden, 2000; Rees and Howard, 2000). El mecanismo enzimático de la nitrogenasa requiere primero de la reducción de la Fe-proteína por donadores de electrones como la ferredoxina o la flavodoxina, seguida de la transferencia de electrones (dependiente de la hidrólisis de MgATP) a la MoFe-proteína, y finalmente la transferencia interna de los electrones en la MoFe-proteína (Figura 1.1) (Dixon and Kahn, 2004). Una parte importante del poder reductor que se utiliza para fijar N₂ se pierde en forma de H₂ a causa de una reacción colateral e inevitable catalizada por la nitrogenasa, lo que representa una fuente de ineficiencia energética del proceso de fijación biológica. Algunas bacterias poseen un sistema de hidrogenasa capaz de oxidar el H₂ producido, lo que les permite recuperar parte del poder reductor utilizado en su síntesis. De esta manera, se mejora la eficiencia energética del sistema de fijación de N₂ (Layzell and Hunt, 1990).

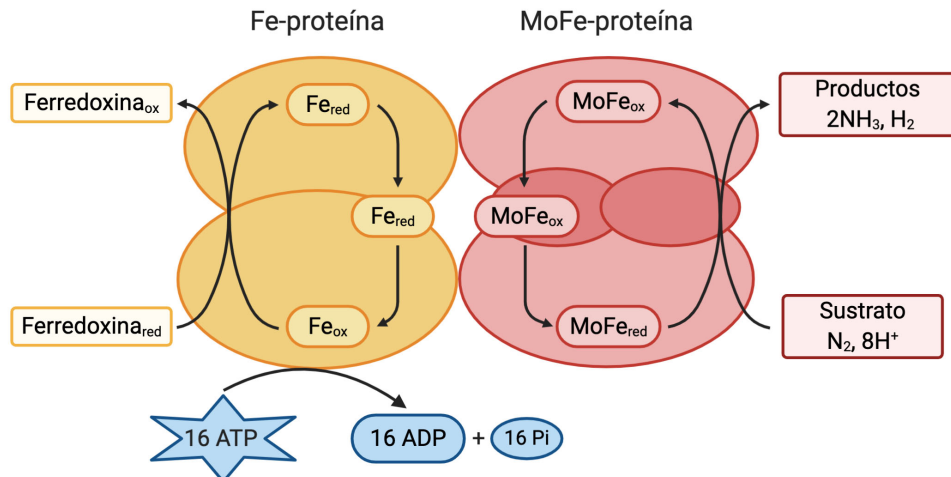


Figura 1.1 El mecanismo enzimático de la nitrogenasa. La ferredoxina reduce a la Fe-proteína. La unión e hidrólisis del ATP en la Fe-proteína causa su cambio conformacional y facilita la reacción de reducción de la MoFe-proteína. La proteína MoFe reduce el dinitrógeno a amonio. Modificado de Taiz and Zeiger (2003). Modificado de Taiz and Zeiger (2003).

1.2 Fijación simbiótica de nitrógeno

La fijación simbiótica de nitrógeno (FSN) es una de las interacciones biológicas más importantes y estudiadas debido a su importancia agronómica, económica y social. Se da entre algunas bacterias diazótrofes conocidas genéricamente como rizobia y las raíces de plantas superiores de la familia Leguminosae. Esta relación simbiótica da a lugar a la formación de unas estructuras especializadas denominadas nódulos, donde estas bacterias diferenciadas en bacteroides llevan a cabo el proceso de FBN. Además, supone una complementación nutricional recíproca, la planta recibe una fuente de N_2 en forma de ureido o amida, mientras que la bacteria dispone de una fuente de carbono y de energía.

Los rizobia pertenecen a diferentes familias de las subclases alfa- y beta- proteobacterias. En el grupo de beta-proteobacterias encontramos los géneros *Bulkholderia*, *Cupriavidus* y *Herbaspirillum*. Mientras que, dentro de las alfa-proteobacterias se encuentran los géneros *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium* (recientemente incluido en *Ensifer*). Las leguminosas que establecen simbiosis fijadoras de nitrógeno pertenecen a la familia Fabaceae, donde existen dos clados principales (Galegoid y Phaseoloid) que incluyen cultivos de importancia agrícola. Los miembros del clado Galegoid son de climas templados como *Medicago truncatula*, *Medicago sativa* (alfalfa) y *Pisum sativum* (chícharo), mientras que miembros del clado Phaseoloid son de climas tropicales y subtropicales como *Lotus japonicus*, *Vicia faba* (haba), *Glycine max* (soja) y *Phaseolus vulgaris* (frijol).

El establecimiento de una simbiosis efectiva se da a través de un proceso complejo que implica mecanismos de señalización y reconocimiento entre ambos simbioses. Los rhizobia requieren de la transición de un estilo de vida libre que habita en el suelo a una etapa de infección y posteriormente a un proceso de diferenciación a bacteroide fijador de nitrógeno dentro del nódulo. Mientras que las leguminosas requieren de cambios morfológicos y fisiológicos en la raíz para entrar a la fase de infección y de formación del nódulo.

1.3 Etapas del establecimiento de la simbiosis leguminosa-*Rhizobium*

El contacto entre la planta y la bacteria inicia por una comunicación molecular que da lugar a la adhesión de las bacterias al ápice de los pelos radicales de la raíz. Para sobrevivir y colonizar la raíz, los rhizobia requieren de las maquinarias de quimiotaxis y motilidad para detectar y moverse hacia la raíz. Las plantas secretan exudados fenólicos en el suelo que incluyen flavonoides, ácidos orgánicos, aminoácidos, entre otros, que le permiten controlar su microbiota (Poole et al., 2018; Wheatley and Poole, 2018). Los rhizobia a través de los sistemas de transporte y la maquinaria de quimiotaxis detectan los exudados de la planta que activan la maquinaria del flagelo para dirigirse hacia la raíz. Por ejemplo, en *Mesorhizobium tianshanense* una mutante en el gen *flgE*, que codifica para el gancho flagelar, se ve afectada en la adhesión a las raíces de su planta hospedera *Glycyrrhiza uralensis* o regaliz (Zheng et al., 2015). El gen *che1* es necesario para la colonización, adhesión e infección de *Rhizobium leguminosarum* a la raíz de *P. sativum* (Miller et al., 2007). Otros factores importantes para adhesión a la raíz son los exo- y lipo- polisacáridos (EPS y LPS) que son clave en la inmunidad, adherencia, invasión y nodulación de los rhizobia en la raíz (Niehaus et al., 1993; Janczarek, 2015; Zipfel and Oldroyd, 2017; Poole et al., 2018; Roy et al., 2020). Una vez adheridas a la raíz, los rhizobia se agregan y forman el biofilm, dando comienzo a la cascada de señalización y al proceso de infección.

Entre los exudados de la planta, los flavonoides son compuestos fenólicos que son detectados específicamente por los rhizobia a través del regulador transcripcional NodD. NodD induce la expresión de los genes *nod* y la síntesis de los factores de nodulación (FN), claves para el inicio de la infección a la raíz (Figura 1.2). Los FN son lipoquitooligosacáridos, constituidos por oligómeros de *N*-acetil D-glucosamina con uniones β 1-4, que son sintetizados por los genes *nodABC*, los cuales son conservados en todas las rhizobia (conocidos como genes *nod* comunes). Entre las diferentes especies, los FN pueden tener sustituciones químicas en su estructura general confiriendo de esta manera un rango de especificidad para infectar determinada leguminosa; a su vez, los flavonoides aportan otro nivel de especificidad, siendo estos característicos de cada leguminosa. Estas sustituciones químicas están dadas por modificaciones tanto en el extremo reductor como no reductor del esqueleto oligosacárido, e incluyen la adición de un grupo metilo, sulfato, acetilo, carbonilo o un azúcar modificado. Los responsables de estas sustituciones son algunos de los genes *nod*, *noi* y *noe*. La ausencia de los genes *nod*, resulta en la incapacidad de establecer el proceso de infección (Spaink, 2000; Oldroyd, 2013) en la gran mayoría de las leguminosas.

Una vez sintetizados los FN, estos son secretados y detectados por las leguminosas dando comienzo a un circuito positivo entre los FN y sus receptores en el pelo radical, activando las cascadas de señalización necesarias para dar inicio a la formación del hilo de infección, la infección de los rhizobia y la organogénesis del nódulo.

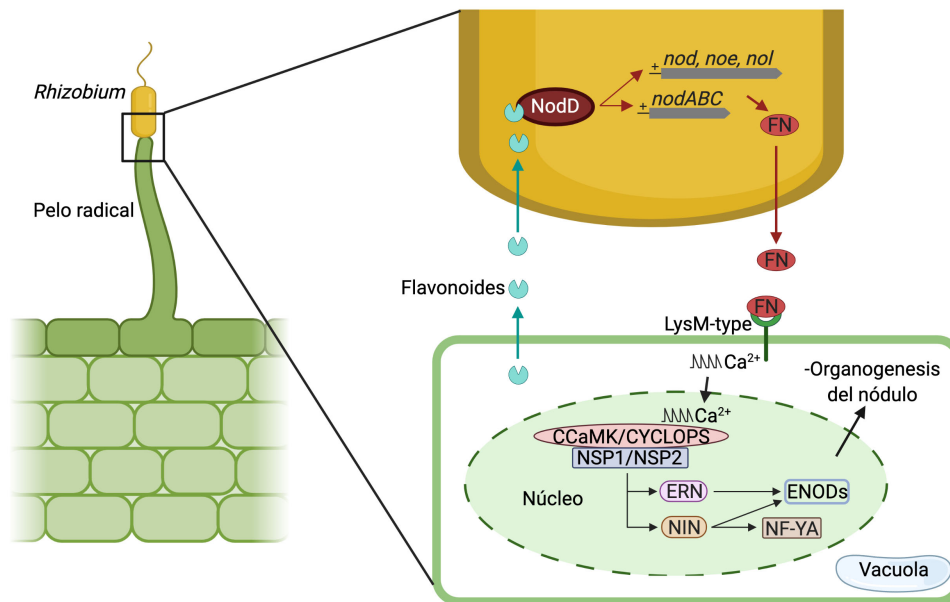


Figura 1.2 Mecanismos moleculares de la señalización leguminosa-*Rhizobium*. Los flavonoides secretados por la planta funcionan como quimioatrayentes de los rhizobia hacia la raíz y activan a la proteína bacteriana NodD, encargada de regular la transcripción de los genes de nodulación (*nod*, *noe* y *nol*). Los genes *nod* están involucrados en la síntesis y secreción de los factores de nodulación (FN). Estos últimos se unen a los receptores tipo LysM de la planta activando una cascada de señalización que da inicio a la organogénesis del nódulo. Modificado de Oldroyd, 2013; Poole et al., 2018.

La presencia de FN induce un aumento en el influjo de calcio en el ápice de los pelos radicales, e induce oscilaciones de este ion en la región perinuclear, conocido como “calcium spiking” activando una cascada de señalización (Cárdenas et al., 1999; Oldroyd et al., 2005; Jones et al., 2007; Oldroyd and Downie, 2008; Wang, 2012). En el ápice de los pelos radicales, los FN son reconocidos específicamente por receptores tipo quinasa de serina/treonina con dominios extracelulares tipo LysM (Figura 1.2). Esta interacción activa una serie de respuestas celulares acompañadas del aumento en la concentración de calcio intracelular. Este aumento en la concentración de Ca^{2+} y las oscilaciones de este ion, antes descritas, es detectado y decodificado en el núcleo por una quinasa dependiente de calcio/calmodulina (CCaMK), que fosforila al factor transcripcional CYCLOPS. Los factores transcripcionales que participan en la regulación de genes importantes para la nodulación son el complejo CCaMK-CYCLOPS, NSP1-NSP2 (“nodulation signalling pathway”), ERN (“ethylene response factor required for nodulation”), NIN (“nodule inception”) y NF-YA

("nuclear factor-Y"), entre otros (revisado en Oldroyd et al., 2005; Oldroyd and Downie, 2008; Oldroyd et al., 2011; Oldroyd, 2013; Suzaki et al., 2015; Roy et al., 2020). En conjunto, el complejo CCaMK-CYCLOPS y el complejo NSP1-NSP2 inducen la expresión de los genes *NIN*, *ERN* y *ENODs* (Figura 1.2) (Oldroyd et al., 2011; Oldroyd, 2013; Suzaki et al., 2015; Roy et al., 2020). A su vez, *NIN* regula la expresión de *NF-YA* (Suzaki et al., 2015), y participa en la regulación de la formación del hilo de infección y el desarrollo del nódulo (Schauser et al., 1999; Oldroyd and Downie, 2008; Roy et al., 2020). El factor *NF-YA* de *Phaseolus vulgaris* es importante tanto para la infección de los rhizobia como el desarrollo del nódulo, además es importante para selección de las cepas de *Rhizobium* más eficientes en la fijación de nitrógeno (Zanetti et al., 2010; Rípodas et al., 2019). Los genes *ENODs* son nodulinas tempranas que juegan un papel importante en la infección por rhizobia y en la nodulación. Entre ellos, *ENOD40* participa en la división celular que culmina en la formación del primordio nodular (Charon et al., 1999; Kumagai et al., 2006; Wan et al., 2007; Djordjevic et al., 2015).

La comunicación molecular y la adhesión de los rhizobia a la raíz, promueve una diferenciación en los pelos radiculares dando como resultado la formación del hilo de infección en el que las bacterias son atrapadas y comienzan a migrar hasta las células corticales de la raíz (Figura 1.3) (Suzaki et al., 2015). La activación de la cascada de señalización en las células del pelo radicular por los FN, promueve la interrupción de manera transitoria del crecimiento polar de los pelos radiculares, acompañado por una hinchazón (agrandamiento celular) en el ápice del pelo. Posteriormente, el crecimiento del pelo se reanuda, permitiendo que el pelo se doble sobre sí mismo, ocasionando su enroscamiento (conocido como "curling") que es crucial para atrapar a los rhizobia dando lugar a la formación de la llamada "cámara de infección", en donde las bacterias quedan atrapadas. Esto activa la formación del hilo de infección, el cual es una invaginación de la membrana plasmática del pelo radical y es a través de esta estructura tipo túnel por donde las bacterias migran hacia el cortex de la raíz. Previamente, el núcleo migra cerca del foco de infección, el citoesqueleto se alinea a lo largo del pelo formando una estructura de hilo de pre-infección guiando al crecimiento interno del hilo. El agrandamiento celular cesa y el hilo de infección va creciendo hasta unirse con la pared celular de las células corticales de la raíz (Oldroyd and Downie, 2008; Oldroyd et al., 2011). Las células corticales internas de la raíz son activadas mitóticamente, permitiendo la formación del primordio nodular (Oldroyd et al., 2011; Wang, 2012; Kassaw, 2013). Una vez que los rhizobia llegan al primordio nodular, son internalizadas por endocitosis, donde son rodeadas por una membrana de origen vegetal, llamada membrana peribacteroidal, formando el simbiosoma (Figura 1.3) (Jones et al., 2007; Kassaw, 2013). Una vez dentro, la bacteria se diferencia a bacteroide, que es la característica específica del estado simbiótico en la que se sintetiza la nitrogenasa y es capaz de fijar N_2 (Spaink, 2000; Jones et al., 2007; Oldroyd and Downie, 2008).

Los nódulos maduros proporcionan las condiciones apropiadas para la fijación de N_2 suministrando una fuente de carbono a las bacterias y el ambiente de bajo oxígeno requerido

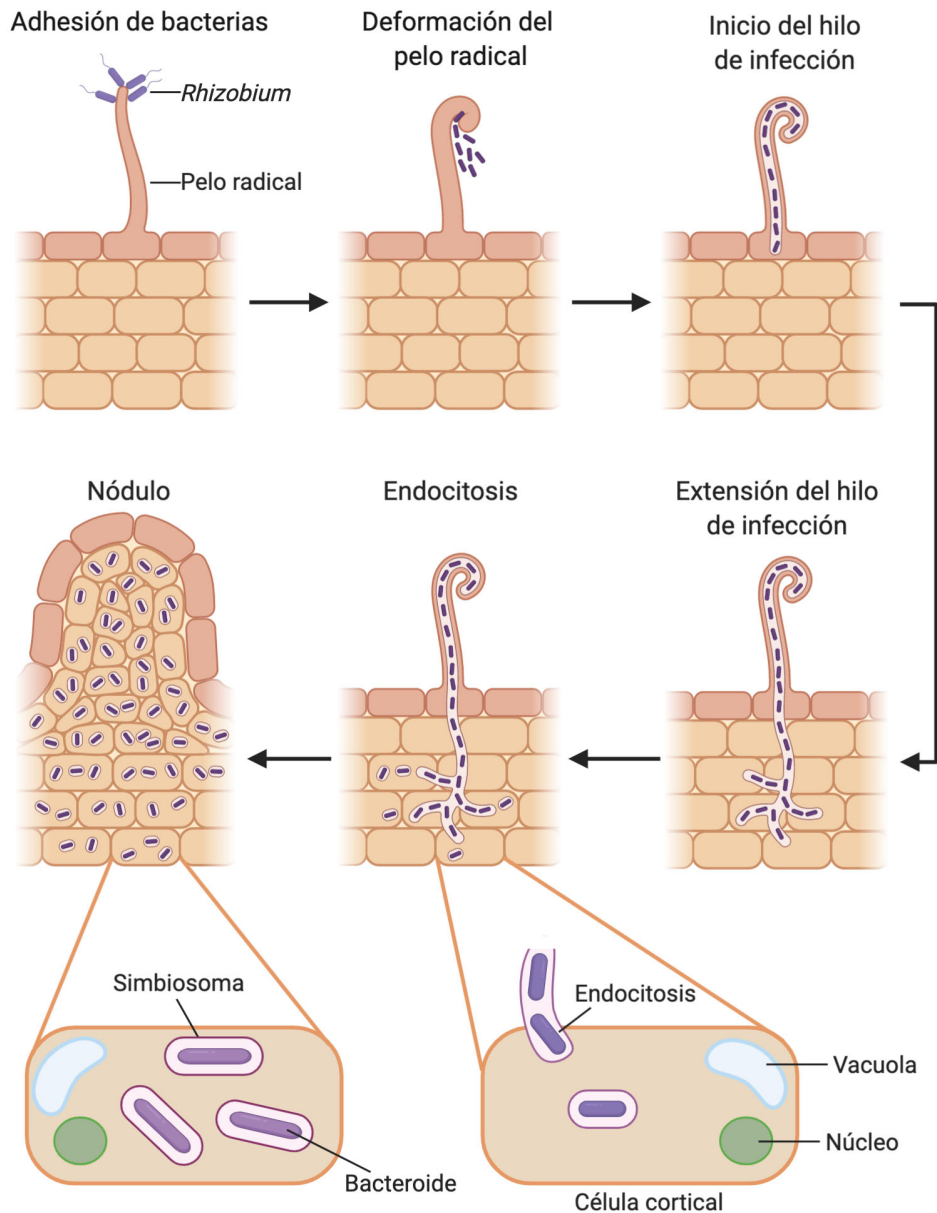


Figura 1.3 Formación del nódulo en las raíces de las leguminosas. La adhesión de los rhizobia a la raíz promueve la deformación y enrollamiento de los pelos radicales a su alrededor. Los rhizobia quedan atrapados y se inicia la formación del hilo de infección que se extiende hasta llegar a las células corticales donde previamente ha ocurrido la división celular y la formación del primordio nodular. La bacteria entra a las células del primordio por endocitosis y son rodeadas por una membrana vegetal. La formación del nódulo continúa, y las bacterias se diferencian a bacteroides, el estilo de vida simbiote de los rhizobia, y se lleva a cabo la FSN. Modificado de Oldroyd, 2013.

para la actividad de la nitrogenasa. Existen dos tipos nódulos, indeterminado y determinado y poseen tres zonas estructural y fisiológicamente diferenciadas, llamadas corteza externa, corteza interna y región central. La corteza externa y la corteza interna están separadas por una columna de células endodérmicas que actúan como barrera de difusión del oxígeno. El tipo de nódulo que se forme dependerá de la planta que la bacteria infecte. En leguminosas

del clado Galeoid, la división celular se da en la corteza interna formando nódulos indeterminados los cuales tienen una forma alargada y heterogénea que consiste en un gradiente de zonas de desarrollo con un meristemo apical persistente, una zona de infección que contiene hilos de infección, una de transición o interzona donde se lleva a cabo la diferenciación a bacteroide, una zona de fijación y una de senescencia (Gage, 2004; Suzaki et al., 2015). Mientras que, en leguminosas del clado Phaseoloid, la división celular comienza en la corteza externa formando nódulos determinados que tienen una forma esférica y homogénea ya que el meristemo periférico deja de funcionar después de que el nódulo se forma (Gage, 2004; Suzaki et al., 2015).

Además de existir dos tipos de nódulos, existen dos tipos de bacteroides. Los nódulos indeterminados desarrollan bacteroides diferenciados morfotipo E no viables. En éstos, una vez dentro del simbiosoma, la diferenciación a bacteroides conlleva un aumento de tamaño de la bacteria en concordancia con un incremento de los ciclos de endoreplicación del material genético (de hasta 24 copias), además de que la división celular cesa (Mergaert et al., 2006; Haag et al., 2013; Xue and Biondi, 2019). Los péptidos antimicrobianos ricos en cisteínas (NCR, “nodule-specific cysteine-rich peptides”) se sintetizan en estos nódulos y son únicos de las leguminosas del clado Galeoid. Por su parte, BacA una proteína transportadora de péptidos NCR en los rhizobia, es esencial únicamente en los nódulos indeterminados. BacA no está involucrada directamente en la diferenciación del bacteroide, pero sí en la regulación de la concentración de péptidos NCR en el citoplasma actuando como una barrera antimicrobiana (Karunakaran et al., 2010; Haag et al., 2013; Guefrachi et al., 2015; Xue and Biondi, 2019). Por otro lado, los bacteroides de nódulos determinados no sufren esa diferenciación manteniendo su forma y tamaño celular, así como una sola copia de su ADN (Mergaert et al., 2006). En nódulos determinados, BacA no es esencial para la infección y fijación de nitrógeno, se desconoce aún la función que tiene este transportador en este tipo de nódulos (Karunakaran et al., 2010; Haag et al., 2013; Guefrachi et al., 2015; Xue and Biondi, 2019).

1.4 El oxígeno como señal para la expresión de genes involucrados en la fijación simbiótica de nitrógeno

La FBN demanda un alto gasto de energía que se obtiene de la respiración aeróbica, en la que el O_2 es el aceptor final de electrones para la producción de ATP. Sin embargo, los componentes de la nitrogenasa son altamente sensibles al O_2 . Por lo que, los diazótrofos han logrado resolver este conflicto ante la necesidad de mantener la concentración de O_2 a un nivel que no perjudique a la nitrogenasa pero que permita expresar la tasa de respiración para proveer el ATP que se requiere para la actividad enzimática. En simbiosis, los nódulos proveen protección contra el O_2 a través tres procesos, una barrera de difusión cortical que genera un gradiente longitudinal de oxígeno; una alta concentración de la nodulina vegetal, leghemoglobina (Lb), en la zona central del nódulo que une O_2 y lo libera a la mitocondria y al bacteroide; y la respiración bacteroidal que se lleva a cabo gracias a la inducción de la

oxidasa terminal de alta afinidad *cbb₃* (Figura 1.4) (Dixon and Kahn, 2004; Udvardi and Poole, 2013; Rutten and Poole, 2019). En nódulos determinados, las concentraciones bajas de oxígeno son uniformes; mientras que, en nódulos indeterminados hay un gradiente longitudinal de oxígeno a lo largo del nódulo (Dixon and Kahn, 2004; Rutten and Poole, 2019). La zona apical persistente es la zona que contiene más oxígeno, y la zona de fijación de nitrógeno es la zona de menor concentración de oxígeno ideal para la actividad de la nitrogenasa.

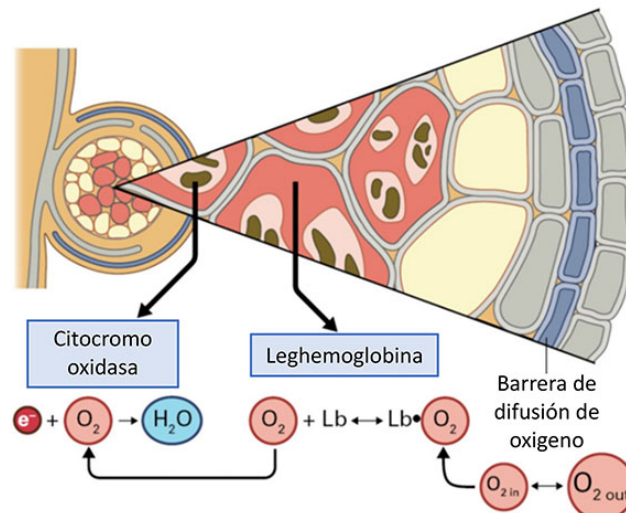


Figura 1.4 Mecanismos de protección ante el O₂ en los nódulos. Dentro de los nódulos, los bacteroides obtienen el ambiente de bajo oxígeno suficiente para la producción de ATP, donde participan la barrera de difusión del oxígeno, la nodulina vegetal leghemoglobina y la oxidasa terminal rhizobial tipo *cbb₃* (fuente de la imagen: <http://web.uvic.ca/~cpc/9.NitrogenFixationNotes.pdf>).

1.5 Regulación de la fijación simbiótica de nitrógeno: genes *nif* y *fix*

El ambiente de bajo oxígeno que distingue al nódulo de las estructuras vegetales, es la señal principal que inicia la activación de los genes de fijación de nitrógeno (genes *nif*) y los genes implicados en el mantenimiento de los ajustes metabólicos necesarios para preservar la producción de ATP (genes *fix*), y lo hace a través de una serie de redes regulatorias involucrando sistemas de dos componentes, reguladores tipo FNR/CRP y del regulador maestro NifA, una proteína EBP (Enhancer Binding Protein).

FixL y FixJ forman parte de un sistema de dos componentes (SDC, revisados más adelante) que se encuentran en la mayoría de los rhizobia. FixL es una histidina quinasa anclada a la membrana y es el sensor de la concentración de oxígeno en el medio. En ausencia de O₂ se autofosforila y activa a FixJ, un regulador de respuesta que pertenece a la familia de reguladores NarL/FixJ. FixJ regula la expresión del gen *fixK* e indirectamente a *fixNOQP* y

fixGHIS controlados por FixK, un regulador tipo CRP/FNR (Figura 1.5A) (Dixon and Kahn, 2004; Zamorano-Sánchez and Girard, 2015; Rutten and Poole, 2019). Existen variantes del sistema FixL/FixJ en *R. leguminosarum* bv. *viciae* y *R. etli* CFN42. FixL es una histidina quinasa híbrida (hFixL) que contiene un segundo dominio sensor y un dominio receptor C-terminal que no están presentes en la proteína FixL. hFixL carece de los dominios transmembranales presentes en FixL, por lo que es una proteína citoplásmica. FixJ está ausente y el regulador de respuesta cognado de hFixL, FxkR, pertenece a la familia de los reguladores OmpR/PhoB. FxkR se identificó como el transductor de la señal entre hFixL y *fixK* (Figura 1.5A) (Girard et al., 2000; Zamorano-Sánchez et al., 2012; Zamorano-Sánchez and Girard, 2015; Reyes-González et al., 2016).

El número de proteínas CRP/FNR que participan en la FSN varía entre los rizobia. Por ejemplo, en *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 existen tres copias de *fixK* y una copia de *fnrN*; *R. etli* CFN42 contiene cinco genes, *fixK*, *fnrNch*, *fnrNd*, *stoRd* y *stoRf* que codifican proteínas tipo FNR; *B. japonicum* USDA110 contiene cuatro genes que codifican proteínas FixK y una FnrN; mientras que, en *S. meliloti* 1021 codifica cuatro proteínas FixK.

En *R. etli* CFN42, las proteínas necesarias para la FSN están distribuidas en dos replicones; los genes *fnrNd*, *fixNOQPd* y *fixGHISd-stoRd* se encuentran en el plásmido simbiótico (pRet42d); y los genes *hfixL*, *fxkR*, *fixKf* y las copias reiteradas de *fixNOQPf* y *fixGHISf-stoRf* se encuentran en el plásmido pRet42f (González et al., 2006). La expresión de los operones *fixNOQP* (*d*, *f*), que codifican para la citocromo oxidasa terminal tipo *cbb₃*, es regulada por FixKf. Sin embargo, solamente la reiteración *fixNOQP* del pRet42d, es indispensable para la FSN y su expresión es multiregulada por FnrNch y FnrNd de manera independiente al sistema hFixL-FxkR-FixKf (Girard et al., 2000; López et al., 2001). Las dos copias del operón *fixGHISstoR*, involucrado en el transporte de cobre y ensamblaje de la *cbb₃*, son regulados por FixKf (Girard et al., 2000; López et al., 2001). Como parte de los operones *fixGHIS* encontramos a los genes *stoR*, *fixGHISd-stoRd* y *fixGHISf-stoRf*, que codifican para proteínas tipo FNR las cuales regulan negativamente la expresión de *fixKf*, *fixNOQPd* y *fixNOQPf* (Figura 1.5A, Figura 1.11). interesantemente, solo la mutación en *stoRd* tiene un efecto en la actividad de la nitrogenasa en simbiosis (Granados-Baeza et al., 2007).

Los sistemas FixL-FixJ-FixK/hFixL-FxkR-FixK y FnrN son esenciales para la activación de *fixNOQP*. Rutten y colaboradores (2021), llevaron a cabo un estudio de co-localización en bacteroides de *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 en nódulos indeterminados de *P. sativum*. Encontraron que hFixL-FxkR-FixK y FnrN se activan diferencialmente en las distintas zonas de desarrollo del nódulo. hFixL-FxkR son el primer sistema sensor de oxígeno en activarse en simbiosis, posteriormente se activa FnrN, y finalmente NifA. hFixL-FxkR-FixK se activa en condiciones microaeróbicas (10-1% O₂) y en las zonas con más oxígeno en el nódulo (zona apical), mientras que FnrN es inactiva en condiciones microaeróbicas y activo en las zonas con menor oxígeno en el nódulo (0.01% O₂, zona de fijación de nitrógeno). Por su

parte, NifA se activa solo en zonas con menor concentración de oxígeno (Rutten et al., 2021).

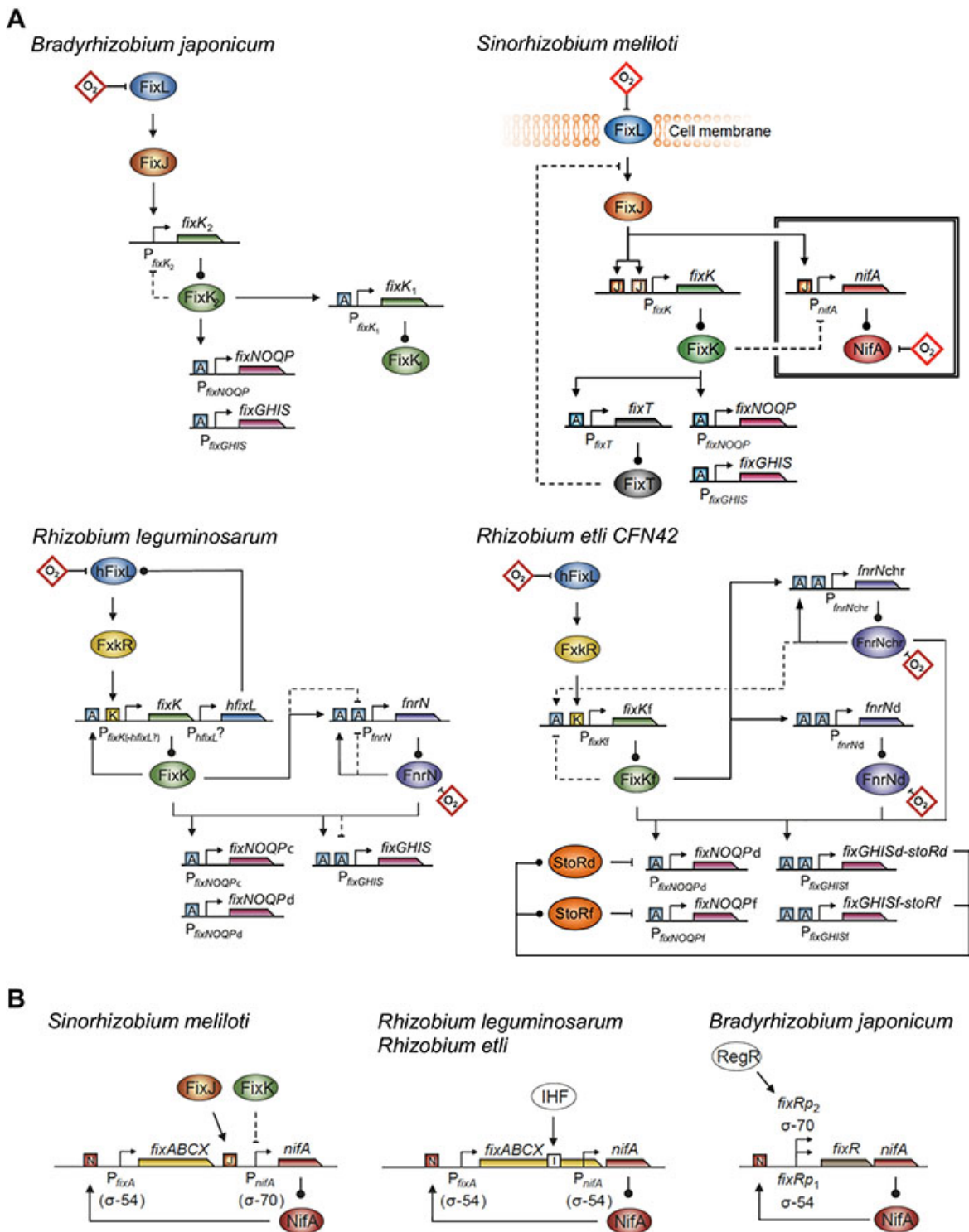


Figura 1.5 Redes de regulación de los genes *fix* y *nif* en algunos rhizobia. **(A)** El oxígeno (indicado en rombos rojos) es detectado por las HKs FixL/hFixL y los reguladores FnrN y NifA. **(B)** NifA y los reguladores FixJ y RegR regulan la expresión de *nifA*. La regulación positiva es indicada con flechas y la negativa con líneas con extremo romo. Líneas punteadas representan conexiones teóricas o cuyo mecanismo de acción no está claro. Las cajas de anaerobiosis se muestran como cajas azules marcadas con 'A'. Las cajas de FixJ, FxkR y NifA se muestran como cajas marcadas con 'J', 'K' y 'N', respectivamente. Esquema modificado de Rutten and Poole (2019).

En los diferentes rhizobia, las cascadas de regulación de los genes *fix* y *nif* difieren. Sin embargo, cada circuito resulta en la regulación de la expresión de *nifA*. En *S. meliloti*, *R. leguminosarum* y *R. etli*, *nifA* se cotranscribe con el operón *fixABCX*, un complejo enzimático encargado de suministrar electrones de bajo potencial a la nitrogenasa. Este operón es autoregulado por NifA. Sin embargo, en *S. meliloti* hay un segundo promotor localizado arriba del gen *nifA*, regulado directamente por FixJ (Figura 1.5B) (Dixon and Kahn, 2004; Rutten and Poole, 2019). Mientras que en *B. japonicum*, la expresión de *fixR-nifA* es controlada por NifA y por el SDC RegS/RegR, que detecta las condiciones redox de la membrana celular (Figura 1.5B) (Bauer et al., 1998; Dixon and Kahn, 2004; Lindemann et al., 2007).

1.6 Transporte y metabolismo de carbono y de nitrógeno en los nódulos fijadores de nitrógeno.

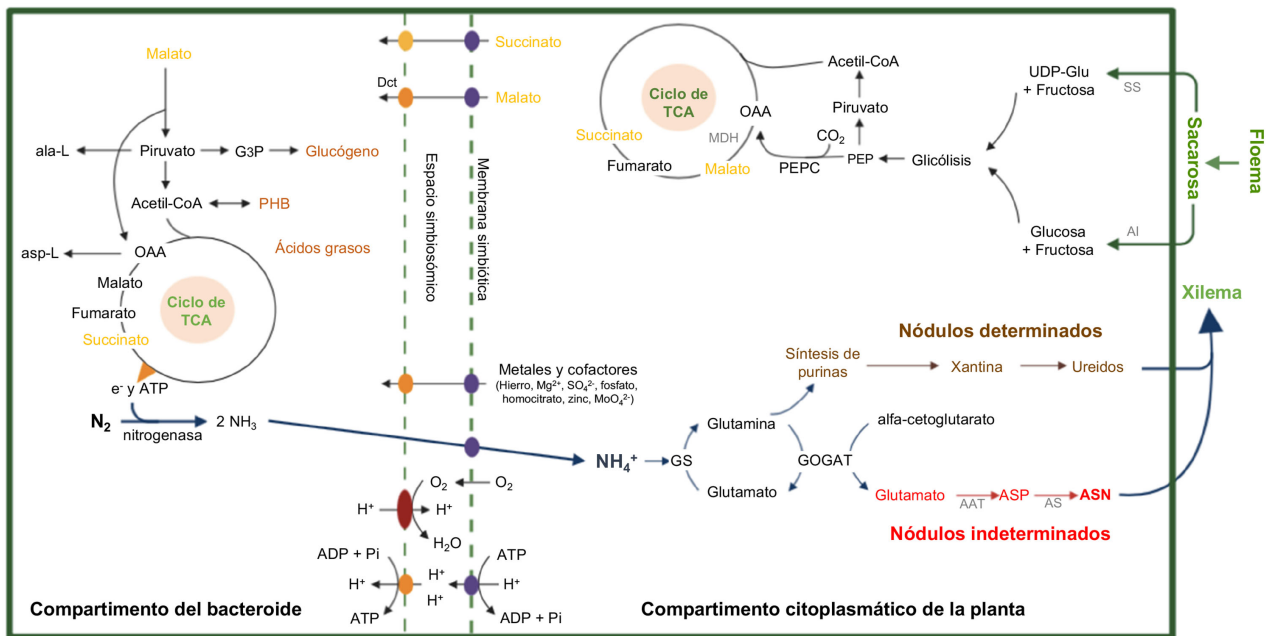


Figura 1.6 Metabolismo del carbono y el nitrógeno en nódulos determinados e indeterminados. La sacarosa, la principal fuente de carbono suministrada por la planta para la FSN, es procesada por la vía de la glicólisis y el ciclo TCA a malato y a succinato. Estos son transportados al bacteroide donde son metabolizados a través del ciclo de los TCA para obtener los electrones y el ATP necesarios para la actividad de la nitrogenasa. Los iones inorgánicos y cofactores requeridos para la FSN son transportados al bacteroide a través de la membrana peribacteroidal. El amonio producido por la fijación de nitrógeno es transportado al simbiosoma y asimilado por la glutamino sintetasa (GS) y la glutamato sintetasa (GOGAT) para ser convertidos en glutamina y glutamato y finalmente a ureidos o amidas. TCA, ciclo de los ácidos tricarbónicos; UDP-Glc, UDP-glucosa; AI, invertasa alcalina; PEP, fosfoenolpiruvato; PEPC, PEP-carboxilasa; MDH, malato deshidrogenasa; PHB, polihidroxibutirato; OAA, oxaloacetato; AAT, aspartato aminotransferasa; ASP, aspartato; AS, asparagina sintetasa; ASN, asparagina. Modificado de Liu et al. (2018). Esquema modificado de Liu et al. (2018).

En el nódulo, la planta provee fuentes de carbono, fósforo y otros nutrientes (azufre, potasio, sodio, calcio, vanadio, hierro, molibdeno, níquel, cobalto) a la bacteria a cambio de amonio (Figura 1.6). La fuente de carbono inicial que da la planta a los nódulos es la sacarosa. Dentro del simbiosoma, la sacarosa es procesada a glucosa y fructosa las cuales son metabolizadas por la vía de la glucólisis. El flujo del carbono se desvía por la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y la malato deshidrogenasa (MDH) para formar malato. La fuente principal de carbono de los bacteroides son los ácidos dicarboxílicos, como malato y succinato. Estos atraviesan la membrana bacteroidal para integrarse al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) que generan los electrones y el ATP requeridos por la nitrogenasa (Udvardi and Poole, 2013; Liu et al., 2018). Una vez reducido el N₂ a amonio, este es transportado a las células vegetales infectadas donde es convertido a glutamina y glutamato por las enzimas glutamino sintetasa (GS) y glutamato sintasa (NADH-GOGAT). En el caso de nódulos determinados se producen ureidos como producto final provenientes de la vía de síntesis de purinas a partir de glutamina. Las leguminosas que forman nódulos indeterminados asimilan amidas, donde el glutamato se convierte en aspartato (ASP) y asparagina (ASN) por la aminotransferasa de ASP y la sintetasa de ASN. Y finalmente, los ureidos y amidas son transportados a la parte aérea de la planta (Udvardi and Poole, 2013; Liu et al., 2018).

1.7 Sistemas de bombas de eflujo de resistencia a multidroga en bacterias y su participación en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa

Uno de los mecanismos de resistencia a compuestos tóxicos en las bacterias son las bombas de eflujo de resistencia a multidroga (MDR, “multidrug resistance efflux pumps”). Las bombas MDR tienen la capacidad de expulsar una amplia gama de compuestos como antibióticos, toxinas, antimicrobianos, flavonoides, moléculas señal (ej. homoserina lactona), entre otros (Martínez et al., 2009; Blanco et al., 2016). Las bombas de eflujo MDR bacterianas se agrupan en cinco familias diferentes: ABC (“ATP binding cassette”), MFS (“major facilitator superfamily”), RND (“resistance/nodulation/division”), MATE (“Multidrug and toxic compounds extrusion”) y SMR (“Small multidrug resistance”) (Figura 1.7) (Saier and Paulsen, 2001; Li and Nikaido, 2009; Spengler et al., 2017; Du et al., 2018). Las bombas ABC, MFS, MATE y SMR se distribuyen en todas las bacterias; mientras que, las bombas RND son únicas en las bacterias gram-negativas. Todas se componen de una proteína transportadora ubicada en la membrana interna, o en su caso la única membrana plasmática de las bacterias gram-positivas. Generalmente, las bacterias gram-negativas contienen, además de la proteína de transporte, una proteína de fusión localizada en el espacio periplásmico y una proteína de membrana externa (OMP, “outer membrana protein”) (Pidcock, 2006; Li and Nikaido, 2009). Las bombas RND y algunas bombas ABC y MFS forman complejos tripartita (Pidcock, 2006; Spengler et al., 2017; Du et al., 2018). Las OMPs están representadas por proteínas tipo Opr y TolC, y tienen la capacidad de participar en paralelo con diferentes bombas de eflujo MDR teniendo un amplio espectro de sustratos (Koronakis et al., 2004; Pidcock, 2006; Li and Nikaido, 2009). La especificidad por los

sustratos está dada por el complejo de la membrana interna, y no por las OMPs. Por otro lado, la regulación génica de las bombas MDR es compleja e interconectada; debido a que existen numerosos sistemas de eflujo MDR con una misma función por lo que la inhibición o pérdida de alguna bomba de eflujo resulta en la expresión de otras. Por lo que su expresión está sujeta a distintos niveles de regulación. Los genes que codifican proteínas OMPs, en su mayoría, no forman operón con los genes que codifican a las proteínas de membrana y de fusión. Gran parte de los genes que codifican bombas están localizados junto a un regulador local, que típicamente pertenecen a las familias TetR, AraC, MarR o MerR (Li and Nikaido, 2009; Spengler et al., 2017; Du et al., 2018). Los SDC también afectan la expresión de estos exportadores. Por ejemplo, en *E. coli* y *S. typhimurium*, BaeSR induce la expresión de las bombas AcrD y MdtABC (Nishino et al., 2005; Nishino et al., 2007). Finalmente, también se ha descrito que reguladores globales como CRP, participan en su regulación.

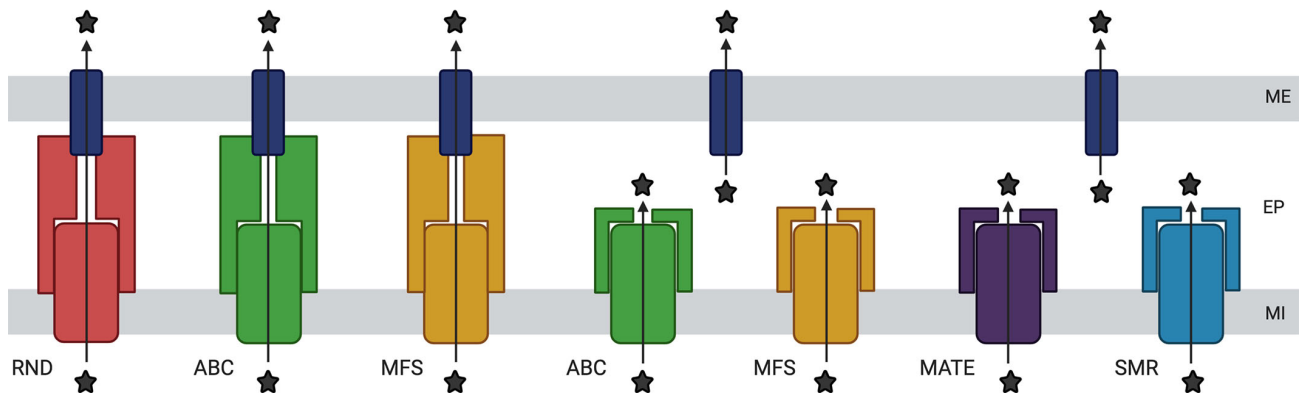


Figura 1.7 Bombas de eflujo de resistencia a multidrogas (MDR) en bacterias gram-negativas. Representación estructural y localización de las cinco familias de bombas de eflujo MDR: RND (“resistance/nodulation/division”, rojo), ABC (“ATP binding cassette”, verde), MFS (“major facilitator superfamily”, amarillo), MATE (“Multidrug and toxic compounds extrusion”, morado) y SMR (“Small multidrug resistance”, azul claro). En general, la estructura transportadora, compuesta por la proteína de transporte y de fusión, se encuentra anclada en la membrana interna (MI). Las proteínas de membrana externa (ME) (OMPs, outer membrane proteins, en color azul marino) pueden formar complejos tripartita con bombas RND, y algunas bombas ABC y MFS, o bien, funcionar en el transporte de sustratos desde el espacio periplásmico (EP) al espacio extracelular. Esquema modificado de Piddock, 2006 y Blanco et al., 2016.

Para una adecuada y exitosa interacción entre rhizobia y leguminosas, las bombas MDR tienen un papel relevante protegiendo a las bacterias de la respuesta de defensa de la planta y los niveles tóxicos de los exudados fenólicos de las raíces (Bhattacharya et al., 2010; Alvarez-Ortega et al., 2013). En los rhizobia, las bombas MFS y RND contribuyen a una FSN exitosa con leguminosas procesando una variedad de señales simbióticas derivadas de ambos socios (González-Pasayo and Martínez-Romero, 2000; Lindemann et al., 2010; Eda et al., 2011; Alvarez-Ortega et al., 2013; Santos et al., 2014; Tett et al., 2014). Por ejemplo, en *R. etli* CFN42, una mutante en los genes *rmrAB* es más sensible a los

flavonoides y su capacidad para nodular frijol disminuye (González-Pasayo and Martínez-Romero, 2000). En *R. leguminosarum* bv. *viciae* una mutante *rmrA*⁻ no muestra diferencias de crecimiento en presencia de ácido salicílico con respecto a la cepa silvestre ni se altera su capacidad de nodular y fijar nitrógeno en simbiosis con plantas de chícharo (Tett et al., 2014). La eliminación de los genes *bdeAB* en *Bradyrhizobium japonicum* afecta negativamente la actividad de FSN con la soja, y es más susceptible a aminoglucósidos (Lindemann et al., 2010). En *Agrobacterium tumefaciens*, una mutante en la bomba *mexEF-ameC* es sensible a cloranfenicol y acetosiringona, y muestra una menor capacidad de virulencia (Binns and Zhao, 2020). La bomba *lfeAB* en *A. tumefaciens* es importante para la colonización de las raíces de alfalfa y responde a flavonoides (Palumbo et al., 1998). De manera similar, la bomba *SmeAB* es importante para mediar la resistencia a los antimicrobianos y la competitividad para la nodulación (Eda et al., 2011). En *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841, una mutante en el gen *salA* es más sensible al ácido salicílico, pero esta mutación no afecta la nodulación ni la fijación de nitrógeno (Tett et al., 2014). El sistema *EmrAB* en *A. tumefaciens* y *S. meliloti* se induce por quercetina, debido a que este flavonoide se une al represor *EmrR* del operón *emrAB* interrumpiendo la interacción *EmrR*-ADN (Roszbach et al., 2014; Santos et al., 2014; Khemthong et al., 2019). Por su parte, la proteína *TolC* de *S. meliloti* es necesaria para la secreción de proteínas y exopolisacáridos, la resistencia a antimicrobianos y para una FSN exitosa (Cosme et al., 2008).

1.8 Sistemas de regulación de dos componentes

El comportamiento de los rhizobia en vida libre y en simbiosis está controlado por una gran cantidad de sistemas de señalización que responden a una variedad de señales externas. Estos sistemas pueden ser proteínas de un componente, sistemas de dos componentes, así como sistemas quimiosensores y factores sigma de función extracitoplasmática. Uno de los sistemas de señalización más frecuentes y prevalentes en bacterias, incluidos los rhizobia, son los sistemas de dos componentes.

Los sistemas dos componentes (SDC) regulan diversos procesos celulares como son la quimiotaxis, la utilización de nutrientes, la virulencia, el quórum sensing, el ciclo celular, etc. (Stock et al., 2000; Krell et al., 2010). Los SDC detectan la señal (extra- e intra- celular) y posteriormente modulan una respuesta, que en la mayoría de los casos es la regulación de la expresión génica. Su mecanismo de acción consiste en la transferencia química del grupo fosforilo a través de una histidina quinasa sensora (HK) y un regulador de respuesta (RR, Figura 1.8). La transferencia se da primero por la autofosforilación en un residuo de histidina (His) de la HK y después la transferencia del grupo fosforilo a un residuo de aspartato (Asp), conservado en el RR. Una vez fosforilado el RR, este ejerce una respuesta celular. Además, muchas de las HKs tienen actividad de fosfatasa sobre su RR cuando la señal deja de estar presente (Stock et al., 2000). La transferencia del grupo fosforilo se da de un residuo de His a uno de Asp. Un SDC canónico consiste únicamente en la transferencia de la His de la HK al Asp del RR. Sin embargo, existe una variante en la que la HK utiliza un esquema de

fosforelevo de múltiples pasos. En estos casos, la HK es denominada híbrida (HHK, “hybrid histidine kinase”) ya que contiene un dominio REC con un residuo de Asp, y un dominio que contiene el residuo de His el cual puede estar fusionado a la HK o encontrarse como una proteína de fosfotransferencia (HPt, “histidine phosphotransfer”) en la célula (Stock et al., 2000).

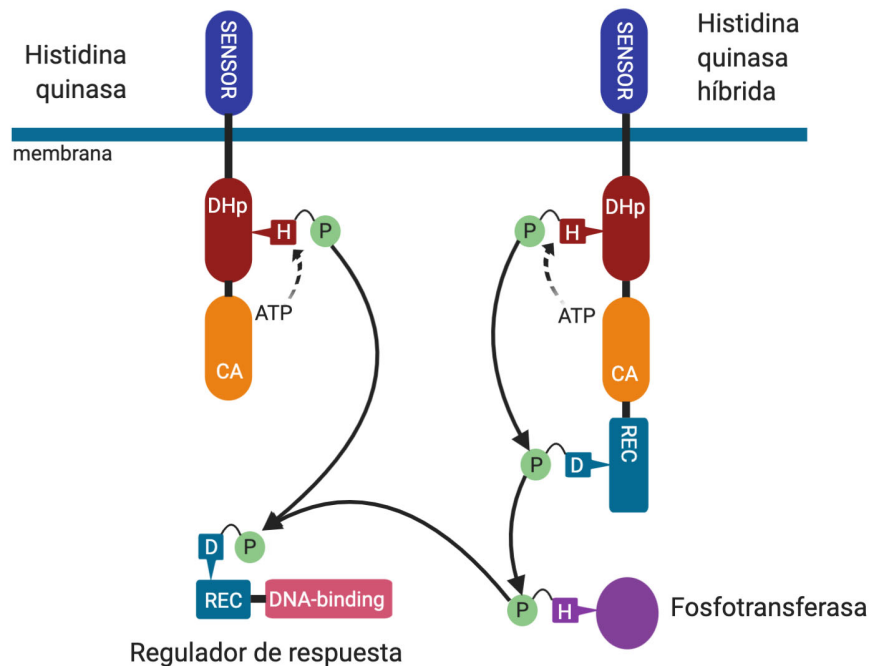


Figura 1.8 Esquema general de los sistemas de dos componentes. El sistema canónico (izquierda) consiste en una histidina quinasa que detecta el ligando a través del dominio sensor, propaga la señal al dominio de dimerización y la fosfotransferencia de la His (DHp) y al dominio catalítico (CA), autofosforilándose en el residuo de histidina (H). Posteriormente, el grupo fosforilo (P) se transfiere al regulador de respuesta en el residuo de aspartato (D) del dominio receptor (REC) que activa al dominio efector, encargado de regular una respuesta celular. El sistema de fosforelevo (derecha) consiste de una histidina quinasa que contiene un dominio REC adicional en su extremo C-terminal. Por lo que la transferencia del grupo fosforilo es múltiple y requiere de una proteína adicional con función de fosfotransferasa que contiene un residuo de histidina para llevar a cabo la fosfo-transferencia al D del regulador de la respuesta.

Las HK comúnmente contiene un dominio sensor transmembranal donde se detecta el estímulo, un dominio de dimerización y fosfotransferencia de la His (DHp, “dimerization and histidine phosphotransferase”) y el dominio catalítico de unión a ATP/Mg²⁺ (CA, Figura 1.8) (Laub and Goulian, 2007; Gao and Stock, 2009). Existen diferentes tipos de dominios sensores, los más conocidos son los dominios PAS, que sensan una gran variedad de estímulos como inductores específicos que se unen a una cavidad, cofactores que se encuentran unidos como el hemo en la proteína FixL, o a través del estado oligomérico de la HK por la formación de enlaces disulfuro (Krell et al., 2010). Otros mecanismos de

sensado del estímulo es a través de los dominios transmembranales, como la temperatura en la HK DesK, o a través de proteínas accesorias que detectan la señal, se unen y activan a la HK (Krell et al., 2010). Una vez detectado el inductor por el dominio sensor, se propaga la señal al dominio DHp y CA. Los dominios DHp forman dos largas hélices que al dimerizarse, el dominio CA es capaz de unir ATP y transferir el grupo fosforilo al residuo de His. Finalmente, la transferencia del grupo fosforilo se da por el RR al unirse al dominio DHp y cataliza la transferencia (Gao and Stock, 2009).

Los RR contienen dos dominios, un dominio REC que contiene un residuo de Asp conservado y tiene un plegamiento de 5 hojas- β paralelas rodeadas por 5 α -hélices, y un dominio efector que es el encargado de ejercer una respuesta celular (Figura 1.8). Los RR comparten el dominio REC, sin embargo, difieren en su dominio efector que las divide en diversas familias y funciones. Las familias se dividen de acuerdo con la arquitectura de sus dominios que dan una función general. De acuerdo con la base de datos “prokaryotic two-component systems” (P2CS), los RR están divididos en 36 familias, más los reguladores no clasificados (Ortet et al., 2015). La mitad de estas familias contienen dominios de unión a ADN (64.5%) funcionando como reguladores de la transcripción, y el resto de ellos regulan a sus blancos por medio de dominios enzimáticos, de unión a ARN o proteína, dominios REC sencillos, entre otros (Galperin, 2006; 2010; Gao et al., 2019). Los reguladores de la familia de unión a ADN son los más abundantes y estudiados, y se caracterizan por tener variantes de motivos tipo HTH (hélice-vuelta-hélice), y se subdividen en cuatro familias: NarL/FixJ, OmpR/PhoB, LytR/AgrA y NtrC/DctD (Galperin, 2006; 2010).

Los miembros de la familia OmpR/PhoB representan el 29% de todos los RR y la mitad de los de dominio de unión a ADN (Galperin, 2010; Gao et al., 2019). Esta familia fue nombrada por sus miembros más caracterizados, OmpR y PhoB, que son los responsables de la osmorregulación y la asimilación de fosfato, respectivamente. Se caracterizan por tener motivos tipo HTH de hélice ancha (winged-HTH) y un mecanismo de activación conservado en el que la fosforilación del Asp afecta la cara $\alpha 4$ - $\beta 4$ - $\alpha 5$ para mediar las interacciones inter- o intra- proteína. La caracterización estructural de algunos miembros de la familia OmpR/PhoB reveló que la cara $\alpha 4$ - $\beta 4$ - $\alpha 5$ contiene un set común de residuos, sugiriendo que sus miembros comparten una interfase similar de dimerización y por consiguiente una interacción heterodimérica entre sus miembros (Toro-Roman et al., 2005). Gao y colaboradores (2008) demostraron la especificidad de la interacción entre los diferentes miembros de la familia OmpR/PhoB en *E. coli*. Otra de las características de esta familia, es que al dimerizarse los dominios receptores, el dominio efector sufre cambios conformacionales provocando una mayor afinidad hacia el ADN uniéndose a dos secuencias repetidas directas en la región promotora de sus genes blanco conocidas como cajas de unión (Nguyen et al., 2015).

1.9 Reguladores OmpR/PhoB en los rhizobia

El análisis comparativo de los genomas de algunas bacterias del grupo *Rhizobium/Agrobacterium*, utilizando la base de datos “Response regulators encoded in bacterial and archaeal genomes” de NCBI (Jenal and Galperin, 2009; Galperin, 2010; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete_Genomes/RRcensus.html), muestra que los genomas de este grupo bacteriano codifican entre 47 y 90 HK, y de 58 a 96 RRs. Siendo los RR con dominio de unión a ADN los más representados (entre 35 y 52), de los cuales de 16 a 23 pertenecen a la familia de reguladores OmpR/PhoB (Tabla 1.1).

A pesar de su alto número, los reguladores OmpR/PhoB en rhizobiales están poco caracterizados, éstos son:

Tabla 1.1 Análisis de comparación de los sistemas de dos componentes y reguladores OmpR/PhoB entre diversas especies de los rhizobia.

Bacteria	HKs	RRs	RRs unión a ADN	tipo OmpR/PhoB
<i>B. japonicum</i> USDA 110	90	96	52	22
<i>S. meliloti</i> 1021	45	59	35	16
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 3841	58	70	39	23
<i>R. etli</i> CFN42	47	68	36	18
<i>A. fabrum</i> str. C58	50	58	36	22

Los datos se tomaron de la base de datos “Response regulators encoded in bacterial and archaeal genomes” de NCBI (Jenal and Galperin, 2009; Galperin, 2010; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete_Genomes/RRcensus.html).

ChvI

El SDC ChvG(ExoS)/ChvI está distribuido principalmente en los rhizobia, y en algunas alfa-proteobacterias (Heavner et al., 2015). Participa en la invasión de la bacteria a las células eucarióticas hospederas. En *S. meliloti*, *A. tumefaciens* y *R. leguminosarum*, en mutantes en los genes *chvI* y/o *chvG*, el crecimiento en condiciones de acidez, medios complejos y con algunas fuentes de carbono se ve afectado. Además, estas mutantes producen células flageladas y disminuyen la producción de exopolisacáridos, y son inefectivas para la formación de nódulos o tumores (Bélangier et al., 2009; Foreman et al., 2010; Wang et al., 2010; Vanderlinde and Yost, 2012; Wu et al., 2012). En condiciones de acidez, ChvG se activa y autofosforila. ChvI fosforilado regula directamente 35 operones (64 genes en total) involucrados en la síntesis de fosfolípidos, succinoglicanos y polisacáridos, genes de motilidad y quimiotaxis, proteínas de membrana externa, transportadores tipo ABC, entre otros (Chen et al., 2009; Belanger and Charles, 2013; Ratib et al., 2018). La caja de unión

en sus genes blanco consiste de 15 pares de bases (pb) con una secuencia conservada repetida, GCC (GCC-n8-GCC) (Ratib et al., 2018).

Ortólogos al SDC ChvG/ChvI se encuentran en *Caulobacter crescentus* y *Brucella abortus*. En *C. crescentus*, ChvG/ChvI es esencial para crecer en condiciones de acidez y medios complejos. ChvI controla la expresión de un ARN pequeño, *chvR*, en respuesta a acidez y a daños en el ADN (Frohlich et al., 2018). Por otro lado, en *B. abortus*, el sistema homólogo BvrS/BvrR se encuentra activo cuando crece en medios ácidos combinado con limitación de nutrientes y principalmente en las fases tempranas de la interacción con células eucarióticas (Altamirano-Silva et al., 2018). BvrR regula genes del metabolismo del carbono y del nitrógeno, genes de membrana externa, así como a *virB* y *vjvR* encargados del ensamblaje del sistema de secreción tipo IV importante para la virulencia (Martinez-Nuñez et al., 2010; Viadas et al., 2010; Altamirano-Silva et al., 2018). El sistema BvrS/BvrR funciona como sensor que detecta la transición del medio extracelular al intracelular en el hospedero.

FeuP

En *S. meliloti* se ha demostrado que FeuQ/FeuP se requieren para la infección simbiótica de raíces de alfalfa, ya que mutantes *feuP* son incapaces de colonizar el hilo de infección (Griffitts et al., 2008). FeuP regula directamente la expresión de *ndvA*, una proteína exportadora de β -glucano cíclico dependiente de ATP, que participa en el proceso de infección (Spaink, 2000; Griffitts et al., 2008; Carlyon et al., 2010). De acuerdo a diversos estudios *in silico*, se identificó una caja de unión de FeuP en la región promotora de los genes *feuP* y *ndvA* con la siguiente secuencia TTCA-7N-TTCA (Schluter et al., 2013).

Rem

Las bacterias requieren moverse hacia sitios ricos en nutrientes a través de la respuesta quimiotáctica y el sistema flagelar. En general, el flagelo en las bacterias tiene la misma estructura, sin embargo, su regulación es distinta entre ellas, por ejemplo, entre los rhizobia y las bacterias entéricas. En los rhizobia, los genes del flagelo se encuentran codificados en una sola región del cromosoma para tener un mayor control de su expresión. Su estructura y el número de genes de flagelina es mayor que en las bacterias entéricas, y la rotación del flagelo es unidireccional (Tambalo, 2015). El sistema regulador maestro del flagelo en bacterias entéricas es FlhDC, mientras que en los rhizobia es VisNR-Rem (Sourjik et al., 2000; Rotter et al., 2006; Tambalo et al., 2010). El flagelo bacteriano se divide en tres partes, (1) el cuerpo basal que se ancla en la membrana, que provee energía para la rotación y es por donde se secretan los demás componentes; (2) el gancho flagelar, que está conectado al cuerpo basal y determina el ángulo del flagelo; y (3) el filamento, que está compuesto por flagelinas. La síntesis del flagelo es un proceso regulado y ordenado de acuerdo con las tres partes antes mencionadas para tener un buen ensamblaje y función (Berg, 2003).

En *S. meliloti* y *R. leguminosarum*, la cascada de motilidad se divide en tres clases (Figura 1.9). Clase IA, incluye a los reguladores maestros de tipo LuxR, VisN y VisR, que regulan la expresión de *rem* (clase IB), un regulador de tipo OmpR/PhoB (Rotter et al., 2006; Tambalo et al., 2010; Scharf et al., 2016). A la fecha, no se ha encontrado la HK cognada de Rem, sin embargo, se ha demostrado que puede regular a sus genes blanco sin fosforilarse (Rotter et al., 2006). Rem regula la expresión de los genes de la clase II que son los componentes del cuerpo basal y del motor flagelar, algunos de ellos son *fliM* (proteína de interruptor del motor flagelar), *mot* (motor flagelar) y *orf38* (*S. meliloti*, componente estructural del cuerpo basal). Una vez completa la estructura del cuerpo basal, la clase II regula la expresión de las flagelinas y la quimiotaxis (clase III, *che*, *fla*, *mcp*). Los genes *motABC* no son necesarios para la expresión de la clase III (Sourjik et al., 2000; Rotter et al., 2006; Tambalo, 2015; Scharf et al., 2016). La expresión de *visNR* es constitutiva durante el crecimiento en medio líquido, y la expresión de *rem* incrementa en la fase exponencial de crecimiento entrando a un estado constante de expresión hasta el inicio de la fase

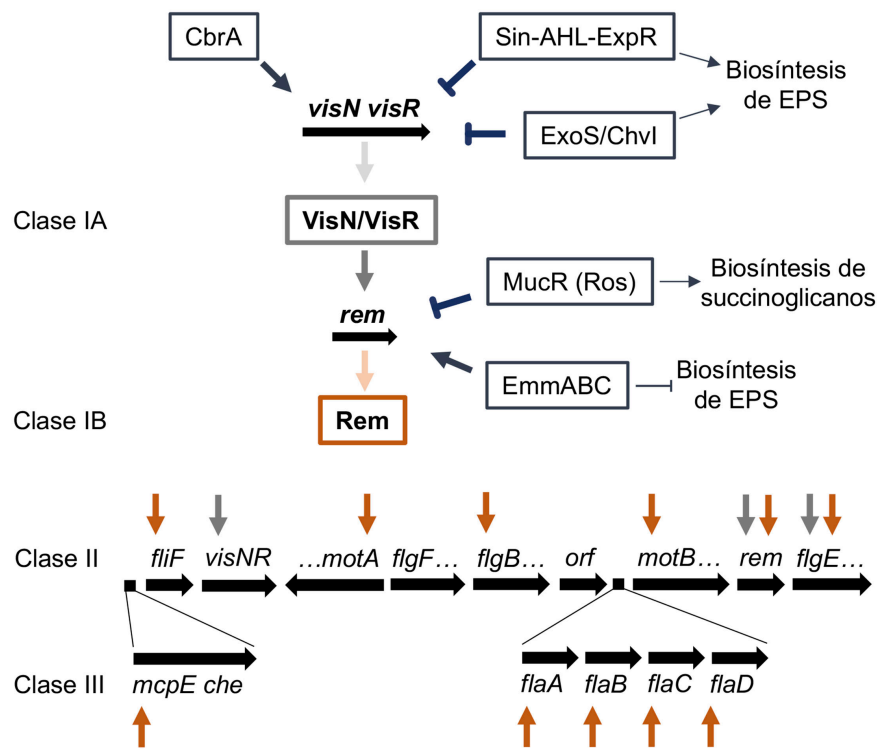


Figura 1.9 Esquema de la regulación de la motilidad en *S. meliloti* y *R. leguminosarum*. Los genes que participan en la cascada de motilidad se clasifican en tres clases y son representados con flechas horizontales. Los reguladores maestros VisNR y Rem se muestran enmarcados en gris y rojo, respectivamente. El control positivo de la transcripción de los reguladores VisN y VisR se muestran con flechas en color gris y en color rojo las flechas que indican los genes regulados positivamente por Rem. El control positivo o negativo sobre la expresión de los genes *visN*, *visR* y *rem* se muestra en flechas y líneas romas, respectivamente. Los operones consisten en los siguientes genes: *mcpE*, *che*; *visN*, *visR*; *motA*, *fliM*, *fliN*, *flhB*; *flgF*, *fliI*; *flgB*, *flgC*, *fliE*, *flgG*, *flgA*, *flgI*, *orf*, *flgH*, *fliL*, *fliP*; *motB*, *motC*, *motD*; *flgE*, *flgK*, *flgL*, *flaF*, *flbT*, *flgD*, *fliQ*, *flhA*, *fliR*. AHL, N-acil homoserina lactona; EPS, exopolisacáridos. Esquema basado en Rotter et al., 2006; Tambalo et al., 2010; Tambalo and Yost, 2015.

estacionaria donde la expresión tanto de *visNR* y *rem* disminuye (Sourjik et al., 2000; Rotter et al., 2006; Hoang et al., 2008). En *S. meliloti*, los SDC EmmB/EmmC y ExoS/ChvI, el regulador MucR, la HK CbrA y el complejo Sin-AHL-ExpR (AHL, N-acil homoserina lactona) regulan la expresión de *visNR* y *rem* (Figura 1.9; Gibson et al., 2007; Bahlawane et al., 2008b; Hoang et al., 2008; Morris and Gonzalez, 2009; Barnett and Long, 2018). Como se mencionó anteriormente, la motilidad es importante en los rhizobia para desplazarse hacia la raíz y adherirse a ella (Zheng et al., 2015; Wheatley and Poole, 2018). Una vez establecida la simbiosis, la expresión de los genes de quimiotaxis y motilidad se reprimen (revisado en Tambalo, 2015).

PhoB

El fósforo (Pi, fósforo inorgánico) es un elemento esencial para diversos procesos celulares y se encuentra en bajas concentraciones en el ambiente. El único sistema capaz de responder ante la limitación de Pi es el SDC PhoR/PhoB que controla genes de enzimas extracelulares, transportadores específicos de Pi, enzimas involucrados en captación y reciclaje del nutriente, entre otros (Wanner, 1996; Santos-Beneit, 2015; Lubin et al., 2016). Los blancos más importantes de PhoB son *pstSCAB* y *pho*, transportadores encargados de la captación de Pi (Lamarche et al., 2008; Gardner et al., 2014; Santos-Beneit, 2015; Lubin et al., 2016). El sistema Pst y la proteína PhoU interaccionan con PhoR para regular su actividad de acuerdo con las concentraciones de Pi en la bacteria (Lamarche et al., 2008; Gardner et al., 2014; Santos-Beneit, 2015; Lubin et al., 2016). En *E. coli*, se ha definido como la caja PHO a dos secuencias repetidas directas separados por cuatro nucleótidos (nt), CTGTCAT-N4-CTGTCAT (Blanco et al., 2002; Yoshida et al., 2012), la cual varía entre especies.

En *S. meliloti*, PhoB regula negativamente a los genes *orfA-pit*, que codifican un sistema transportador de fosfato de baja afinidad, y positivamente al sistema transportador tipo ABC *phoCDE*, *pstSCAB* y *phoU*, así como a los genes *expA*, *expD*, *expE* y al regulador *expG*, responsables de la biosíntesis de galactoglucano (EPS II), y a la catalasa *katA* (Bardin and Finan, 1998; Ruberg et al., 1999; Mendrygal and González, 2000; Krol and Becker, 2004; Yuan et al., 2005; Yuan et al., 2006; Bahlawane et al., 2008a). Mutaciones en *phoB* y *phoC* no afectan negativamente a la simbiosis *S. meliloti*-alfalfa (Bardin and Finan, 1998). En condiciones limitantes de Pi, los fosfolípidos de la membrana son sustituidos por lípidos libres de fosfato como el diacilgliceril-trimetil-homoserina (DGTS). Una mutante en *phoB* no sintetiza DGTS, por lo que es necesario el SDC PhoR/PhoB para sintetizar lípidos libres de fósforo (Geiger et al., 1999). En *A. tumefaciens*, se encontró que la biomasa del biofilm era mayor en condiciones limitantes de Pi, sugiriendo que el sistema PhoR/PhoB está mediando la respuesta (Danhorn et al., 2004). Al contrario, en *Pseudomonas fluorescens*, la formación de biofilm se inhibe en condiciones limitantes de Pi, donde se determinó que *rapA*, una fosfodiesterasa que une c-di-GMP a pGpG, es dependiente de PhoB y es la encargada del fenotipo de inhibición de formación de biofilm (Monds et al., 2007).

KdpE

El potasio es el catión más abundante en la célula, contribuye a la presión de turgencia y juega un papel importante en la osmo-adaptación, regulación del pH, expresión génica y activación de enzimas. En las bacterias generalmente se encuentran cuatro sistemas de transporte de potasio: Trk, Ktr, Kup y Kdp. El sistema Kdp consiste de cuatro subunidades codificadas por el operón *kdpFABC*, y es el único sistema de captación de K^+ que se induce en condiciones bajas de presión de turgencia o limitantes de K^+ . Es controlado positivamente por el SDC KpdDE (Walderhaug et al., 1992; Domínguez-Ferreras et al., 2009; Narayanan et al., 2012; Freeman et al., 2013; Siarot et al., 2017). En rhizobia no se ha estudiado el sistema KdpDE, sin embargo, los estudios del sistema KdpFABC infieren que KdpDE regula la expresión de estos genes por homología con *E. coli*. En *R. leguminosarum*, el sistema PTS^{Ntr} (sistema de fosfotransferencia) compuesto por PtsP y PtsN, controla la expresión de *kdpABC* a través de la interacción de KdpD con PtsN en su forma no fosforilada (Prell et al., 2012; Untiet et al., 2013). En *Azorhizobium caulinodans*, *kdpFABC* no se expresa en los nódulos de *Sesbania rostrata*; y mutaciones en el sistema *kpd* de *A. caulinodans* y *S. meliloti* no afectan la simbiosis (Domínguez-Ferreras et al., 2009; Siarot et al., 2017).

CtrA

El regulador maestro del ciclo celular, CtrA (“Cell Cycle Transcriptional Regulator”) ha sido ampliamente estudiado en *C. crescentus* (Quon et al., 1996), debido a que es un excelente modelo de estudio del ciclo celular y cada paso de la división y la diferenciación puede ser distinguido temporalmente. CtrA forma parte de un SDC con la HHK CckA y la proteína ChpT (“cell cycle histidine phosphotransferase”) (Biondi et al., 2006). Durante el ciclo celular, se ha encontrado CtrA en células planctónicas (“swarmer cells”), desapareciendo en la transición de célula planctónica a célula no mótil, y se acumula en mitad de la fase S después de haberse iniciado la replicación del ADN (Domian et al., 1997). El papel dual y opuesto de CtrA durante el ciclo celular, actuando negativamente sobre la replicación de ADN y positivamente sobre la división celular, requiere de una compleja y amplia regulación a través de la fosforilación y la proteólisis (Figura 1.10). La fosforilación está dada por el sistema CckA-ChpT-CtrA. Sin embargo, ChpT fosforila a una segunda proteína CpdR, un regulador de respuesta sencillo (Biondi et al., 2006; Iniesta et al., 2006). La proteólisis de CtrA se puede dar por la interacción de cuatro proteínas: CpdR, ClpX, RcdA y PopA. CpdR interactúa con ClpX cuando no está fosforilado y PopA interactúa con RcdA (Iniesta et al., 2006; Smith et al., 2014). PopA requiere de unir *ci-di-GMP* (cdG) para estimular la proteólisis. Una vez interactuando CpdR-ClpX y RcdA-PopA-cdG estimulan la proteólisis de CtrA~P (Smith et al., 2014). Cuando CpdR~P es fosforilado, no interactúa con ClpX, y CtrA~P se mantiene activo regulando a sus genes blanco (Iniesta et al., 2006). Además de ser regulado por proteólisis, el SDC DivJ/DivK controla la actividad del sistema CckA-ChpT-CtrA. Una vez fosforilado DivK por DivJ, DivK~P se encarga de inhibir la autofosforilación de CckA. Específicamente, la fosforilación-inhibición se da en la transición de la fase G1-S,

y después de la división celular. En la célula no mótil, DivK se fosforila a altos niveles, mientras que en células planctónicas su actividad es menor. DivK~P es controlado por PleC, una fosfatasa, y actúa en las células planctónicas permitiendo que DivK~P no inhiba a CckA (Biondi et al., 2006).

En *C. crescentus* el regulón CtrA está compuesto por 95 genes, de los cuales 40 se encuentran en operón. CtrA controla la expresión de genes involucrados en la división celular (ej. *ftsZ*), el metabolismo de la membrana celular, en la morfogénesis de la bacteria,

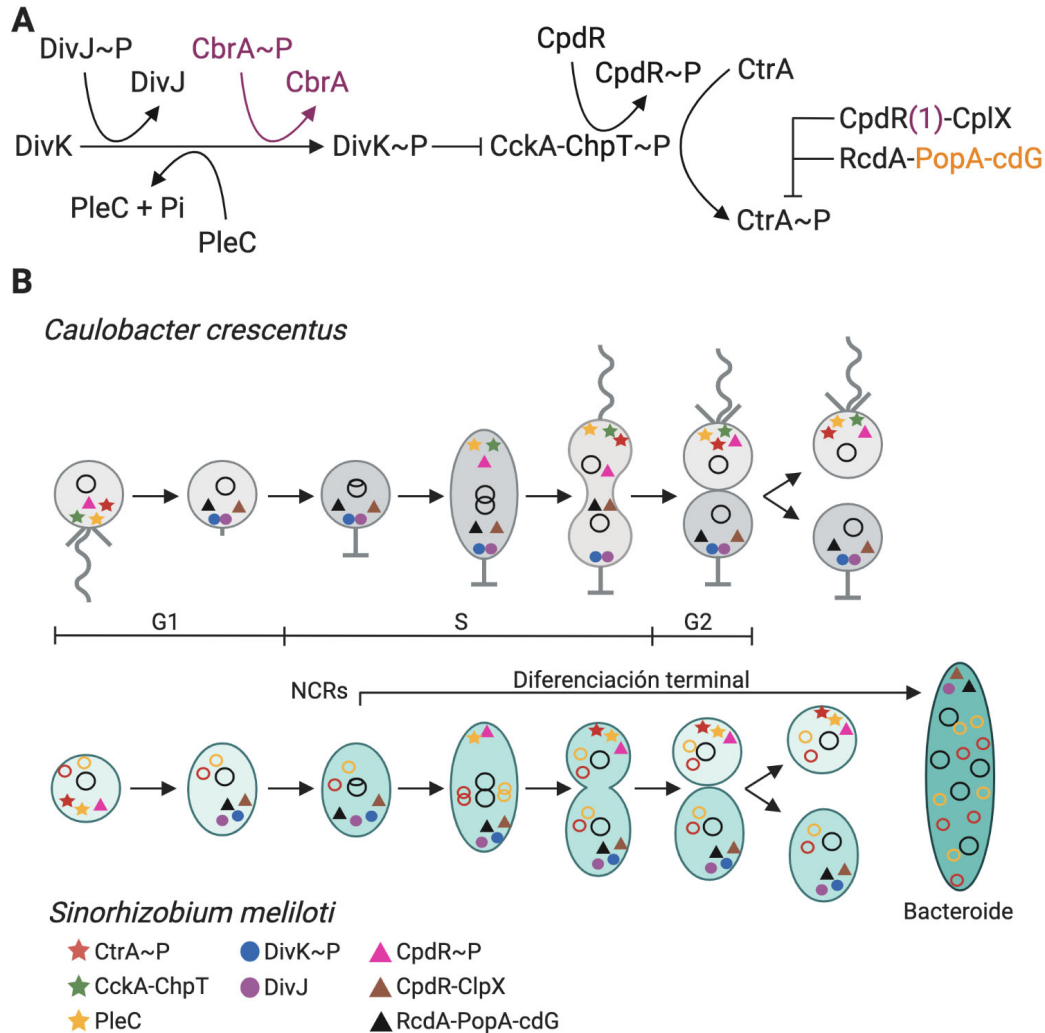


Figura 1.10 Regulación del ciclo celular de *Caulobacter crescentus* y *Sinorhizobium meliloti*. (A) Cascada de señalización del regulador del ciclo celular CtrA. La mayoría de los SDC que han sido identificados en *C. crescentus* (indicados con letras negras) se encuentran codificados en el genoma de *S. meliloti* en donde se ha identificado además a CbrA, una HK adicional (indicada en morado). Por otra parte, el receptor PopA (en naranja) solamente está presente en *C. crescentus*. (B) Representación de los modelos del ciclo celular en ambos organismos que muestran la localización de las proteínas. NCRs, péptidos ricos en cisteínas de planta dentro del nódulo; cdg, ci-di-GMP. Esquema basado en Biondi et al., 2006; Iniesta et al., 2006; Smith et al., 2014; Schallies et al., 2015; Xue and Biondi, 2019.

en la biogénesis del flagelo (ej. *fliQ*) y del pili (ej. *pilA*), en quimiotaxis, así como en la expresión de genes reguladores, entre otros (Quon et al., 1996; Kelly et al., 1998; Reisenauer et al., 1999; Skerker and Shapiro, 2000; Laub et al., 2002). La secuencia de la caja de unión de CtrA en *C. crescentus* es TTAA-N7-TTAAC (Quon et al., 1996; Barnett et al., 2001). En *S. meliloti*, se encontró que la secuencia de la caja de unión de CtrA es casi idéntica a la de *C. crescentus* (TAA-N7-TTAAC) (Barnett et al., 2001). Basándose en la secuencia de esta caja se encontraron 64 genes en el genoma de *S. meliloti* que compartían esta secuencia (De Nisco et al., 2014). Estudios transcriptómicos en una mutante condicional de *ctrA* en esta bacteria muestran 126 genes diferencialmente expresados, de los cuales 56 son regulados directamente por CtrA, entre ellos genes de membrana, motilidad, quimiotaxis y proteínas de señalización (Pini et al., 2015).

La cascada de señalización del ciclo celular en *S. meliloti* se compone de 3 HKs, dos RRs y tres proteínas accesorias (Figura 1.10). DivK fosforilado (DivK~P) inhibe a CtrA. DivK es fosforilado principalmente por DivJ, sin embargo, CbrA (HK) controla su fosforilación, y PleC (HK) juega un papel de fosfatasa para mantener en bajas concentraciones los niveles de DivK~P (Pini et al., 2013; Schallies et al., 2015). Una vez fosforilada CtrA, este se regula por degradación a través de las proteínas accesorias. En *C. crescentus*, PopA participa en la degradación de CtrA, sin embargo, esta proteína se encuentra ausente en los rhizobia (Schallies et al., 2015). En *S. meliloti*, CpdR1 interacciona con ClpX para degradar a CtrA (Kobayashi et al., 2009). En la simbiosis *S. meliloti*-alfalfa, se ha demostrado que: (1) mutantes en *divJ*, *cpdR1* y *clpX* no pueden infectar las raíces de alfalfa de manera eficiente dado que los niveles de CtrA~P son elevados, por lo que la célula no puede diferenciarse a bacteroide ni sobrevivir dentro de las células de la raíz; (2) CtrA no se expresa en bacteroides; y (3) los genes *cpdR1* y *clpX* se expresan tanto en vida libre como en los nódulos (Kobayashi et al., 2009; Pini et al., 2013). Las proteínas CckA y ChpT no han sido caracterizadas en esta bacteria.

VirG

A. tumefaciens es capaz de transferir parte de su ADN al genoma de la planta hospedera. Esta capacidad está dada por dos regiones esenciales que se encuentran en el plásmido Ti de la bacteria. La primera, la región ADN-T (ADN de transferencia) que se encuentra delimitada por dos secuencias repetidas directas que son reconocidas por las proteínas VirD1 y VirD2 con función de topoisomerasa y endonucleasa, respectivamente. La segunda región esencial, son los genes de virulencia (*vir*) que son regulados genéticamente por el SDC VirA/VirG. Los genes *vir* se dividen en diferentes operones; entre ellos el operón *virB*, compuesto por 11 genes (*virB1-virB11*) y el gen *virD4* que codifican para el sistema de secreción tipo IV por donde se exporta el ADN-T; y los genes *virD3*, *virD5*, *virE2*, *virE3* y *virF* que codifican para proteínas efectoras que ayudan al transporte del ADN-T a la célula hospedera (Lacroix and Citovsky, 2013; 2019).

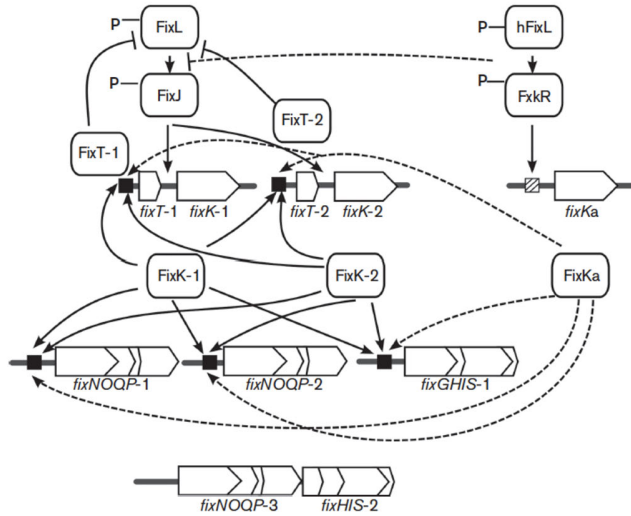
El SDC VirA/VirG cuenta con una proteína accesoria periplásmica, ChvE (“chromosomal virulence protein”), que une azúcares como glucosa y galactosa que son parte de los exudados de las plantas, e interacciona con VirA para activar la expresión de los genes *vir* (Cangelosi et al., 1990; Chang et al., 1996). VirG regula todos los genes *vir* y el operón *repABC* reconociendo una secuencia repetida separada por 11 nt, TG(A/T)AA(C/T), en la región promotora (Stachel and Zambryski, 1986; Tamamoto et al., 1990; Cho and Winans, 2005). El SDC VirA/VirG responde a compuestos fenólicos como la acetosiringona. Se ha demostrado que en presencia de acetosiringona se incrementa el número de copias de plásmido Ti de *A. tumefaciens*, debido a la regulación positiva de VirG sobre *repABC* (Cho and Winans, 2005). El ácido salicílico, un compuesto sintetizado por la planta que es tóxico para la bacteria, inhibe al SDC VirA/VirG y por lo tanto la expresión de los genes *vir* (Yuan et al., 2007; Anand et al., 2008; Yuan et al., 2008). En *Mesorhizobium loti*, al igual que en *Agrobacterium*, VirG regula la expresión del operón *vir*, pero no a *virA*. En la región promotora de *virA* se encuentra una caja *nod* que es regulada por NodD en presencia de flavonoides como la naringenina (Hubber et al., 2007). El sistema de transporte VirB/D4 es importante para el establecimiento de la simbiosis de manera específica de *M. loti* con su leguminosa hospedera (Hubber et al., 2004). Estos trabajos sugieren que, una vez sintetizados los FN, NodD activa la expresión de *virA*, VirA detecta compuestos de la planta y los cambios en la membrana los pelos radicales en los que ocurre la formación del hilo de infección. En *R. etli* CE3 también podemos encontrar la maquinaria de virulencia, la cual carece de la región ADN-T. VirA detecta los exudados fenólicos de la raíz del frijol y VirG activa la expresión de los genes *vir* (Wang et al., 2017). Se ha demostrado que en *R. etli* la maquinaria *vir* es funcional y que para transferir ADN de la bacteria a la planta se requiere la presencia de un plásmido que contenga la región ADN-T de *A. tumefaciens* (Lacroix and Citovsky, 2016; Wang et al., 2017). Se sugiere que en *R. etli* la maquinaria de virulencia funciona como un transportador de proteínas efectoras que se requieren para la simbiosis (Lacroix and Citovsky, 2016); sin embargo, se ha comprobado que VirA/VirG no son necesarios para el proceso de nodulación (Bittinger et al., 2000).

FxkR

Como se mencionó anteriormente, en la mayoría de los rhizobia, la cascada de regulación de la fijación de nitrógeno inicia con el SDC FixL/FixJ, donde el regulador FixJ es de tipo NarL/FixJ. Sin embargo, en *R. etli* CE3 y *R. leguminosarum* bv. *viciae* la cascada regulatoria inicia con el SDC formado por hFixL, una HK híbrida, y FxkR, un regulador de la respuesta tipo OmpR/PhoB (Zamorano-Sánchez et al., 2012). Ambos SDC responden a condiciones microaeróbicas y regulan a *fixK*. FixK a su vez regula la expresión de las dos copias del operón *fixNOQP* (Zamorano-Sánchez and Girard, 2015). El genoma de *R. leguminosarum* bv. *viciae* contiene tres copias de *fixK*, y dos copias de *hfixL*, *fxkR* y *fixNOQP*. *R. etli* CE3 tiene dos copias de *fixNOQP*, y una copia de *fixK*, *fxkR* y *hfixL*. En ambos rhizobia no se encuentra codificado un gen *fixJ*. De acuerdo con la caja de unión de FxkR, GTTACA-N4-GTTACA (Zamorano-Sánchez et al., 2012), se encontró *in silico* la secuencia de unión de

FxkR en todas las copias de los genes *fixKL* de *R. etli* y *R. leguminosarum* (Tsoy et al., 2016). El genoma de *S. meliloti* SM11, además del SDC FixL/FixJ, posee el SDC hFixL/FxkR, y tres copias de *fixK* (1, 2, a). Se determinó que el sistema hFixL/FxkR regula negativamente a FixL/FixJ y regula a la copia reiterada de *fixKa* (Reyes-González et al., 2016). A su vez, FixKa regula la expresión de las copias de los genes *fixK*, *fixNOQP* y *fixGHIS* (Figura 1.11A). Con los diferentes estudios realizados en *R. etli* CE3, se definió la cascada de regulación completa de los genes *fix* (figura 1.11B). El SDC hFixL/FxkR activa a *fixKf*, FixKf controla la expresión de las dos copias de los genes *fnrN*, *fixNOQP* y *fixGHISstoR* (Zamorano-Sánchez and Girard, 2015). Además, esta cascada es controlada negativamente por las dos copias de los reguladores StoR, reguladores tipo FNR (Granados-Baeza et al., 2007). Por otro lado, FixK controla la expresión de genes importantes para el metabolismo de compuestos nitrogenados (Gómez-Hernández et al., 2011).

(A) *Sinorhizobium meliloti*



(B) *Rhizobium etli*

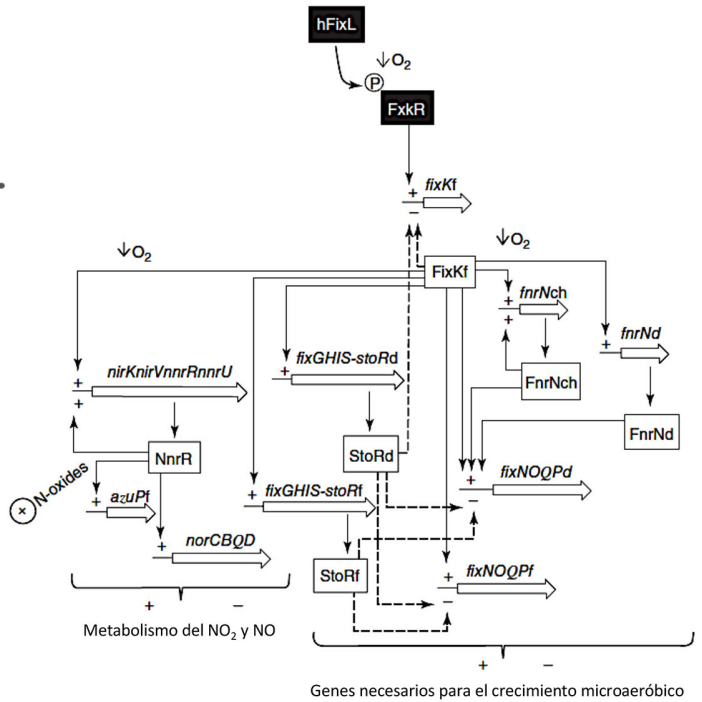


Figura 1.11 Cascada de regulación de los genes *fix* en *S. meliloti* y *R. etli*. (A) Modelo de regulación de la expresión de los genes *fix* en *S. meliloti* SM11. Los cuadros negros indican cajass de anaerobiosis; y los cuadros con líneas representan la K-box. Las líneas con terminación en flecha y en romo indican regulación positiva o negativa, respectivamente. Las líneas punteadas representan el modelo propuesto de acuerdo con evidencias genéticas. (B) Modelo regulatorio de la expresión de los genes *fix* en *R. etli* CFN42. Las líneas continuas y punteadas indican regulación positiva o negativa, respectivamente. Esquema modificado de Reyes-González et al. (2016) y Zamorano-Sánchez and Girard (2015).

1.10 *Rhizobium etli* como modelo de estudio

R. etli CE3 es una bacteria fijadora de nitrógeno que establece una relación simbiótica con las raíces de *P. vulgaris*. Su genoma está constituido por un cromosoma circular de 4,381 kb y seis plásmidos de alto peso molecular (pRet42a a pRet42f) cuyos tamaños van de 184 a 643 kb (González et al., 2006). En el plásmido pRet42a se encuentran los genes encargados de la transferencia conjugativa y la síntesis de AHL (*tra*, *trb*, *cin*) que son dependientes de “quorum sensing”. Este replicón es capaz de auto transferirse (Brom et al., 2000; Tun-Garrido et al., 2003). Los genes esenciales para la producción de lipopolisacáridos se encuentran codificados en el plásmido pRet42b (Brom et al., 1992; Brom et al., 2000). La habilidad de *R. etli* para usar diversas fuentes de carbono como el glicerol está dada por el plásmido pRet42b; así como el dulcitol y la trigonelina por el plásmido pRet42c; y la melibiosa por el plásmido pRet42e (Brom et al., 2000). Los genes que participan en la FSN (*nod*, *nif*, *fix*) están presentes mayormente en el plásmido pRet42d conocido como plásmido simbiótico (pSym) (González et al., 2003). El plásmido pRet42e es considerado como un cromosoma secundario debido a que es esencial para el crecimiento de *R. etli* (Brom et al., 2000; Landeta et al., 2011). Una región del plásmido pRet42f contiene copias reiteradas de los genes *fixNOQP*, *fixGHIS-stoR* y *fixK*, además de contener al SDC hFixL/FxkR (Girard et al., 2000; Granados-Baeza et al., 2007; Zamorano-Sánchez et al., 2012). Río abajo de los genes *fix*, en el plásmido pRet42f, se encuentran codificados genes implicados en el proceso de desnitrificación como son los operones *nirKV-nnrR* y *norCBQD* (Gomez-Hernández et al., 2011). Estos genes son activados por factores transcripcionales tipo FNR/CRP en respuesta a señales del medio ambiente. El genoma de *R. etli* codifica seis reguladores tipo FNR: *fixKf*, *fnrNch*, *fnrNd*, *nnrR*, *stoRd* y *stoRf* (González et al., 2003; Granados-Baeza et al., 2007). *FixKf* activa al operón *nirK* en condiciones de bajo oxígeno; mientras que *NnrR* activa a este operón y al operón *norCBQD* en presencia de óxidos N₂ (Figura 1.11B). *NirK* es la enzima encargada de reducir el nitrito a óxido nítrico; y tanto *NirK* como *NorCB* son indispensables para el crecimiento de *R. etli* en presencia de NO ya que lo reduce a N₂O, además, son necesarias para desintoxicar de NO en el nódulo (Gómez-Hernández et al., 2011). Para una ocupación eficiente del nódulo de frijol por *R. etli*, se determinó que los plásmidos pRet42b, pRet42c, pRet42d y pRet42f son requeridos (Brom et al., 2000). La mayoría de los sistemas de transporte tipo III y IV se encuentran en los plásmidos pRet42a y en el pSym (González et al., 2006). *R. etli* codifica para distintas bombas de eflujo MDR distribuidos en el genoma. De acuerdo con Ormeño-Orrillo et al. (2012) esta bacteria codifica para 44 bombas de eflujo, de las cuales 31 pertenecen a la familia MFS, 8 a la familia RND, 3 a la familia MATE y 2 a la familia SMR.

En general en los rhizobia, los genes que codifican para quimiotaxis y flagelo se encuentran en el cromosoma. En *R. etli* se encuentran 6 flagelinas y 26 proteínas aceptoras de grupos metilo (MCP, “methyl accepting protein”). La organización genómica de estos genes se comparte entre *R. etli*, *R. leguminosarum* y *S. meliloti*, pero varían en el número de flagelinas y MCPs (Figura 1.9; Tambalo, 2015; Scharf et al., 2016). La regulación y caracterización del

sistema de quimiotaxis y flagelar no se ha estudiado en *R. etli* CE3. Sin embargo, en *R. etli* CNPAF512, se ha caracterizado la motilidad por nado (“swimming”) y por superficie (“swarming”). Se determinó que los genes *flbT*, *flgE* y *flaCch1* son esenciales para el nado y que el swarming es regulado por el sistema de quorum sensing ClnIR (Daniels et al., 2006; Braeken et al., 2008).

La base de datos “The Microbial Signal Transduction Database 3.0” (Gumerov et al., 2020, https://mistdb.com/genomes/GCF_000092045.1) muestra que el genoma de *R. etli* CE3 codifica 677 proteínas de señalización que incluyen sistemas de uno y dos componentes, así como sistemas quimiosensores y factores sigma de función extracitoplasmática. Específicamente, *R. etli* CE3 codifica 47 HK y 68 RR, de los cuales 36 son RR con dominio de unión a ADN (Tabla 1.2) (Jenal and Galperin, 2009; Galperin, 2010; Gumerov et al., 2020). El 50% de los RR de unión de ADN de *R. etli* CE3 pertenecen a la familia OmpR/PhoB, y el 33% a la familia NarL/FixJ. La distribución de los reguladores OmpR/PhoB en el genoma son 14 en el cromosoma, 1 en cada uno de los plásmidos pRet42a, pRet42c y pRet42e, y 2 en pRet42f (Tabla 1.2). En general, la función de la mayoría de las proteínas de señalización en *R. etli* CE3 sigue siendo desconocida; por ejemplo, solo dos reguladores tipo OmpR/PhoB se han caracterizado, FxkR, el regulador de la respuesta que controla la expresión de los genes de respiración microaeróbica (Zamorano-Sánchez et al., 2012), y VirG, necesario para activar la expresión de genes *vir* involucrados en la producción de pili tipo IV (Wang et al., 2017).

Tabla 1.2 Distribución de los genes que codifican a las HKs y los RRs en el genoma de *R. etli* CFN42.

Replicón	HK	RR	RR de unión a ADN	OmpR ^a	NarL ^b	LytR ^c	NtrC ^d
Cromosoma	33	44	23	13	4	1	5
pRet42a	1	1	1	1	-	-	-
pRet42b	-	-	-	-	-	-	-
pRet42c	3	3	3	1	2	-	-
pRet42d	-	1	-	-	-	-	-
pRet42e	3	4	2	1	1	-	-
pRet42f	7	15	7	2	5	-	-
Total	47	68	36	18	12	1	5

^aOmpR/PhoB, ^bNarL/FixJ, ^cLytR/AgrA, ^dNtrC/DctD

Los datos se tomaron de la base de datos “The Microbial Signal Transduction Database 3.0” (Gumerov et al., 2020, https://mistdb.com/genomes/GCF_000092045.1) y “Response regulators encoded in bacterial and archaeal genomes” de NCBI (Jenal and Galperin, 2009; Galperin, 2010; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete_Genomes/RRcensus.html).

Derivado de los trabajos que se han realizado en *R. etli* (Vercruyssen et al., 2011; López-Leal et al., 2014; Reyes-Pérez et al., 2016; Talbi et al., datos no publicados; entre otros), se sugiere que el comportamiento de *R. etli* está controlado por una gran cantidad de sistemas

de señalización que responden a una variedad de señales externas. Para comenzar a abordar la contribución de los múltiples SDC de *R. etli* en la regulación del estilo de vida libre, en el establecimiento de simbiosis y en la fijación de nitrógeno, nos centramos en la familia de RR OmpR/PhoB, que como se mencionó es la más representada en el genoma de *R. etli* CE3.

2. Hipótesis y objetivos

2.1 Hipótesis

Los reguladores tipo OmpR/PhoB forman parte de los mecanismos de señalización involucrados en la interacción simbiótica *Rhizobium* – leguminosa. El regulador de la respuesta RetPC57 (RHE_PC00057) participa en el control de la expresión de genes implicados en diferentes etapas de la simbiosis *R. etli* – *Phaseolus vulgaris*.

2.1 Objetivo general

Caracterizar genética y funcionalmente al regulador RetPC57 (RHE_PC00057) de *R. etli* CE3 para determinar su participación en la simbiosis con *Phaseolus vulgaris*.

2.2 Objetivos particulares

- 1) Analizar fenotipos relacionados con el establecimiento de la simbiosis con plantas de frijol de mutantes de *R. etli* CE3 en genes que codifican reguladores de la familia OmpR/PhoB.
 - a) Identificar los reguladores OmpR/PhoB de *R. etli* CE3 con función desconocida en bacterias de la familia Rhizobiaceae.
 - b) Generar mutantes OmpR/PhoB en *R. etli* CE3.
 - c) Determinar la participación de algunos reguladores OmpR/PhoB en la formación de biofilm, la motilidad de la bacteria, así como en la nodulación y fijación de nitrógeno en plantas de frijol.

- 2) Análisis bioinformático del regulador RetPC57 de *R. etli*
 - a) Identificar los ortólogos del regulador RetPC57 en algunos miembros de la familia Rhizobiaceae y en *E. coli*.
 - b) Análisis comparativo del contexto genómico del gene *RetPC57* (RHE_PC00057) de *R. etli* y sus ortólogos.
 - c) Análisis filogenético de los genes *RetPC56* (RHE_PC00056), *RetPC57*, *RetPC58* (RHE_PC00058) y *nodTc* (RHE_PC00059).

- 3) Identificar a la histidina quinasa cognada del regulador de respuesta RetPC57.
 - a) Determinar si los genes *RetPC57* y *RetPC58* forman un operón.
 - b) Determinar si RetPC58 es la histidina quinasa cognada del regulador RetPC57 por fosforilación *in vitro*.

- 4) Análisis de expresión de los genes del locus *RetPC57* de *R. etli*
 - a) Analizar el patrón de expresión de los genes *RetPC57*, *RetPC58*, *RetPC55*, *RetPC56* y *nodTc* en la cepa silvestre de *R. etli* tanto en vida libre y como en simbiosis con plantas de frijol.

- b) Determinar si los genes *RetPC57*- *RetPC58*, *RetPC55*, *RetPC56* y *nodTc* son regulados por *RetPC57*.
- 5) Evaluar si *RetPC57* participa como regulador transcripcional (directo/indirecto) de genes simbióticos de *R. etli* CE3 en diferentes etapas de la simbiosis con plantas de frijol: infección, nodulación y fijación de nitrógeno.
- a) Análisis comparativo de expresión de genes bacterianos involucrados en el proceso simbiótico en plantas de frijol inoculadas con la cepa silvestre y la mutante Δ *RetPC57* de *R. etli* CE3
 - b) Análisis de expresión de genes de la planta relacionados con la infección por rhizobia, con la nodulación y con el metabolismo del nódulo en plantas de frijol inoculadas con la cepa silvestre y la mutante Δ *RetPC57* de *R. etli* CE3.

3. Material y métodos

3.1 Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas bacterianas y plásmidos utilizados se enlistan en la siguiente tabla:

Tabla 3.1. Cepas bacterianas y plásmidos.

Cepa o plásmido	Característica	Referencia
Cepas		
<i>R. etli</i>		
CE3	Derivado de la cepa silvestre tipo CFN42. St ^R , Nal ^R	Noel et al. (1984)
ΔRetPC57	Derivada de la CE3, ΔRHE_PC00057. St ^R , Nal ^R	Rodriguez et al, 2020
ΔCH00514	Derivada de la CE3, ΔRHE_CH00514. St ^R , Nal ^R	Este trabajo
ΔCH02128	Derivada de la CE3, ΔRHE_CH02128. St ^R , Nal ^R	Este trabajo
ΔCH02413	Derivada de la CE3, ΔRHE_CH02413. St ^R , Nal ^R	Correa-Galeote et al.
ΔCH02577	Derivada de la CE3, ΔRHE_CH02577. St ^R , Nal ^R	Este trabajo
ΔCH03587	Derivada de la CE3, ΔRHE_CH03587. St ^R , Nal ^R	Este trabajo
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>supE44ΔlacU169(φ80lacZΔM15) hsdR17recA1endA1gyrA96 thi-1relA1</i>	(Sambrook et al., 1989)
BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompI hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻)</i>	(Studier et al., 1990)
Plásmidos		
pCR2.1TOPO	Vector de clonación de productos de PCR. Amp Km ^R	Invitrogen
TOPO::PC57- <i>gus</i>	Derivada de pCR2.1TOPO. Región del gen <i>PC57</i> que contiene 528 pb de la región codificante y 988 pb río arriba del ATG. Para clonar en pBBMCS53. Km ^R	Rodriguez et al, 2020
TOPO::pPC57	Derivada de pCR2.1TOPO, promotor y región codificante del gen <i>PC57</i> . Para clonar en pFAJ1700. Km ^R	Rodriguez et al, 2020
TOPO::PC57	Derivada de pCR2.1TOPO, región codificante del gen <i>PC57</i> . Para clonar en pET28a. Km ^R	Rodriguez et al,
pJET2.1/blunt	Vector de clonación de productos de PCR. Amp Cb ^R	Thermo Scientific
pJET::ΔPC57	Derivada de pJET2.1/blunt, región río arriba y río abajo del gen <i>RHE_PC00057</i> generando una delección en ese gen (ΔPC57). Para clonar en pK* <i>mobsacB</i> . Cb ^R	Rodriguez et al, 2020
pJET::QPC57	Derivada de pJET2.1/blunt, región codificante del gen <i>PC57</i> . Para clonar en pLC290. Cb ^R	Rodriguez et al, 2020
pJET::PC58	Derivada de pJET2.1/blunt, región codificante del dominio histidina-quinasa del gen <i>PC58</i> . Para clonar en pET28a. Cb ^R	Rodriguez et al,
pRK2013	Plásmido ayudador de conjugación. Km ^R	(Figurski and Helinski, 1979)
pK* <i>mobsacB</i>	Vector suicida de clonación. Km ^R	(Schäfer et al., 1994)
pK::ΔCH00514	Derivada de pK* <i>mobsacB</i> , ΔCH514. Km ^R	Este trabajo
pK::ΔCH02128	Derivada de pK* <i>mobsacB</i> , ΔCH2128. Km ^R	Este trabajo

pK:: Δ CH02413	Derivada de pK* <i>mobsacB</i> , Δ CH2413. Km ^R	Correa-Galeote et al.
pK:: Δ CH02577	Derivada de pK* <i>mobsacB</i> , Δ CH2577. Km ^R	Este trabajo
pK:: Δ CH03587	Derivada de pK* <i>mobsacB</i> , Δ CH3587. Km ^R	Este trabajo
pK:: Δ PC57	Derivada de pK* <i>mobsacB</i> , Δ PC57. Km ^R	Rodriguez et al, 2020
pFAJ1700	Tc ^R	(Dombrecht et al., 2001)
pPC57	Derivada de pFAJ1700, pPC57. Tc ^R	Rodriguez et al, 2020
pGUS	pFAJ1700::uidA. Tc ^R	(Isidra-Arellano et al., 2018)
pGUS::PC57	Derivada de pFAJ1700::placZ::uidA, pPC57. Tc ^R	Rodriguez et al, 2020
pLC290	Vector de expresión inducible por cumato. Km ^R	(Chubiz et al., 2013)
pQPC57	Derivada de pLC290, PC57. Km ^R	Rodriguez et al, 2020
pBBMCS53	pBBR1MCS-5 Δ placZ que lleva el gen <i>uidA</i> sin promotor. Gm ^R	(Girard et al., 2000)
pPC57::gus	Derivada de pBBMCS53, fusión transcripcional PC57::uidA. Gm ^R	Rodriguez et al, 2020
pPC56::gus	Derivada de pBBMCS53, RHE_PC00056::uidA que contiene 643 pb del CDS de RHE_PC00056 y 873 pb río arriba del RHE_PC00056. Gm ^R	Rodriguez et al, 2020
pnodTc::gus	Derivada de pBBMCS53, nodTc::uidA que contiene 877 pb del CDS de nodTc y 333 pb río arriba de nodTc. Gm ^R	Rodriguez et al, 2020
pET-28a(+)	Vector de expresión, His ₆ Tag. Km ^R	Novagen
pET28a::PC57	Derivada de pET-28a(+), PC57. Km ^R	Rodriguez et al,
pET28a::PC58	Derivada de pET-28a(+), PC58. Km ^R	Rodriguez et al,

Amp, ampicilina; Gm, gentamicina; Km, kanamicina; Nal, nalidíxico; St, estreptomycin; Tc, tetraciclina

3.2 Cultivos bacterianos

Las cepas de *E. coli* fueron crecidas a 37°C en medio Luria Bertani (LB). Las cepas de *R. etli* se crecieron a 30°C en medio rico peptona-levadura (PY) suplementado con CaCl₂ (7 mM) (Noel et al., 1984) o en medio mínimo Y (MMY) suplementado con CaCl₂ (1.5 mM) y FeCl₃ (18 μ M) (Bravo and Mora, 1988). Cuando fue requerido el uso de sacarosa se agregó al 12.5% (w/v) y el cumato a una concentración final de 5 μ g ml⁻¹. Para la detección de la actividad de β -galactosidasa en la selección de plásmidos recombinantes se utilizó el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido (X-gal) a una concentración de 20 μ g ml⁻¹ en cajas de cultivo con medio sólido. Con el propósito de sincronizar los cultivos de *R. etli* en medio líquido, las cepas se refrescaron por crecimiento en placas de Petri con medio PY. Posteriormente se inocularon 3 ml de medio PY y se incubaron por 12 h a 30°C con agitación. Con 1 ml de los pre-cultivos se inocularon 50 ml de PY y se incubaron por 12 h a 30°C con agitación (200 rpm). Cuando fue necesario cultivar en MMY, estos cultivos se colectaron por centrifugación y se lavaron con MMY. Las pastillas celulares utilizadas como inóculos fueron resuspendidas en MMY. Los cultivos en MMY se inocularon a una DO₅₄₀ inicial de 0.05. El crecimiento celular fue monitoreado midiendo la densidad óptica (DO) a

540 nm utilizando un espectrofotómetro (T60 Vis Spectrophotometer PG Instruments), en celdas de plástico desechables de paso de luz de 1 cm.

3.3 Antibióticos

Los antibióticos utilizados fueron esterilizados por filtración. Para *E. coli* las concentraciones de los antibióticos utilizados fueron: carbenicilina (Cb), 100 µg ml⁻¹; gentamicina (Gm), 15 µg ml⁻¹; kanamicina (Km) 30 µg ml⁻¹; espectinomicina (Sp), 100µg ml⁻¹. Las concentraciones de los antibióticos utilizadas para *Rhizobium* fueron: estreptomycin (Sm), 200 µg ml⁻¹; gentamicina (Gm), 15 µg ml⁻¹; kanamicina (Km) 30 µg ml⁻¹; ácido nalidíxico (Nal) 20 µg ml⁻¹; espectinomicina (Sp), 100 µg ml⁻¹, tetraciclina (Tc), 10 µg/ml.

3.4 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos específicos para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron diseñados utilizando el programa Oligo versión 7 y sintetizados en la Unidad de Síntesis Química del IBt-UNAM (Cuernavaca, Morelos, México). Se utilizaron a una concentración de 5 pmol/µl. Los oligonucleótidos usados en este trabajo se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 3.2. Oligonucleótidos usados en este trabajo.

Oligonucleótidos usados para la construcción de plásmidos		
Plásmido	Oligonucleótido/ Posición en el genoma	Secuencia 5' → 3'
pK::ΔRHE_CH00514	Up1-CH514/ Chr531694	TGGCATCGACACATATTTATTCTGCCTA
	Lw1-Ov-CH514/ Chr532553	<u>CCACACACACCCCTCAGCGCGTCTCCGTCTCCT</u>
	Up2-Ov-CH514/ Chr533251	GGAGACGGAGACGCGCTGAGGGTGTGTGTGGT
	Lw2-CH514/ Chr534239	<u>CTGGACAGACGAGCGGGTTCGAGAAA</u>
pK::ΔRHE_CH02128	Up1-CH2128/ Chr2227932	TGACGATGCTGATCGCACCGATTTTC
	Lw1-Ov-CH2128/ Chr2229044	<u>AAGGAGCGGCTGACTGCTCTCGTGCCAG</u>
	Up2-Ov-CH2128/ Chr2229773	TCCTGGCACGAGAGCAGTCAGCCGCTCC
	Lw2-CH2128/ Chr2230592	<u>ACCCACGTCAAGCTTTTCGCCCTTG</u>
pK::ΔRHE_CH02413	Up1-CH2413/ Chr2523826	GTCGATGCGAGCGTTCTTTTCCCC
	Lw1-Ov-CH2413/ Chr2524717	<u>GGAAAGGCAATTATGAGCGCGAGCATG</u>
	Up2-Ov-CH2413/ Chr2525466	CATGCTCGCGCTCATAATTGCCTTTTCC
	Lw2-CH2413/ Chr2526370	<u>TGCTGCTACACGGCTGGCCATATG</u>
pK::ΔRHE_CH02577	Up1-CH2577/ Chr2687166	AACGTGGATCCTGGTAACCGGCGCCGAT
	Lw1-Ov-CH2577/ Chr2688109	<u>AGGAATGGTGGGCGTGATGGGAAGG</u>
	Up2-Ov-CH2577/ Chr2688788	AGGGTTGGCCTTGCTCCCCCTTCCCATCACGCC
	Lw2-CH2577/ Chr2699874	<u>CACCATTCTTTG</u> CGCTTTCCGAGCGGATCATTCAAGCTTT
pK::ΔRHE_CH03587	Up1-CH3587/ Chr3782056	GCATCACCGAAGACATCATCACCGATCT
	Lw1-Ov-CH3587/ Chr3783381	<u>GTAGGCGGCTTTTCATGGATGTTCCCTCTGT</u>

	Up2-Ov-CH3587/ Chr3784069 Lw2-CH3587/ Chr3784954	GGGAACATCCATGAAAGCCGCCTAC TGGCGGCATCGATCTTCGCCATCAG
pK::ΔPC57	Up1-PC57/ pRet42c54719 Lw1-Ov-PC57/ pRet42c55706	CTGAAACTTCGGCCTGCCATTCCAC GCCGGGGCATGGTCATTGCGTTGTCCGTCA
	Up2-Ov-PC57/ pRet42c56391 Lw2-PC57/ pRet42c57245	CGGACAACGCAATGACCATGCCCCGGCTTT CGAGAATTTTCGTTGAGGAGCTCGATGATGT
pPC57-gus	Up-PC57gus	GGGTCTAGACAAGAGCTGCCGCAACAAA
pPC56-gus	Lw-PC57gus	CTGCTTCGATACCAACTGGCCGGCGCTG
pPC58-gus	Up-PC57gus Lw-PC58gus	GGGTCTAGACAAGAGCTGCCGCAACAAA ATACTCGAGTCGGCACGGAACGGGTGATG
pnodTc-gus	Up-nodTcgus Lw-nodTcgus	GCGGGATGAGCTCGAACGGATTTT GCGAAGCTTATCGGGACGGTTCCGGATG
pQPC57	Up-QPC57 Lw-QPC57	GGATCTCTAGATTCTAATGACGGACAACGCAA GGGGACTAGTGGTCAATCCAACAGCAGTTGAT
pPC57	Up-PC57-Cpl	AAAATGCATAGACAAGAGCTGCCGCAA
pGUS-pc57	Up-PC57-Cpl p53Lw	AAAAGCTCGAGGGCATGGTCAATCCAA ACAGGACGTAACATAAGGGACT
pET28a::PC57	Up-PC57p Lw-PC57p	GCACATATGAACAAGGTTCTCCTCATCG CCCCTCGACTCAATCCAACAGCAGTTGATA
pET28a::PC58	Up-HKPC58p Lw-PC58p	CCTCATATGCGATACCTCATTCGTCCCG GCAGTCGACGCTTTCAGCGCCGGTTCGACC

Oligonucleótidos usados para el análisis de expresión

Nombre de gen	Gene ID	Oligonucleótido/ Secuencia 5' → 3'
R. etli CE3		
<i>rpoA</i>	<i>RHE_CH01699</i>	Forward CCGATCGGCCTTATCCC Reverse GTTTGCCGAACGGACCGACAG
<i>RetPC57</i>	<i>RHE_PC00057</i>	Forward CTGCAGGAATATCTGGTGGGA Reverse AGATTGAGGCCCGATATCCT
<i>RetPC58</i>	<i>RHE_PC00058</i>	Forward CAACAGAGGCTGTTCCATGA Reverse CCGAGAATTTTCGTTGAGGAG
<i>nodTc</i>	<i>RHE_PC00059</i>	Forward GCGTGAAGAAGTCGAAAAC Reverse GCGGACGTAAGATCCACAT
<i>RetPC56</i>	<i>RHE_PC00056</i>	Forward GCGCACAGGTCTCTATGTCA Reverse CCGAGGTCACTACCTTCGAC
<i>nodA</i>	<i>RHE_PD00310</i>	Forward CTGGAGCTTACAACGCCCTT Reverse CAAACCGAACGCCAAGTTGC
<i>nodB</i>	<i>RHE_PD00282</i>	Forward CACTGGTTCGTCACAGCGTTT Reverse CGAGTATCTGACGTTGCACCT
<i>rmrA</i>	<i>RHE_PB00008</i>	Forward CTCGATGCCCGCTCAAGCAA Reverse ATCACGTAACCGCGCTGGTC
<i>rmrR</i>	<i>RHE_PB00009</i>	Forward TCGAGAAGAGACCGCGAGGC Reverse CGGATCGAGAGTGACGAGGA
<i>RHE_CH01192</i>	<i>RHE_CH01192</i>	Forward ATGTGAAGGCCGACTACACC Reverse CTGTTTCGATGACCGACTGCT
<i>RHE_CH01305</i>	<i>RHE_CH01305</i>	Forward GTCGAGGTTCAGTACGGTTCC Reverse ACCACCACCTGTTGTTTCGTT
<i>mexE1</i>	<i>RHE_CH03349</i>	Forward CGGTCGGCTCAGCTCAACCTC Reverse TCACCATCTCTTCGCTGGCAT
<i>mexF1</i>	<i>RHE_CH03348</i>	Forward GACACGCTGCTCGAAGCCAT Reverse CGAAAACCGCGACGAGCACC
<i>RHE_CH03357</i>	<i>RHE_CH03357</i>	Forward CTTTCATCCAATTCAGCGCCG Reverse CCGCCTGGTTTTTCATGAACG
<i>RHE_CH03652</i>	<i>RHE_CH03652</i>	Forward AAGGTTACCGGCTATGTTCGC Reverse CTTCTGCTTGATTTCCGCGC

<i>hfixL</i>	<i>RHE_PF00509</i>	Forward	CGACGGGACGATCACGCACTG
		Reverse	TCAGCTGGTTCGCGGATGT
<i>fxkR</i>	<i>RHE_PF00530</i>	Forward	GGCAGCACCTCAGCATGAC
		Reverse	GACCGTATAACCTTCTCCTCGAA
<i>fnrNch</i>	<i>RHE_CH02479</i>	Forward	CACGGCGGAGGAGAAGGT
		Reverse	GTGCTGATGGCGGTTTGC
<i>fnrNd</i>	<i>RHE_PD00216</i>	Forward	GCGCGAATGGATGCTGAC
		Reverse	AGTGCTCGTCGCCGTCTC
<i>fixNd</i>	<i>RHE_PD00296</i>	Forward	GCGCACGATCATCTGTTT
		Reverse	CGTCGCAATAGCCCGTAA
<i>nifA</i>	<i>RHE_PD00228</i>	Forward	TATTGGCGTTCCGGTAAAAG
		Reverse	GATCGTCCGACTGACCAGAT
<i>nifH</i>	<i>RHE_PD00202</i>	Forward	AATCGCATTTTACGGCAAAG
		Reverse	AAGGTCTTCCACCGAACCTT
<i>P. vulgaris</i>			
<i>UBC9</i>	<i>Phvul.006G110100</i>	Forward	GCTCTCCATTTGCTCCCTGTT
		Reverse	TGAGCAATTTTCAGGCACCAA
<i>CYCLOPS</i>	<i>Phvul.002G128600</i>	Forward	TCCTTACCACATTCTGCTGAGA
		Reverse	CCAAGAGATTCCAGAGGTTCA
<i>NSP2</i>	<i>Phvul.009G122700</i>	Forward	GACGGTTATCGGGTAGAGGAG
		Reverse	CGGAGGAAGAAGAAGTCCAAA
<i>NIN</i>	<i>Phvul.009G115800</i>	Forward	GGGAGAAGAGGCGTACGAAG
		Reverse	GTTGTGGGACACACTCCGAT
<i>NF-YA1 (HAP2)</i>	<i>Phvul.001G196800</i>	Forward	TACTTTGGCAATCCATCCTTG
		Reverse	AGACAGTTTCGGTGCAGAAAAGA
<i>ENOD40</i>	<i>Phvul.002G064200</i>	Forward	GGGTCCTTACCCCTCACACT
		Reverse	TGTAGCCAAAAGCCTCTCATCC
<i>PEPC</i>	<i>Phvul.005G066400</i>	Forward	AAGTGAGTATGCCCTGGTTT
		Reverse	GAAAGGGAAGATGGGTGAAAG
<i>GOGAT</i>	<i>Phvul.001G076400</i>	Forward	ACCAGGAGGTTGTGGATTTT
		Reverse	TTTTTGCTTTCCTTCCCTTCG

Los sitios de restricción introducidos por los oligonucleótidos están escritos con letras *italicas*.

Los nucleótidos subrayados indican los nucleótidos compartidos entre cada par de oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos de los genes de *R. etli* fueron diseñados de acuerdo a la secuencia del genoma de *R. etli* GCF_000092045.1 (González et al., 2006). Los oligonucleótidos de los genes *fnrNch* y *nifA* se sintetizaron de acuerdo con lo reportado por Ramírez et al. (2013) La secuencia de los oligonucleótidos utilizados para los genes de *P. vulgaris* fue tomada de la reportada por Nova-Franco et al. (2015).

3.5 Técnicas de biología molecular para la obtención de plásmidos recombinantes

Las técnicas de biología molecular usadas, así como la purificación de ADN plasmídico (lisis alcalina), electroforesis de ADN en geles de agarosa, transformación bacteriana con cepas de *E. coli* DH5 α y BL21, y conjugación bacteriana, se realizaron de acuerdo con los protocolos estándares descritos por Sambrook et al. (1989). En el caso de uso de “Kits” se siguió el protocolo descrito por el fabricante. En la síntesis de productos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), utilizamos una polimerasa de alta fidelidad (High Fidelity Polymerase de Jena Bioscience). Los productos de PCR fueron clonados para su secuenciación posterior en los vectores TOPO TA Cloning Kit de Invitrogen y CloneJet PCR cloning Kit. Las enzimas de restricción y la T4 DNA ligasa utilizadas fueron Thermo Scientific. La purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa se llevó a cabo utilizando el Kit GeneJet Gel Extraction Kit de Thermo Scientific. La visualización de

plásmidos de alto peso molecular en geles horizontales se hizo utilizando la técnica de Eckhardt modificada por Hynes and McGregor (1990).

3.6 Obtención de plásmidos recombinantes

3.6.1 Construcción de plásmidos para homogenización

Para la construcción de plásmidos útiles para la obtención de dobles recombinantes de *R. etli* que carecen de los genes *RHE_CH000514*, *RHE_CH02128*, *RHE_CH02413*, *RHE_CH02577*, *RHE_CH03587* y *RHE_PC00057* (*RetPC57*), se amplificaron las regiones río arriba (PCR 1) y río abajo (PCR 2) de cada gen utilizando oligonucleótidos específicos (Tabla 3.2). Las dos regiones flanqueantes se purificaron con el kit GeneJet Gel Extraction (Thermo Scientific) y se fusionaron utilizando la metodología de PCR de extensión por solapamiento (Tabla 3.3) (Shevchuk et al., 2004). El producto fusionado por PCR se recuperó utilizando los oligonucleótidos exteriores correspondientes a cada gen (Up1 y Lw2, Tabla 3.2) y como templado el PCR de extensión (Tabla 3.3).

Tabla. 3.3. Procedimiento de PCR para generar productos solapados.

1) PCR de regiones flanqueantes		2) PCR de extensión por solapamiento*		3) PCR de extensión del producto final	
Reacción	Ciclos	Reacción	Ciclos	Reacción	Ciclos
0.5µl dNTPs	95°C 2 m	0.5µl dNTPs	95°C 2 m	0.5µl dNTPs	95°C 2 m
2.5µl buffer 10X	X30 c	2.5µl buffer 10X	X20 c	2.5µl buffer 10X	X30 c
0.3µl HiFi	95°C 20 s	0.3µl HiFi	95°C 20 s	0.3µl HiFi	95°C 20 s
1.0µl Up-oligo	60°C 30 s	1.0µl PCR1 ^a	62°C 30 s	1.0µl Up1-oligo	60°C 30 s
1.0µl Lw-oligo	68°C 1 m/kb	1.0µl PCR2 ^a	60°C 30 s	1.0µl Lw2-oligo	68°C 1 m/kb
1.0µl ADN	68°C 5 m	19.7µl H ₂ O	58°C 30 s	2.5µl PCR*	68°C 5 m
19.7µl H ₂ O			68°C 1 m/kb	17.2µl H ₂ O	
			68°C 5 m		

^aRegiones que flanquean río arriba (PCR1) y abajo (PCR2)

c, ciclos; m, minuto; s, segundo

*Producto del PCR de extensión por solapamiento

El producto fusionado se clonó en el vector de clonación pJET1.2/blunt (Thermo Scientific™) y se secuenció para confirmar que los productos fusionados se hayan obtenido de manera correcta. Los fragmentos que llevan la delección del gen en cuestión, se subclonaron en el plásmido suicida pK**mobsacB* (Schäfer et al., 1994) obteniendo los plásmidos pK::ΔCH00514, pK::ΔCH02128, pK::ΔCH02413, pK::ΔCH02577, pK::ΔCH03587 y pK::ΔPC57.

3.6.2 Fusiones transcripcionales con el gen reportero *uidA*

Para construir fusiones transcripcionales, las regiones regulatorias de los genes fueron clonados en el plásmido pBBMCS53 que contiene el gen *uidA* (GUS) sin promotor (Girard et al., 2000). La región intergénica de los genes *RetPC57* - *RetPC56* se obtuvo por PCR utilizando los oligonucleótidos Up-PC57gus y Lw-PC57gus. El producto de 928 pb se clonó en el vector de clonación pCR2.1 TOPO (Invitrogen). Los sitios de restricción *EcoRI* se usaron para clonar la región intergénica en ambas direcciones en el plásmido pBBMCS53. La orientación correcta de los fragmentos en el plásmido se verificó por PCR utilizando el oligonucleótido p53lw y el oligonucleótido “upper” (Up) de cada gen.

Para construir la fusión transcripcional *RetPC58::uidA* se utilizaron los oligonucleótidos Up-PC57gus y Lw-PC58gus para obtener un producto de PCR de 1393 pb el cuál lleva el nt 56179 del extremo 3' del gen *RetPC57* y el nt 56700 del gen *RetPC58*. El producto se clonó en el vector pCR2.1 TOPO (Invitrogen). Un fragmento *EcoRI-XhoI* de 528 pb se clonó en el vector pBBMCS53 para obtener el plásmido pPC58-gus.

El plásmido pnodTc-gus se construyó a partir de un producto de PCR de 1200 pb con los oligonucleótidos Up-nodTcgus y Lw-nodTcgus, y se clonó en el plásmido pBBMCS53 con los sitios de restricción *SacI-SalI*.

3.6.3 Plásmidos de expresión de genes bajo el control de un promotor inducible por cumato

El plásmido que expresa el gen *RetPC57* bajo el promotor inducible por cumato ($P_{R/cmtO}$), se obtuvo al clonar la región codificante de *RetPC57* en el vector pLC290 (Chubiz et al., 2013). Para ello, se utilizaron los oligonucleótidos Up-QPC57 y Lw-QPC57 para amplificar un producto de 711 pb por PCR. El producto se clonó en el vector pJET1.2/blunt (Thermo Scientific™) y se secuenció. El fragmento se subclonó en el plásmido pLC290 usando los sitios de restricción *XbaI-SpeI* introducidos por los oligonucleótidos, para obtener el plásmido pQPC57.

3.6.4 Plásmidos para complementación de fenotipos

Para construir los plásmidos que expresan el gen *RetPC57* a partir de su promotor nativo, obtuvimos por PCR un producto de 1,095 pb con los oligonucleótidos Up-PC57-cpl y Lw-PC57-cpl. El producto se clonó en el vector pJET1.2/blunt (Thermo Scientific™) y se secuenció. El fragmento *NsiI-XhoI* se subclonó en los plásmidos pFAJ1700 (Dombrecht et al., 2001) y pGUS (pFAJ1700/placZ::uidA, Isidra-Arellano et al., 2018) para generar los plásmidos pPC57 y pGUS-pc57, respectivamente.

3.6.5 Plásmidos de expresión de proteínas recombinantes con etiquetas His₆

El plásmido pET28a se utilizó para la expresión heteróloga y purificación de las proteínas RetPC57 y RetPC58 en un fondo genético de *E. coli* BL21. El plásmido pET28a::PC57 se obtuvo clonando la región codificante del gen *RetPC57* a partir de un producto de PCR de 693 pb usando los oligonucleótidos Up-PC57p y Lw-PC57p. El producto se clonó en el vector pCR2.1 TOPO (Invitrogen) y se secuenció. Posteriormente, se clonó en el vector pET28a con los sitios de restricción *NdeI*-*SalI* introducidos por los oligonucleótidos.

El plásmido pET28a::PC58 contiene la región que codifica el dominio histidina-quinasa (HK) del RetPC58 (pRet42c 56824 - pRet42c 57682). El fragmento de 859 pb se obtuvo por PCR usando los oligonucleótidos Up-HKPC58p y Lw-PC58p. El fragmento *NdeI*-*SalI* (sitios de restricción introducidos por los oligonucleótidos) se clonó en el vector pET28a.

3.7 Obtención de mutantes derivadas de *Rhizobium etli* CE3

La transferencia conjugativa de plásmidos de *E. coli* a *R. etli* se realizó mediante cruces triparentales utilizando el plásmido pRK2013 (Figurski and Helinski, 1979) como auxiliar de la conjugación.

La delección de los genes *RHE_CH000514*, *RHE_CH02128*, *RHE_CH02413*, *RHE_CH02577*, *RHE_CH03587* y *RetPC57* en la cepa de *R. etli* CE3 se llevó a cabo mediante homogenización, utilizando como marcador el gen *sacB* presente en el vector pK*mobsacB. Se utilizaron como donadoras las cepas de *E. coli* DH5 α que llevan los plásmidos pK:: Δ CH00514, pK:: Δ CH02128, pK:: Δ CH02413, pK:: Δ CH02577, pK:: Δ CH03587 y pK:: Δ PC57. Las dobles recombinantes se seleccionaron como transconjugantes Sac^R (sacarosa 10%), Sm^R y Km^S. Para confirmar la pérdida del gen correspondiente, se realizaron reacciones de PCR utilizando oligonucleótidos específicos para cada uno. También se utilizaron geles tipo Eckhardt (modificado de Hynes and McGregor, 1990) para verificar la ausencia de rearrreglos genómicos en las cepas seleccionadas.

Las cepas de *R. etli* WT/pLC290, WT/pQPC57, WT/pPC57-gus, WT/pPC56-gus, WT/pPC58-gus, WT/pnodTc-gus, WT/pPC57-gus/pLC290, WT/pPC57-gus/pQPC57, WT/pPC56-gus/pQPC57, WT/pnodTc-gus/pQPC57, WT/pFAJ1700, WT/pGUS, Δ RetPC57/pGUS, Δ RetPC57/pPC57 y Δ RetPC57/pGUS-pc57 se obtuvieron mediante cruces triparentales utilizando las cepas de *E. coli* DH5 α que llevan los plásmidos pLC290, pQPC57, pPC57-gus, pPC56-gus, pPC58-gus, pnodTc-gus, pFAJ1700, pGUS, pPC57 o pGUS-pc57. Las cruces derivadas fueron seleccionadas de acuerdo con la respectiva resistencia a antibióticos del plásmido (Tabla 3.1). Los perfiles de plásmidos fueron analizados por Eckhardt (modificado de Hynes and McGregor, 1990).

3.8 Ensayos de motilidad por nado de *R. etli*

Los ensayos de motilidad por nado se realizaron en cajas de Petri con agar suave al 0.3% (Difco™ Agar Noble) en medio PY. Las cajas se secaron por 15 min en la campana de flujo laminar y después se pasaron a 14°C por 30 min. Utilizamos 1.2 µl de cultivos crecidos en medio PY sin antibiótico hasta una OD₅₄₀ de 0.7 (Daniels et al., 2006). A los 7 días de incubación a 30°C se midió el diámetro del halo de motilidad y se tomaron fotografías en un analizador de imágenes (GeneSnap-Syngene) que utiliza una videocámara acoplada a un sistema de impresión de imágenes.

3.9 Análisis de flagelos por microscopía electrónica de transmisión

Para observar los flagelos de *R. etli* se utilizó la técnica de tinción negativa. Gotas de 5 µl de un cultivo aeróbico crecido en medio PY se colocaron sobre parafilm. Una rejilla de soporte Formvar/Carbon (malla de 200, SPI) se colocó arriba de la gota. El exceso de muestra se removió con papel filtro. Posteriormente, se realizó la tinción negativa con 5 µl de 2% de acetato de uranilo por 1 min. El exceso de uranilo se removió con papel filtro. Las rejillas con las muestras se dejaron secar por 5 min. Las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico de transmisión (TEM Zeiss Libra 120) con un voltaje de aceleración de 80 Kv acoplado a una cámara digital MultiScan Gatan 794. Las imágenes fueron analizadas usando el programa ImageJ v1.52. Este experimento se realizó en la Unidad de Microscopía Electrónica a cargo de la Dra. Guadalupe Zavala del Instituto de Biotecnología, UNAM.

3.10 Formación de biofilm

La formación de biofilm se evaluó en placas de vinil con fondo “U” de 96 pozos (Seroclustler™ COSTAR) usando el protocolo reportado por Reyes-Pérez et al. (2016). 100 µl de medio rico PY fueron inoculados con cultivos frescos crecidos en medio rico PY a una D.O.₅₄₀ de 0.05. Las placas se incubaron a 30°C sin agitación. Después de 48 horas, las células no adheridas fueron eliminadas con lavados de agua destilada. El biofilm adherido se tiñó con 150 µl de cristal violeta (CV, 1%) por 15 min a temperatura ambiente (TA). Se realizaron lavados con agua destilada sobre las placas con CV hasta que el agua está libre de CV, y se dejan secar a TA. Para cuantificar la cantidad de CV unido al biofilm se agregaron 150 µl de etanol (95%) en cada pozo, y se incubaron por 30 min sin agitación a TA. La D.O. a 600 nm se midió en un lector de placas (EPOCH 2, BioTek Instruments, BioTek Instruments, Inc.) (Stepanovic et al., 2007).

3.11 Ensayo de actividad específica de β-glucuronidasa

La actividad específica de β-glucuronidasa se determinó en cultivos aeróbicos de las cepas de *R. etli* que llevan fusiones transcripcionales (pPC57gus, pPC58gus, pPC56gus,

pnodTcgus), y en las cepas de *R. etli* que llevan plásmidos que expresan constitutivamente el gen *uidA* (pGUS, pGUS-pc57) siguiendo el protocolo descrito por Girard et al. (2000). La cuantificación de la actividad GUS se determinó por un método colorimétrico a partir de muestras de 3.0 ml. Las muestras se centrifugaron a 4°C, y la pastilla celular se resuspendió en 1 ml de solución MM-salts (MgSO₄·7H₂O 0.1 g/L, K₂HPO₄ 0.22 g/L) suplementado con cloranfenicol, 100 µg/ml. El 4-nitrofenil β-D-glucurónido se usó como sustrato, el cual al ser hidrolizado por la β-glucuronidasa desarrolla un color amarillo. Las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro (T60 Vis Spectrophotometer PG Instruments) a una DO₄₀₅. Los datos se normalizaron con respecto a la concentración total de proteína utilizando un segundo juego de muestras de 3.0 ml, utilizando el kit BCA Protein Assay (Thermo Scientific Pierce), la DO de las muestras se obtuvo en un lector de placa (EPOCH 2, BioTek Instruments, BioTek Instruments, Inc.) a 405 nm. La actividad específica se reporta como nanomoles de producto por min por mg de proteína.

3.12 Experimento de simbiosis frijol-*Rhizobium*

3.12.1 Esterilización de semillas de frijol y germinación

Para su esterilización las semillas de *Phaseolus vulgaris* bv. Negro Jamapa se sumergen en alcohol etílico durante 30 s. Se deshecha el alcohol y se agrega una solución de cloro comercial durante 5-7 min. Se deshecha el cloro y se lavan las semillas con agua abundante estéril. Las semillas esterilizadas se colocan en una charola de aluminio inoxidable con un papel absorbente estéril mojado con agua estéril. La charola se cubre con papel aluminio y las semillas se incuban en la obscuridad 30°C durante 2 días para su germinación.

3.12.2 Preparación de inóculos bacterianos

Los inóculos bacterianos se preparan a partir de bacteria crecidas en medio rico sólido. El crecimiento bacteriano se recoge con un asa de vidrio estéril con ayuda de medio de cultivo líquido sin antibióticos. La suspensión bacteriana se utiliza a una DO₅₄₀=2 para inocular las semillas.

3.12.3 Cultivo de planta de frijol en hidroponía

El cultivo de plantas en condiciones de hidroponía se llevó a cabo en charolas que contienen 8 L de solución nutritiva Fahreus sin nitrógeno (Fåhraeus, 1957). Las charolas se lavan con cloro y agua. Las semillas germinadas se colocan sobre charolas de germinación en condiciones de esterilidad y se inoculan con 1 ml del inóculo bacteriano correspondiente. Aproximadamente se colocan 20 plantas por charola. Se cultivan por 21 días en un invernadero con condiciones controladas para el cultivo de plantas (25°C-27°C, humedad relativa de 70% e iluminación natural). Para el análisis fenotípico, se recolecta el material para determinar el peso seco de parte aérea de la planta, número de nódulos, peso seco de

nódulo y la actividad de la nitrogenasa. El peso seco de la parte aérea y de los nódulos se determina después de secar el material en un horno a 60°C durante 2 días.

3.12.4 Cultivo de planta de frijol en bolsas de germinación

Las bolsas de germinación (CYG™) se esterilizan 10 min con luz UV. Posteriormente se ponen 10 ml de agua estéril en el interior de cada bolsa y se esterilizan en autoclave a 120°C durante 30 min. En condiciones de esterilidad se coloca una semilla en cada bolsa de germinación y se inocula con 1 ml del inóculo bacteriano correspondiente. Cada 2-3 días, se agregan 10 ml de solución nutritiva Fahreus sin nitrógeno. Se mantienen en el invernadero con condiciones controladas (ciclo luz/oscuridad 14/10h, 22°C/16°C, humedad relativa de 60-70%). Los datos de cinética de nodulación, se obtiene contabilizando diariamente el número de nódulos a partir del día 7 y hasta 30 días de post inoculación (dpi). Para determinar el número de nódulos, peso seco de nódulo y medir la actividad específica de la nitrogenasa se colecta el material de seis plantas a los 21 dpi. El contenido de leghemoglobina en los nódulos se determinó a los 21, 25 y 30 dpi en tres plantas cada día.

3.12.5 Cultivo de planta para el análisis de expresión de genes

El análisis de expresión de genes bacterianos y vegetales que participan en las etapas tempranas del proceso de infección se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por Nova-Franco et al. (2015). Semillas germinadas seleccionadas se colocan en cajas de Petri cuadradas (24 cm x 24 cm, Corning) con solución nutritiva Fahreus -agar (1%) y se incuban a 25°C, con un ciclo de 16/8 h luz/oscuridad y 70% de humedad relativa. Cada semilla se inocula con 1 ml de cultivo bacteriano de la cepa correspondiente. Después de 1 dpi, la zona de la raíz susceptible a la infección de *Rhizobium* fue separada, congelada en nitrógeno líquido y guardado a -80°C hasta su uso.

Para evaluar la expresión de genes que inducen la nodulación y la fijación simbiótica de nitrógeno, las semillas germinadas seleccionadas se trasplantaron al sistema de hidroponía y se inocularon como se menciona en el apartado 3.12.3. Después de 9 dpi, se colectaron raíces de 12 plantas; a los 21 dpi, los nódulos se separaron de la raíz y se colectaron por separado. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C hasta su uso.

3.12.6 Actividad reductora de acetileno

La actividad reductora de acetileno (ARA) se midió siguiendo el protocolo de Hardy et al. (1968). En botellas de 125 ml se colocan las raíces individualmente y se cierran con un tapón aislante. A cada botella se le inyectan 2.5 ml de acetileno. Después de los 60 y 120 min, se toman 0.4 ml de muestra de cada botella y se mide la cantidad de etileno convertido

usando un cromatógrafo de gases (Varian 3300). El cálculo de actividad específica de nitrogenasa para cada muestra se calibró con el peso seco de nódulo.

3.12.7 Contenido de leghemoglobina en nódulos de frijol

El contenido de Lb de los nódulos se determinó mediante fluorimetría de acuerdo al protocolo de LaRue and Child (1979). 0.3g de nódulos frescos se homogenizan en 5 ml de buffer de extracción de leghemoglobina ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}/\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 50 mM pH 7,4; ferricianida potásica [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] 0,02% y NaH_2CO_3 0,1%) suplementado con 10% de polivinilpirrolidona (PVPP) y se centrifuga a 14000 rpm a 4°C por 20 min. Se tomar alícuotas de 50 μl del sobrenadante y se adiciona 3.15 ml de ácido oxálico al 16.6%. las muestras se incuban a 120°C durante 30 min en autoclave. Una alícuota de extracto sin incubar se incluye como blanco.

La emisión de fluorescencia se cuantifica en un lector de placas (Synergy™ H1, BioTek Instruments, Inc.) a una longitud de onda de excitación de 405 nm y de emisión de 600 nm. La diferencia en la emisión de fluorescencia entre las muestras incubadas y su correspondiente blanco es proporcional a la concentración de Lb de las mismas.

3.12.8 Adhesión a raíz y deformación de pelos radicales

Semillas germinadas seleccionadas se colocan en cajas de Petri con solución nutritiva Fahreus –agar (Catoira et al., 2000) y se inoculan con 1 ml de cultivo bacteriano de la cepa correspondiente ($\text{DO}_{540}=0.3$). Después de 4 y 6 dpi, la zona de la raíz susceptible de infección por *Rhizobium* se colecta para hacer tinción de GUS. Las muestras se sumergen en la solución de tinción de GUS (0.05% ácido 5-bromo-4chloro-3-indolxyl-B-D-glucuronic (X-gluc), 100mM buffer de fosfato de sodio pH 7, 0.05 mM ferrocianuro de potasio, 0.5 mM de ferricianuro de potasio, 10 mM Na_2EDTA y 0.01% Triton X-100) por 3 horas a 37°C (Isidra-Arellano et al., 2018). Para evaluar la adhesión de *Rhizobium* a la raíz de frijol, las zonas susceptibles que mostraron una coloración azul fueron fotografiadas utilizando un estereomicroscopio de campo claro SZX10 (Olympus) equipado con una cámara Olympus UC50 (Olympus). Para cuantificar el número de eventos de deformación de pelos radicales inducidos por *Rhizobium*, las zonas susceptibles de la raíz se examinaron en un microscopio de campo claro (Velaquin) equipado con una cámara digital de 18 megapíxeles con un sensor Aptina CMOS (Velaquin). Para estos experimentos, se realizaron cuatro replicas biológicas y cada una con seis raíces.

3.12.9 Histología de nódulos

Los nódulos fueron preparados de acuerdo a Reyero-Saavedra et al. (2017). Para las imágenes, secciones semi-delgadas (25 μM) de 10 nódulos de cada cepa fueron extraídos a los 21 dpi. Las secciones se tiñeron por 5 min en una solución de safranina en 50% de

etanol y embebidas en resina LW-White. Tres secciones por nódulo fueron examinadas en el microscopio Zeiss AX10 acoplado a una cámara digital de color Zeiss Axiocam 503 (Carl Zeiss). Las imágenes fueron procesadas y analizadas usando el programa ImageJ v1.52.

3.13 Análisis de expresión

3.13.1 Purificación de RNA de cultivos bacterianos

ARN total de la cepa WT y de la mutante Δ RetPC57 fue purificado de un cultivo aeróbico de 60 ml (condiciones descritas en el apartado 3.2). Después de 6 horas de crecimiento, las muestras se centrifugan a 10,000 rpm por 5 min a 4°C, la pastilla celular se conserva a -80°C hasta su uso. Para llevar a cabo la purificación de ARN, la pastilla celular se descongela en 100 μ l de buffer TE 1% (10 mM TRIS – 1 mM EDTA en agua DEPC 0.1%). Se adicionan 5 μ l de lisozima (20 mg/ml en DEPC 0.15) para que se lleve a cabo la lisis enzimática y se incuba 5 min a 37°C. Posteriormente, se agregan 1.5 μ l de Proteinasa K (Thermo Scientific) y se incuba 3 min a 37°C. Para la purificación de ARN se utilizó el kit RNeasy^R Mini (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ARN se obtuvo usando un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fischer Scientific, Inc) y se visualizó en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes (0.75 g de agarosa, 36 ml H₂O DEPC 0.1%, 5 ml MOPS 10%, 9 ml formaldehído). El ADN genómico fue eliminado del ARN usando la enzima DNaseI RNase-free (Thermo Fischer Scientific, Inc) en presencia del inhibidor de ribonucleasas (RiboLockTM RNase inhibitor, thermo Fischer Scientific, Inc). La ausencia de ADN genómico se confirmó por PCR usando oligonucleótidos específicos para el gen reportero *rpoA* (Tabla 3.2).

3.13.2 Purificación de ARN vegetal (raíces y nódulos)

ARN total de raíces y nódulos de *P. vulgaris* de 1, 9 y 21 dpi inoculadas con las cepas WT y Δ RetPC57 se purificó a partir de 250 mg de raíz o 100 mg de nódulo. Se utilizó el protocolo modificado de TRizolTM (Thermo Fischer Scientific, Inc). La concentración de ARN se obtuvo usando el espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fischer Scientific, Inc) y se visualizó en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes (formaldehído). La limpieza del ARN se realizó a partir de 2 μ g de ARN usando la enzima DNaseI RNase-free (Thermo Fischer Scientific, Inc) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

3.13.3 Síntesis de ADN complementario

El ADNc fue sintetizado a partir de 2 μ g de ARN limpio usando el kit RevertAidTMH Minus First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la síntesis de ADNc bacteriano se utilizó una mezcla de oligonucleótidos (Random Hexamer Primer) y para la síntesis de ADNc vegetal se usó el Primer Oligo(dT)₁₈ incluido en el kit.

3.13.4 Análisis cuantitativo de expresión génica

El nivel de expresión de los genes fue cuantificado por qRT-PCR usando el equipo CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad). La enzima Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fischer Scientific, Inc) se utilizó para las reacciones de PCR usando el protocolo de ciclo térmico de dos pasos de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El nivel de expresión de los diferentes genes fue calculado por el método $\Delta\Delta C_t$. Los genes endógenos usados para la normalización de la expresión de genes vegetales y bacterianos fueron la ubiquitina *UBC9* y *rpoA*, respectivamente. La expresión de cada gen fue determinada de tres réplicas en tres muestras independientes.

3.14 RT-PCR del operón *RetPC57-RetPC58*

El ADNc de la cepa WT fue usado como templado para obtener tres productos de RT-PCR. Dos amplificaciones de 250 pb correspondiente a los genes *RetPC57* y *RepPC58* usando los oligonucleótidos Up-*RetPC57*- Lw-*RetPC57*, Up-*RetPC58* - Lw-*RetPC58*, respectivamente, y una amplificación de 945 pb usando los oligonucleótidos Up-*RetPC57* y Lw-*PC58*gus. Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en geles de agarosa con bromuro de etidio y fueron capturados usando un sistema de imagen con cámara acoplada (SmartView Pro UVC-1100 Major Science).

3.15 Fosforilación de proteínas *in vitro*

3.15.1 Purificación de proteínas recombinantes His₆-HKPC58 y His₆-RetPC57

Los plásmidos pET28a::PC58 y pET28a::PC57 se utilizaron para sobreexpresar las proteínas recombinantes His₆-HKPC58 y His₆-RetPC57 en el fondo genético de *E. coli* BL21 (DE3). La sobreexpresión se logró induciendo los cultivos en medio LB (DO₆₆₀=0.5) con 0.5 mM de IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) por 16 h a 18°C. Las células se colectaron por centrifugación a 4°C y se guardaron a -80°C hasta la purificación de la proteína. Las células se resuspendieron en 30 ml de amortiguador de lisis A (Tris 30 mM, NaCl 300 mM, Imidazole 10 mM, Glicerol 10%, pH 8) suplementado con una tableta de inhibidor de proteasa libre de EDTA (Roche Diagnostic). Las células se lisaron tres veces por prensa francesa a una presión de 1,500 psi. Se centrifugaron las muestras a 20,000 x g por 1 h a 4°C y la fracción soluble se filtró (0.22 μM). La purificación de la proteína se realizó por cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad usando el equipo AKTA™ Start (GE Healthcare Life Science) y una columna de níquel de 5 ml HisTrap™ HP (Amersham Bioscience). Antes de pasar la fracción soluble, la columna se equilibró con 5 volúmenes de amortiguador de lisis A. Posteriormente, se pasó la fracción soluble por la columna, y finalmente con un gradiente de concentración de imidazol de 10 a 500 mM usando el amortiguador de lisis A y B (Tris 30 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 500 mM, Glicerol 10%, pH

8), y la proteína se recuperó en tubos de ensayo. Se analizó por geles de SDS-PAGE y la concentración de la proteína se determinó por Bradford.

3.15.2 Ensayo de fosforilación *in vitro*

Los ensayos de fosforilación se hicieron a temperatura ambiente, usando 200 μM de ATP que contienen 10 μCi de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$. Para determinar la funcionalidad de la quinasa HKPC58 y determinar el tiempo en que se va a adicionar el regulador de respuesta, se realizaron ensayos de autofosforilación de la proteína purificada His6-HKRetPC58 adicionando $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$. Después de diferentes intervalos de tiempo, se tomaron alícuotas de 15 μl de la reacción, se añadió buffer 2X SDS (Sambrook and Rusell, 2001) y se corrió en un gel SDS-PAGE. Los geles se secaron sobre un papel filtro y se puso en contacto con una película fotográfica por dos días. Se reveló en un phosphorimager con el programa Quantity One de Bio-Rad.

Los ensayos de transfosforilación se realizaron con una concentración final de 25 μM de las proteínas purificadas His6-HKPC58 y His6-RetPC57. Primero, se autofosforiló por 120 min His6-HKPC58 con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ y después se añadió His6-RetPC57 a la reacción. Después de diferentes intervalos de tiempo, se tomaron alícuotas de 15 μl de la reacción, se añadió tampón 2X SDS (Sambrook and Rusell, 2001) y se corrió en un gel SDS-PAGE. Los geles se secaron sobre un papel filtro y se puso en contacto con una película fotográfica por 2 días. Se reveló en un phosphorimager con el programa Quantity One de Bio-Rad.

3.16 Ortología, filogenia y análisis comparativo del contexto genómico de RetPC57

Los ortólogos y el porcentaje de identidad de los genes *RHE_PC00055*, *RHE_PC00056*, *RHE_PC00057*, *RHE_PC00058* y *RHE_PC00059* fueron obtenidos con el programa OMA browser (Altenhoff et al., 2018) y de la sección “Sequence Similarity Data Base” (SSDB) de KEGG. Las secuencias de las proteínas de los genes ortólogos fueron recolectadas de la base datos UniProt. Se realizó un alineamiento múltiple de secuencias usando CLUSTALW con BLOSUM como matriz de peso (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>). Para la visualización y manipulación del árbol filogenético se utilizó el programa Interactive Tree of Life (iTOL; <https://itol.embl.de>; Letunic and Bork, 2019). El análisis comparativo del contexto genómico de los ortólogos se realizó usando las bases de datos Integrated Microbial Genomes (IMG; <https://img.jgi.doe.gov/help.html>; Chen et al., 2019).

3.17 Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos fueron analizados por la prueba de t-Student usando el programa GraphPad Prism 7.0a. Las diferencias fueron estadísticamente significativas cuando el valor de P es menor a 0.05 ($P \leq 0.05$).

4. Resultados

4.1 Análisis fenotípico de mutantes OmpR/PhoB de *R. etli* CE3

De acuerdo con la base de datos MiST3.0, el genoma de *R. etli* CE3 codifica dieciocho reguladores que pertenecen a la familia OmpR/PhoB. Sin embargo, solamente FxkR y VirG han sido caracterizados previamente, quedando por determinar el papel funcional del resto (Bittinger et al., 2000; Zamorano-Sánchez et al., 2012; Lacroix and Citovsky, 2016; Wang et al., 2017). Nuestro análisis bioinformático de matriz de ortología ("OMA browser", Altenhoff et al., 2018) entre las especies *A. tumefaciens* C58, *R. etli* CFN42, *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 y *S. meliloti* 1021 revela que entre estas cuatro especies rizobiales se comparten once reguladores de la familia OmpR/PhoB. En siete de ellos se ha determinado su función (descrita en el apartado de introducción de esta Tesis); mientras que los restantes tienen funciones menos predecibles (Tabla 4.1)

Tabla 4.1. Análisis de ortología de los reguladores de la familia OmpR/PhoB de *R. etli* CFN42 (Ret) en los genomas de *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 (Rleg), *S. meliloti* 1021 (Smel), *A. tumefaciens* C58 (Atu), *E. coli* K12 (Eco). El análisis se realizó utilizando el programa "OMA browser" (Altenhoff et al., 2018).

Ret	Rle	Sme	Atu	Eco	Descripción general
RHE_CH00036	RL0036*	SMc02560*	Atu0034*		ChvI. Producción de polisacáridos
RHE_CH00514	RL0547	SMc02140*	Atu0425*	PhoB*	PhoB. Limitación de Pi
RHE_CH00678	RL0727*	SMc03046*	Atu0573		Rem. Motilidad
RHE_CH01043	RL1157		Atu0629		
RHE_CH01286	RL1433	SMc00458*	Atu0970		FeuP. Exportador de β -glucano
RHE_CH01294	RL1441	SMc02366	Atu0978		
RHE_CH02128	RL2277		Atu4782		
RHE_CH02413	RL2739	SMb20219			
RHE_CH02577	RL2973	SMb21210	Atu4638		
RHE_CH03010	RL3454	SMc01593	Atu2206		
RHE_CH03334	RL3758	SMc00654*	Atu2434*		CtrA. Ciclo celular
RHE_CH03587	RL4107	SMb20722	Atu2466		
RHE_CH03968	RL4559	SMc03820	Atu2763		
RHE_PA00053*			Atu6178*		VirG. Transferencia de ADN
RHE_PC00057	pRL100288			CpxR*	CpxR. Respuesta a estrés en la membrana
RHE_PE00262	pRL110377*	SMa2325*	Atu3786	KdpE*	KdpE. Limitación de K
RHE_PF00311	pRL120667	SMb21210			
RHE_PF00530*	pRL90026*	SMb21561*			FxkR. Fijación de N ₂

(*) indica que la proteína ha sido caracterizada en ese organismo.

Por lo tanto, inicialmente nos enfocamos en un subgrupo de reguladores OmpR/PhoB con función desconocida en rhizobia. Para ello, construimos seis mutantes de *R. etli* CE3 en las cuales eliminamos por delección individual los genes *RHE_CH00514*, *RHE_CH02128*, *RHE_CH02413*, *RHE_CH02577*, *RHE_CH03587* y *RHE_PC00057* (ver detalles en material y métodos) y analizamos los fenotipos relacionados con la interacción entre *R. etli* y frijol, como son la motilidad, la formación de biofilm, la nodulación y la fijación de nitrógeno.

Motilidad

La motilidad es un mecanismo bacteriano que le permite a las poblaciones bacterianas alcanzar y colonizar rápidamente nuevos nichos. Los rhizobia son bacterias móviles que por quimiotaxis pueden dirigirse hacia diversos compuestos que se encuentran en la rizosfera (Vicario et al., 2015; Zheng et al., 2015; Wheatley and Poole, 2018). Dada la importancia de este mecanismo para la colonización de las raíces de las leguminosas, evaluamos la

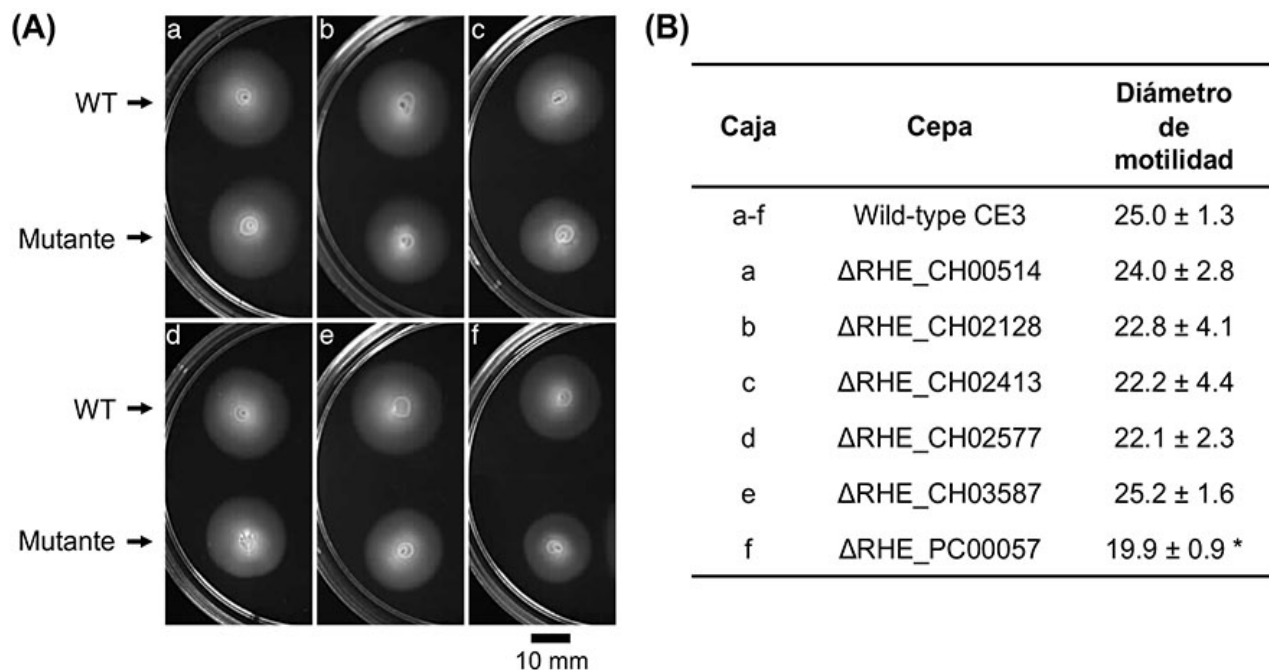


Figura 4.1 El regulador OmpR/PhoB RHE_PC00057 participa en la motilidad de *R. etli*. Cajas de PY con agar al 0.3% fueron inoculados con 1.2 μl del cultivo correspondiente ajustado a una D.O.₅₄₀=0.7 e incubados a 30°C por 7 días. **(A)** Imágenes representativas de cajas de motilidad. En la caja, la parte superior corresponde a la cepa WT y la gota inferior a las cepas mutantes en los reguladores OmpR/PhoB. a, ΔRHE_CH00514; b, ΔRHE_CH02128; c, ΔRHE_CH02413; d, ΔRHE_CH02577; e, ΔRHE_CH03587; f, ΔRHE_PC00057. **(B)** Diámetro del halo de motilidad expresado en mm ± desviación estándar. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes con dos réplicas cada uno d (*) diferencia significativa comparada con los valores de raíces inoculadas con la WT ($P \leq 0.05$, prueba t-student).

motilidad por nado (“swimming”) de las mutantes $\Delta RHE_CH00514$, $\Delta RHE_CH02128$, $\Delta RHE_CH02413$,

$\Delta RHE_CH02577$, $\Delta RHE_CH03587$ y $\Delta RHE_PC00057$ de *R. etli* CE3 en cajas de Petri con agar suave al 0.3% de cultivos frescos en medio rico PY. Después de 7 días de incubación, observamos que únicamente la ausencia del gen *RHE_PC00057* afecta negativamente la motilidad de la bacteria comparado con la cepa silvestre (WT). Como se muestra en la figura 4.1, esta mutante muestra un halo de migración menor que la WT indicando que la mutante $\Delta RHE_PC00057$ es menos mótil que la WT. Este resultado sugiere que el regulador *RHE_PC00057* tiene un papel en la motilidad de *R. etli* CE3.

Con el objetivo de definir si el fenotipo de menor motilidad que presenta la mutante $\Delta RHE_PC00057$ se debe a un efecto en la síntesis o el ensamblaje de los flagelos, analizamos cultivos frescos de las cepas WT y $\Delta RHE_PC00057$ por microscopía electrónica de transmisión (TEM). No encontramos diferencia entre la cepa WT y $\Delta RHE_PC00057$. En ambas cepas observamos entre 1 y 4 flagelos, con un promedio de longitud de flagelo de $2.55 \mu\text{m} \pm 0.84 \mu\text{m}$ en la WT y de $2.69 \mu\text{m} \pm 1.53 \mu\text{m}$ en la mutante $\Delta RHE_PC00057$.

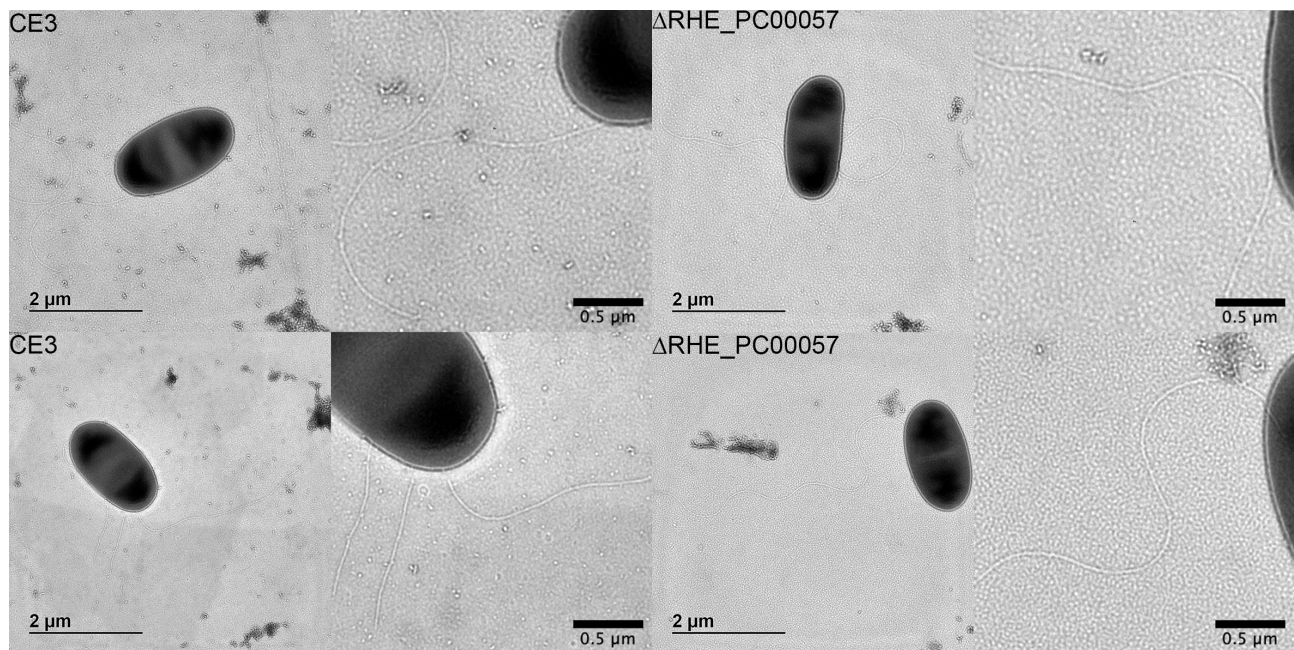


Figura 4.2 Microscopía electrónica de transmisión de flagelos de *R. etli*. Células de cultivos frescos en medio rico PY de las cepas WT y $\Delta RHE_PC00057$ teñidas con 2% de acetato de uranilo. Las imágenes se captaron con una cámara digital MultiScan Gatan 794 acoplada al microscopio y se analizaron con el programa ImageJ. Las imágenes de la derecha son un acercamiento de los flagelos de las imágenes del lado izquierdo.

Biofilm

El biofilm es una comunidad bacteriana rodeada de una matriz extracelular de polisacáridos que juega un papel importante para la supervivencia de las bacterias en ambientes de estrés. Los factores esenciales para la formación del biofilm son los EPS, LPS, el flagelo, así como los sistemas de señalización. En el suelo, los rhizobia enfrentan tanto un ambiente rico en nutrientes y exudados fenólicos, como también suelos deficientes en nitrógeno, fosfatos, agua y nutrientes. La formación del biofilm en las raíces de las leguminosas es esencial para la colonización y establecimiento de la simbiosis fijadora de nitrógeno (Rinaudi and Giordano, 2010; Poole et al., 2018). De acuerdo con lo anterior, evaluamos la formación de biofilm de las mutantes $\Delta RHE_CH00514$, $\Delta RHE_CH02128$, $\Delta RHE_CH02413$, $\Delta RHE_CH02577$, $\Delta RHE_CH03587$ y $\Delta RHE_PC00057$ de *R. etli* CE3 en placas de 96 pozos (ver detalles en material y métodos) con medio rico PY. Después de 48 horas, mediante la técnica con tinción de cristal violeta, observamos que la ausencia de los genes *ompR* estudiados no afecta la formación de biofilm comparado con la WT (Figura 4.3).

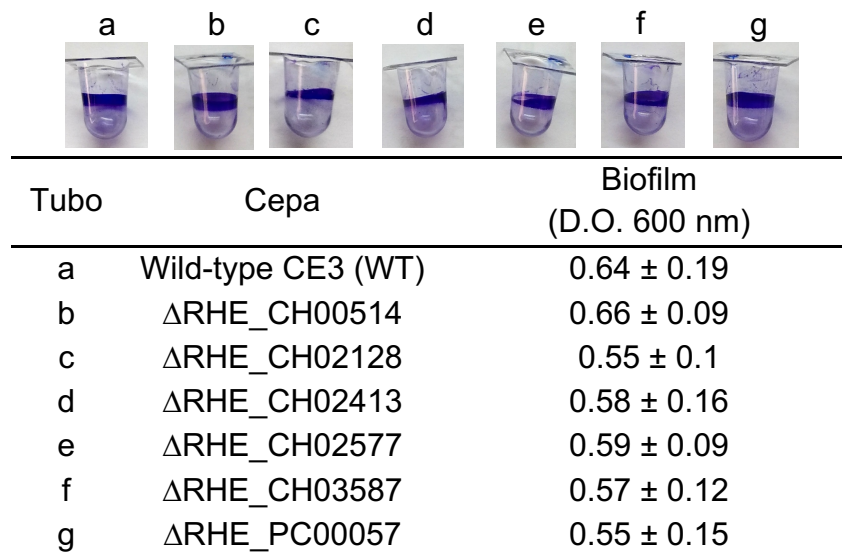


Figura 4.3 Formación de biofilm por mutantes OmpR/PhoB de *R. etli*. Placas de 96 pozos con medio rico PY fueron inoculados con un cultivo fresco correspondiente a cada cepa a analizar, ajustado a una $D.O._{540}=0.05$ e incubados a 30°C por 48 horas sin agitación. Imágenes representativas de tubos PVC con el biofilm formado teñido con cristal violeta. (a – g) Imágenes representativas del ensayo en la cepa WT (a) y la mutante correspondiente a cada regulador OmpR/PhoB. b, $\Delta RHE_CH00514$; c, $\Delta RHE_CH02128$; d, $\Delta RHE_CH02413$; e, $\Delta RHE_CH02577$; f, $\Delta RHE_CH03587$; g, $\Delta RHE_PC00057$. La tabla representa la cuantificación por densidad óptica (D.O.) del cristal violeta adherido al biofilm formado por cada cepa, D.O. ± desviación estándar. Los datos representan el promedio de dos réplicas con tres experimentos independientes.

Nodulación y fijación de nitrógeno

La habilidad para inducir nodulación y fijar nitrógeno de algunas de nuestras mutantes en genes *ompR/phoB* fue evaluada en plantas de frijol. Semillas de *P. vulgaris* variedad Negro Jamapa fueron inoculadas con la cepa WT, o con las mutantes Δ RHE_CH02128, Δ RHE_CH02413, Δ RHE_CH03587 o Δ RHE_PC00057, y cultivadas por 21 días en hidroponía con solución nutritiva Fahreus. Cada asociación simbiótica fue analizada por número de nódulos por planta (NN), peso seco de nódulos por planta (PSN), peso seco de planta (PSP) y actividad reductora de acetileno (ARA) (tabla 4.2). En comparación con los fenotipos observados en las plantas inoculadas con la cepa WT, las plantas inoculadas con la mutante Δ RHE_CH02128 formaron un mayor número de nódulos con un aumento significativo en PSN y una reducción en la actividad de la nitrogenasa. Mientras que, la capacidad de inducir la formación de nódulos disminuyó en las mutantes Δ RHE_CH02413, Δ RHE_CH03587 y Δ RHE_PC00057. Sin embargo, las plantas inoculadas con las cepas Δ RHE_CH02413 o Δ RHE_PC00057 presentaron una actividad mayor de nitrogenasa que la cepa WT.

Tabla 4.2 Fenotipo simbiótico de plantas de *P. vulgaris* inoculadas con la cepa WT o derivadas mutantes en reguladores OmpR/PhoB de *R. etli*.

Cepa	Número de nódulos por planta	PSN ¹	PSP ²	Actividad de la nitrogenasa ³
WT	100.0 ± 26.8	0.095 ± 0.02	0.547 ± 0.10	13.2 ± 3.7
Δ RHE_CH02128	156.4 ± 18.4 *	0.118 ± 0.03 *	0.488 ± 0.09	7.4 ± 4.3 *
Δ RHE_CH02413	73.0 ± 10.9 *	0.099 ± 0.03	0.510 ± 0.11	19.8 ± 8.0 *
Δ RHE_CH03587	87.7 ± 17.8	0.063 ± 0.02 *	0.420 ± 0.07 *	11.3 ± 4.6
Δ RHE_PC00057	64.0 ± 26.4 *	0.061 ± 0.03 *	0.542 ± 0.16	16.5 ± 4.8 *

¹PSN, g de peso seco de nódulo por planta.

²PSP, g de peso seco de planta.

³umol etileno h⁻¹ gPSN.

Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes, colectando seis plantas en cada experimento. ± desviación estándar. (*) diferencia significativa comparado con los valores de raíces inoculadas con la WT ($P \leq 0.05$, prueba t-student).

Estos resultados sugieren que algunos de los reguladores OmpR/PhoB de *R. etli*, podrían estar implicados en la regulación de genes que son importantes para el establecimiento y/o desarrollo de la simbiosis entre *R. etli* y frijol. Como muestran nuestros resultados, la ausencia del regulador RHE_PC00057 impacta tanto la motilidad de la bacteria, como algunas de las características simbióticas de la cepa como son la nodulación y la fijación de nitrógeno. Consecuentemente, en este trabajo nos enfocamos en la identificación y caracterización de algunos de los mecanismos moleculares en los que participa el regulador RHE_PC00057 (referido como RetPC57) durante la simbiosis *R. etli* – *P. vulgaris*.

4.2 El ORF *RetPC57* de *R. etli* codifica para un regulador de respuesta altamente conservado en rizobiales pertenecientes al grupo *Rhizobium/Agrobacterium*

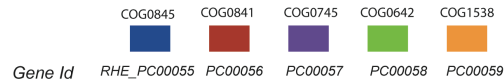
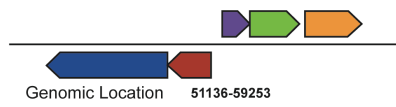
El ORF *RetPC57* de *R. etli*, ubicado en el megaplásmido pRet42c, codifica para un regulador de respuesta de tipo OmpR con una identidad del 48.7% con el regulador CpxR de *E. coli*. CpxR es un regulador de la respuesta que forma un SDC con la histidina quinasa CpxA que está presente en muchas bacterias. El sistema CpxRA regula a una gran cantidad de genes en respuesta al estrés periplásmico. En *E. coli*, CpxP y NlpE, dos proteínas periplásmicas auxiliares de señalización son parte del sistema Cpx (Danese and Silhavy, 1998; Vogt and Raivio, 2012). Un alineamiento múltiple de secuencias utilizando CLUSTALW, mostró que la proteína *RetPC57* conserva un alto porcentaje de identidad (90 a 99.6%) con proteínas anotadas como CpxR en bacterias que pertenecen al grupo *Rhizobium/Agrobacterium*, y cuya función no se ha descrito hasta la fecha.

Un análisis del contexto genómico del gen *RetPC57* y sus homólogos revela que estos genes están organizados de manera similar en la mayoría de las cepas estudiadas del grupo *Rhizobium/Agrobacterium* (Figura 4.4). Los genes homólogos de *RetPC57* se encuentran junto a un gen que codifica una histidina quinasa altamente conservada, RHE_PC00058 (denominada *RetPC58*). De manera similar a *RetPC57*, las proteínas con el mayor porcentaje de identidad con *RetPC58* (74.5 a 100%) pertenecen al grupo de los Rhizobiales, mientras que *RetPC58* y CpxA de *E. coli* comparten tan solo un 29.8% de identidad. En las cepas estudiadas, no pudimos identificar genes homólogos a *cpxP* y *nlpE* de *E. coli* (Danese and Silhavy, 1998; Fleischer et al., 2007). *RetPC57* y *RetPC58* son flanqueados por un grupo de genes que se predice que codifican proteínas que pertenecen a la familia de transportadores MDR y bombas de eflujo. El gen RHE_PC00059, que codifica NodTc una proteína de membrana externa (OEP) que pertenece a la superfamilia TolC, se encuentra río abajo y en la misma orientación que *RetPC57* y *RetPC58*. Transcritos en la dirección opuesta a *RetPC57* y compartiendo una región intergénica de 320 nt se encuentran dos genes, RHE_PC00056 y RHE_PC00055 (denominados *RetPC56* y *RetPC55*, respectivamente), que codifican proteínas que pertenecen a la familia de bombas tipo RND..

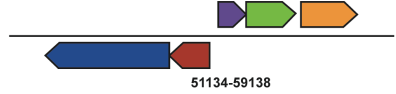
Para estimar las relaciones evolutivas entre *RetPC57* y genes adyacentes con su contraparte en los rhizobia estudiadas y *E. coli*, se construyó un árbol filogenético (Figura 4.5). En resumen, estos análisis muestran que las cepas de *R. etli* y *R. leguminosarum* exhiben una relación más cercana en todos los genes analizados, seguidas de *Agrobacterium radiobacter* K84 y *Sinorhizobium fredii* NGR234. Mientras que los genes de *S. meliloti* y *E. coli* tienen una relación filogenética más lejana.

Gene Context

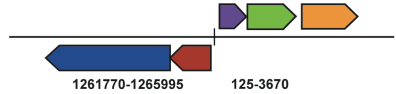
Rhizobium etli CFN 42,
plasmid p42c: NC_007764.1



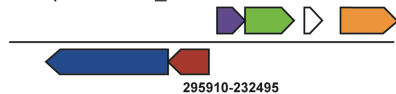
Rhizobium etli bv. *mimosae* Mim1,
plasmid pRetMIM1b: NC_021907.1



Rhizobium leguminosarum bv. *trifolii* WSM2304,
plasmid pRLG201: NC_011368.1



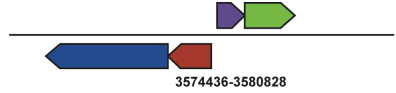
Rhizobium leguminosarum bv. *viciae* 3841,
plasmid pRL10: NC_008381.1



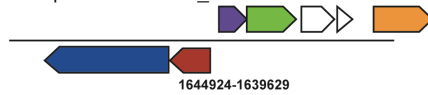
Rhizobium leguminosarum bv. *trifolii* WSM1325,
plasmid pR132505: NC_012854.1



Agrobacterium radiobacter K84,
chromosome 1: NC_011985.1



Sinorhizobium fredii NGR234,
plasmid pNGR234b: NC_012586.1



Sinorhizobium meliloti 1021,
plasmid: pSymB NC_003078.1



Escherichia coli K-12 MG1655,
chromosome: NC_000913.3



Identity

0.999	0.997	0.996	1.0	0.992
REMIM1_PB00055	REMIM1_PB00057	REMIM1_PB00058	REMIM1_PB00059	
	REMIM1_PB00056			

0.924	0.874	0.969	0.895	0.907
Rleg2_5613	Rleg2_5614	Rleg2_4371	Rleg2_4372	Rleg2_4373

0.894	0.813	0.956	0.813	0.869
pRL100286	pRL100287	pRL100288	pRL100289	pRL100291

0.619*	0.489*	0.947	0.814	0.872
Rleg_5659	Rleg_5660	Rleg_6517	Rleg_6516	Rleg_6515

0.869	0.828	0.925	0.766	0.61*
Arad_4473	Arad_4474	Arad_4475	Arad_4476	Arad_0222

0.836	0.771	0.917	0.745	0.366
NGR_b16220	NGR_b16210	NGR_b16200	NGR_b16190	NGR_b16160

0.307*	0.24*	0.487	0.298	0.272*
SMc01829	SMc01828	SM_b21561	SM_b21560	SMc02082

0.428*	0.288*	0.452	0.297	0.225*
b2075	b0878	b3912	b3911	b0572

Figura 4.4. Análisis del contexto genómico del locus *RetPC57* y genes ortólogos. Los mapas del contexto genómico de los genes ortólogos de *RHE_PC00055*, *RHE_PC00056*, *RHE_PC00057*, *RHE_PC00058* y *RHE_PC00059* (*nodTc*) se obtuvieron con la herramienta IMG. Los ortólogos se muestran con el mismo color. Azul: COG0845, bomba de eflujo de múltiples fármacos (MFP), subunidad AcrA. Rojo: COG0841, bomba de eflujo, subunidad AcrB. Morado: COG0745, regulador de respuesta de unión a ADN, familia OmpR, contiene dominios REC y HTH de hélice ancha (wHTH). Verde: COG0642, histidina quinasa de transducción de señales. Naranja: COG1538, proteína de membrana externa tipo TolC. Identidad basada en "Sequence Similarity Data Base" de KEGG. (*) indica que los genes están codificados en una posición distinta en el genoma.

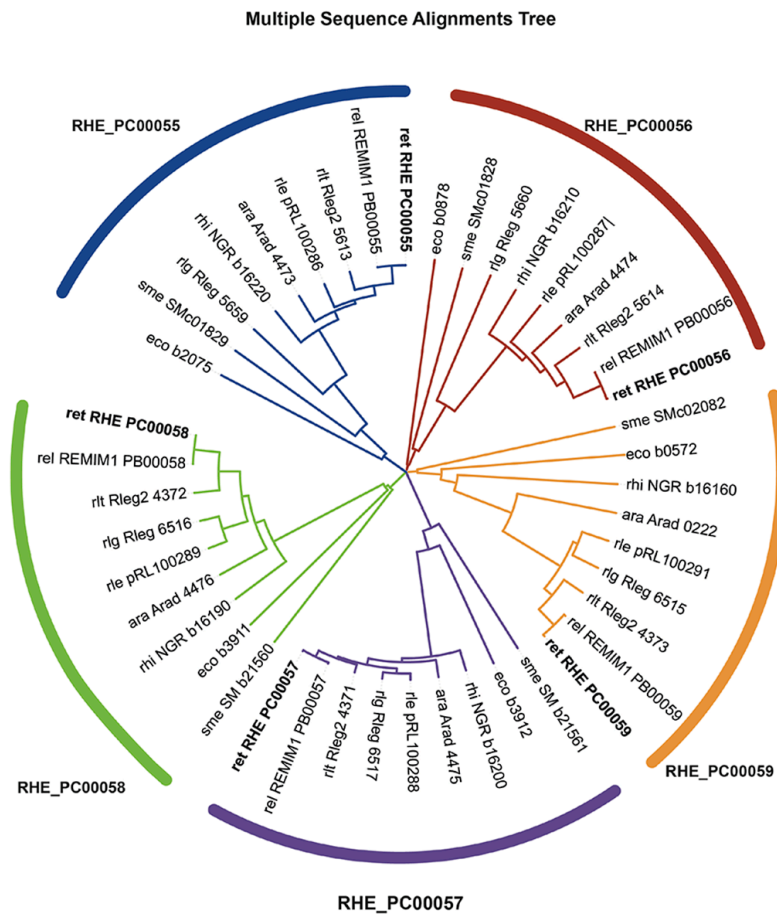


Figura 4.5 Árbol filogenético de genes ortólogos de la región genómica de *RetPC57*. Alineamiento de secuencia múltiple por CLUSTALW y diseñado en iTOL. Las secuencias de *RHE_PC00055* (azul), *RHE_PC00056* (rojo), *RHE_PC00057* (morado), *RHE_PC00058* (verde) y *RHE_PC00059* (*nodTc*, naranja) y sus ortólogos se obtuvieron de la base de datos KEGG. ara, *Agrobacterium radiobacter*; eco, *Escherichia coli* K-12 MG1655; rel, *Rhizobium etli* bv. *mimosae* Mim1; ret, *Rhizobium etli* CFN42; rhi, *Sinorhizobium fredii* NGR234; rle, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841; rlg, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* WSM1325; rlt, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* WSM2304; sme, *Sinorhizobium meliloti* 1021.

4.3 El regulador *RetPC57* y la histidina quinasa *RetPC58* forman un sistema de dos componentes

La localización genómica de los genes *RetPC57* y *RetPC58*, en las posiciones pRet42c: 55707 – 56393 y 56396 – 57685 respectivamente, sugiere que están organizados en un operón. Para definir su organización, evaluamos su expresión génica en cultivos aeróbicos, mediante PCR de transcripción inversa (RT-PCR) utilizando ARN total de la cepa silvestre. Sintetizamos un producto de ADN complementario (ADNc) correspondiente a una región interna de cada gen: *RetPC57* fragmento de 230pb (del nt. 55755 al nt. 55984) y *RetPC58* fragmento de 251pb (del nt. 56996 al nt. 57246); así como un producto de ADNc correspondiente a ambos genes *RetPC57-RetPC58*: fragmento de 945 pb (del nt 55755 del *RetPC57* al nt 56699 del *RetPC58*) (Figura 4.6 A). Como se muestra en la figura 4.6 B los

productos de ADNc obtenidos corresponden a los esperados y comprueban que *RetPC57* y *RetPC58* forman un operón.

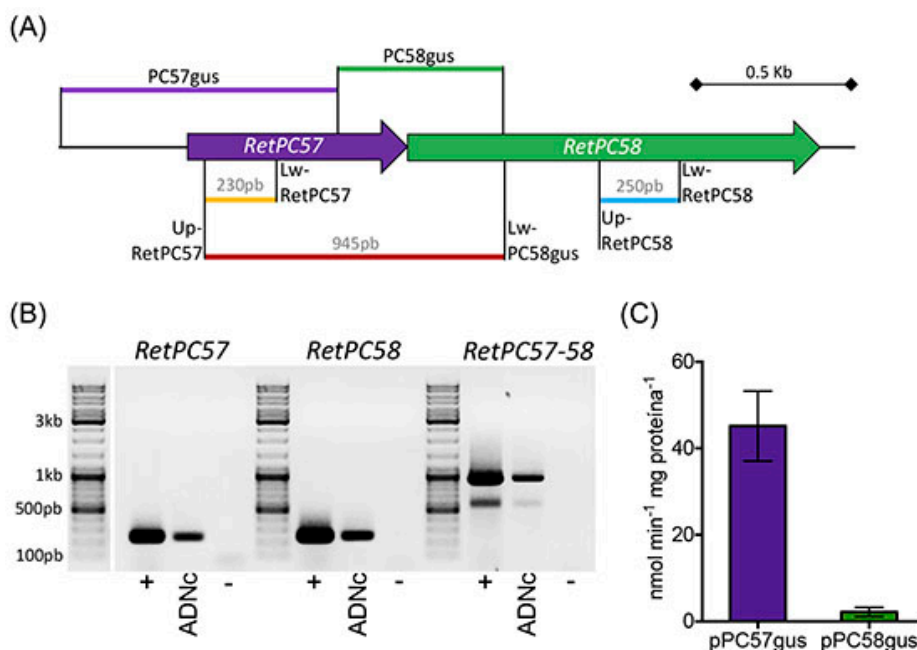


Figura 4.6 *RetPC57* y *RetPC58* están codificados en un operón. (A) Representación esquemática del posible operón *RetPC57-RetPC58*. (B) RT-PCR de los genes *RetPC57*, *RetPC58* y *RetPC57-RetPC58*. ARN total purificado de la cepa WT crecida en condiciones aeróbicas por 6 horas fue utilizado para la síntesis de ADN complementario (ADNc). ADN de la cepa WT fue utilizado como control positivo (+). Reacción sin templado (-). Las muestras se corrieron en geles de agarosa con bromuro de etidio. Las regiones amplificadas de los genes son indicadas en el esquema. Las anotaciones 250, 250 y 945 pb indican el tamaño de los productos de *RetPC57*, *RetPC58* y *RetPC57-RetPC58*, respectivamente. (C) Expresión aeróbica de las fusiones transcripcionales pPC57-gus y pPC58-gus. Los fragmentos de los genes *RetPC57* y *RetPC58* contenidos en cada fusión son indicados en el esquema. Las bacterias fueron cultivadas aeróbicamente en medio mínimo por 6 horas. La actividad de β -glucuronidasa es expresada en nmoles por min por mg de proteína. Los datos son la media dos réplicas de tres experimentos independientes.

Experimentos de expresión génica utilizando como reportero el gen de la β -glucuronidasa (*uidA*), confirmaron nuevamente el arreglo en operón de estos genes. Para ello, construimos dos fusiones transcripcionales en plásmidos que llevan fragmentos sobrelapados de esta región. La fusión pPC57-gus contiene la probable región promotora mientras que pPC58-gus contiene parte de la región codificante de ambos genes compartiendo el final de la fusión pPC57-gus (Figura 4.6 A). La actividad específica de GUS se determinó en cultivos aeróbicos en medio mínimo de cepas WT de *R. etli* CE3 a las que se les conjugó por separado cada una de las fusiones. Actividad significativa de GUS se observó únicamente en la cepa que lleva la fusión pPC57-gus, indicando que hay un solo promotor en esta región y está localizado río arriba del gen *RetPC57* (Figura 4.6 C).

El gen *RetPC57* codifica un polipéptido de 228 aminoácidos (aa) que posee un dominio receptor (del aa 4 al aa 109) típico de los reguladores de respuesta (REC) y un dominio de unión a ADN trans-reg-C (del aa 149 al aa 225), característico de la familia OmpR (Figura 4.7 A). Dos pares de bases río abajo del codón de término de *RetPC57*, se localiza el gen *RetPC58* el cual codifica para una proteína de 431 aa, que presenta un dominio sensor (del aa 34 al 122), dos dominios transmembranales (del aa 8 al 29 y del aa 126 a 143) y el dominio histidina-quinasa (del aa 202 al 421) (Figura 4.7 A). La mayoría de los estudios experimentales y las búsquedas *in silico* revelan que los genes que codifican un probable sistema de dos componentes se encuentran adyacentes en el genoma y generalmente, formando un operón (Ulrich and Zhulin, 2010). Por lo que, basados en todo lo anterior llevamos a cabo ensayos de fosforilación *in vitro* para determinar si la proteína *RetPC58* es la HK cognada del RR *RetPC57*. Para ello generamos un dominio histidina-quinasa recombinante de la HK *RetPC58* ($\text{His}_6\text{-HKPC58}$) y una proteína *RetPC57* recombinante ($\text{His}_6\text{-RetPC57}$) (Figura 4.7 B). Una vez fosforilada la $\text{His}_6\text{-HKPC58}$ (Figura 4.7 C, carril 1), se incubó junto con $\text{His}_6\text{-RetPC57}$ (Figura 4.7 C, carril 2). La fosfotransferencia de P~ HKPC58 a $\text{His}_6\text{-RetPC57}$ en el tiempo se observó analizando alícuotas en geles de acrilamida. Como puede observarse (Figura 4.7 C, carril 3 – 10) la señal correspondiente a P~ HKPC58 disminuye en el tiempo aumentando la señal de P~ RetPC57 . Este resultado

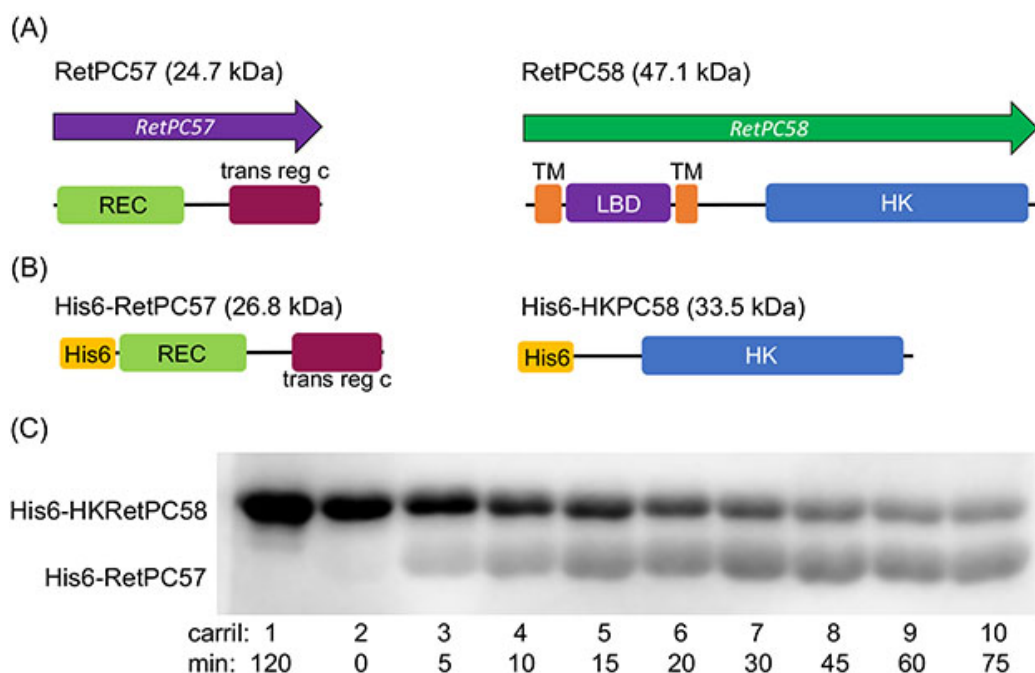


Figura 4.7 RetPC57 y RetPC58 forman un sistema de dos componentes. (A) Esquema de la arquitectura de los dominios de las proteínas *RetPC57* y *RetPC58* (B) proteínas recombinantes con etiquetas de histidina generadas (C) Ensayo de fosforilación *in vitro* de las proteínas $\text{His}_6\text{-HKPC58}$ y $\text{His}_6\text{-RetPC57}$ Fosforilación *in vitro* de la HK *RetPC58* y RR *RetPC57* con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$. carril 1: muestra a la proteína $\text{His}_6\text{HKPC58}$ fosforilada. Carriles 2: adición de la proteína $\text{His}_6\text{-RetPC57}$. Carriles 3 – 10: muestran la fosforilación del RR en el tiempo. Las muestras se corrieron en un gel SDS-PAGE y fueron reveladas en un phosphorimager con el programa Quantity One de Bio-Rad.

muestra la capacidad de RetPC58 de fosforilar directamente a RetPC57 y confirma que estas dos proteínas, RetPC58 y RetPC57, forman un sistema de dos componentes.

4.4 El regulador RetPC57 y la condición simbiótica son necesarios para la expresión del locus *RetPC57*

El nivel de expresión mostrado por el plásmido pPC57-gus indica un bajo nivel de transcripción basal del operón *RetPC57-RetPC58* en condiciones aeróbicas (Figura 4.6 C y Tabla 4.2). Un nivel similar de expresión se observó en condiciones de bajo oxígeno y en la fase estacionaria de crecimiento (datos no mostrados). Interesantemente, el nivel de expresión en condiciones aeróbicas de la fusión pPC57-gus aumenta en presencia de un plásmido que contiene el gen *RetPC57* bajo el control de un promotor inducible por cumato (Q) (pQPC57, Tabla 4.2). El nivel más alto de expresión de *RetPC57* en bacterias cultivadas aeróbicamente se observó en presencia de 5 µg/ml de Q (Tabla 4.2) Estos resultados indican que RetPC57 es necesario para activar su propia expresión y que la condición aeróbica no promueve adecuadamente su activación. La participación de RetPC57 como regulador de la expresión de sus genes vecinos, *RetPC56* y *nodTc*, se analizó determinando la actividad específica de GUS en plásmidos que llevan la región río arriba de cada gen fusionada con el gen reportero *uidA* (pPC56-gus y pnodTc-gus). El patrón de expresión de estos genes se analizó tanto en la cepa WT como en la cepa de *R. etli* WT con el plásmido pQPC57 en cultivos aeróbicos con y sin Q. Como se muestra en la tabla 4.2, los genes *RetPC56* y *nodTc* muestran un nivel de expresión muy bajo, el cual se mantiene aún en presencia del plásmido pQPC57. Sin embargo, la presencia de Q en el medio de crecimiento induce alrededor de 7 y 25 veces la expresión de los genes *RetPC56* y *nodTc*, respectivamente (Tabla 4.2). Estos resultados indican que los genes *RetPC56* y *nodTc* están bajo el control de RetPC57 y dependen de la expresión de *RetPC57*.

Tabla 4.3 Análisis de expresión de los genes *RetPC57*, *RetPC58*, *RetPC56* y *nodTc* en diferentes derivadas de *R. etli*.

Cepa	Fusión genotipo	Actividad específica de β-glucuronidasa ¹	
		MMY ²	MMYQ ³
WT/pPC57-gus	<i>RetPC57::uidA</i>	45 ± 8	ND
WT/pPC57-gus/pQPC57	<i>RetPC57::uidA</i>	204 ± 40	793 ± 64
WT/pPC58-gus	<i>RetPC58::uidA</i>	2 ± 1	ND
WT/pPC56-gus	<i>RetPC56::uidA</i>	5 ± 1	ND
WT/pPC56-gus/pQPC57	<i>RetPC56::uidA</i>	29 ± 2	190 ± 23
WT/pnodTc-gus	<i>nodTc::uidA</i>	5 ± 2	ND
WT/pnodTc-gus/pQPC57	<i>nodTc::uidA</i>	43 ± 10	1099 ± 169
WT/pPC57-gus/pLC290	<i>RetPC57::uidA</i>	41 ± 8	42 ± 4

¹Los valores son expresados en nmol min⁻¹ mg de proteína⁻¹. Los datos son el promedio de tres replicas con dos experimentos independientes ± desviación estándar.

²Medio mínimo Y. ³Medio mínimo Y + cumato a una concentración final de 5 µg/ml.

ND: no determinado.

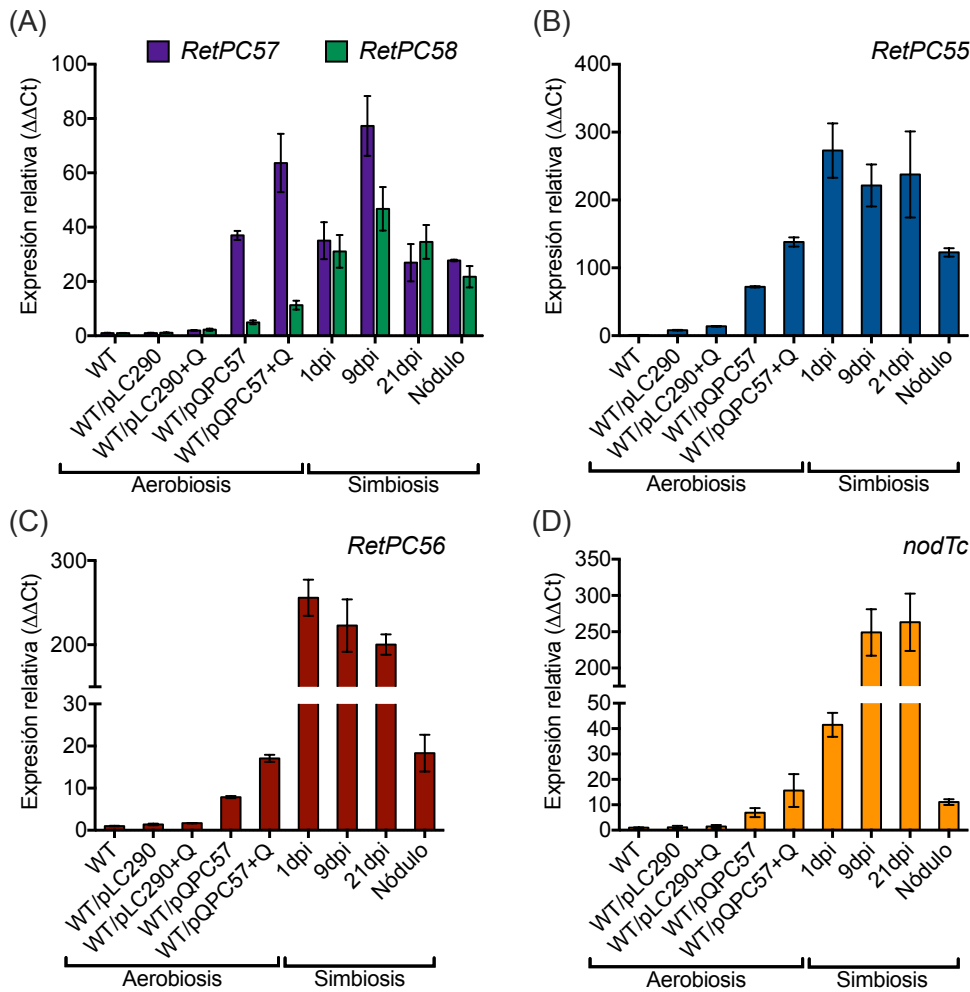


Figura 4.8 Análisis de expresión de genes localizados en la región genómica de *RetPC57*. La expresión de los genes (A) *RetPC57*, *RetPC58*, (B) *RetPC55*, (C) *RetPC56* y (D) *nodTc* fue determinada en cultivos aeróbicos de las cepas de *R. etli* WT, WT/pLC290 y WT/pQPC57, y de raíces de frijol inoculadas con la cepa WT después de 1, 9 y 21 dpi y de bacteroides de nódulos de 21 dpi. La expresión relativa fue normalizada con el valor de la WT en la condición aeróbica, ajustado a 1. El gen *rpoA* fue usado para normalizar la expresión de los genes. Los datos son el promedio de valores de tres réplicas en un solo experimento de qRT-PCR. (+Q) indica la presencia de cumato en el medio de cultivo a una concentración final de 5 μg/ml.

Para conocer si la simbiosis es la condición necesaria para inducir la expresión de los genes del operón *RetPC57-RetPC58*, realizamos un análisis transcripcional de estos genes en plantas de frijol inoculadas con la cepa WT. El nivel de expresión génica se analizó por RT-qPCR, purificando ARN total tanto de raíces inoculadas 1, 9 y 21 días después de la inoculación (dpi), como de los nódulos de 21 dpi. El nivel de expresión observado de ambos genes en simbiosis es similar al observado en bacterias en vida libre cultivadas aeróbicamente que llevan el plásmido pQPC57 (Figura 4.8 A). Este resultado indica que la condición simbiótica desencadena la activación del operón *RetPC57-RetPC58*. El análisis de expresión en las bacterias simbióticas muestra un nivel de expresión mayor de los genes

RetPC55, *RetPC56* y *nodTc* en comparación con el nivel de expresión observado en bacterias de vida libre cultivadas en condiciones aeróbicas (Figura 4.8 B, C y D). La similitud del perfil de expresión de estos genes con el del regulador *RetPC57* sugiere que en *R. etli*, el locus *RetPC57* es activo y funcional en simbiosis.

4.5 La ausencia del regulador *RetPC57* afecta la simbiosis *R. etli* – *Phaseolus vulgaris*

Con el objetivo de conocer si el regulador *RetPC57* participa en la regulación (directa o indirecta) de genes simbióticos, caracterizamos algunas de las respuestas moleculares de la mutante Δ RHE_PC00057 (denominada Δ RetPC57) durante su interacción simbiótica con plantas de frijol. En un primer enfoque, comparamos la cinética de nodulación de plantas de frijol inoculadas con las cepas WT, Δ RetPC57, Δ RetPC57/pPC57 (complementada con un plásmido que expresa el gen *Retpc57* bajo su propio promotor) o WT/pFAJ1700 (cepa silvestre con el plásmido vector vacío). Los primordios nodulares y nódulos jóvenes fueron visibles a los 7 dpi independientemente de la cepa utilizada. Sin embargo, el número de nódulos en plantas inoculadas con la cepa Δ RetPC57 fue significativamente menor en comparación con el observado en plantas inoculadas con la cepa WT a lo largo de todo este estudio (Figura 4.9). La mutante Δ RetPC57 con el plásmido pPC57 (Δ RetPC57/pPC57) recupera el fenotipo silvestre de nodulación; mientras que la presencia del plásmido vector en la WT no afecta la nodulación (Figura 4.9)

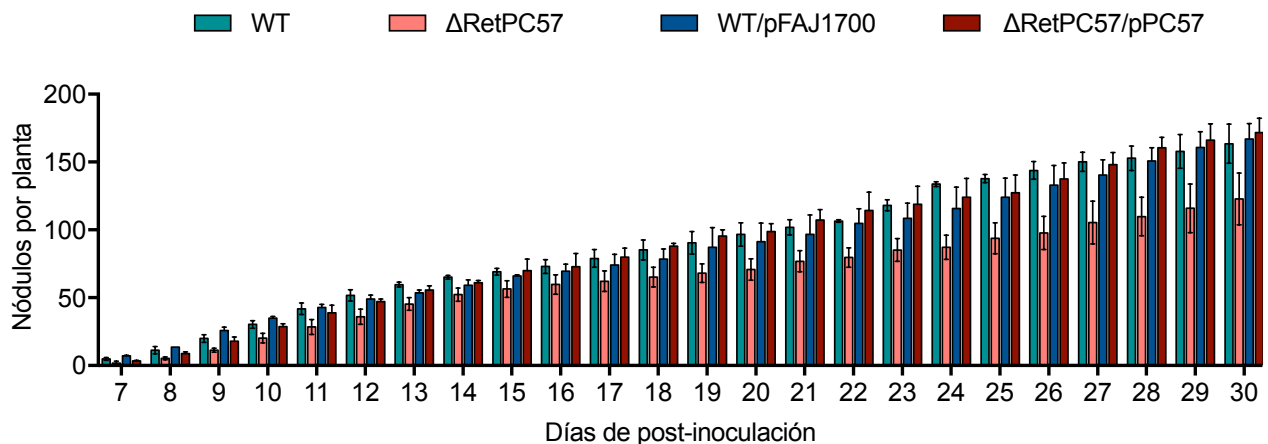


Figura 4.9 Cinética del número de nódulos formados por las cepas WT y Δ RetPC57 de *R. etli*. Semillas de frijol fueron inoculadas con las cepas WT (■), Δ RetPC57(■), Δ RetPC57/pPC57 (■) o CE3/pFAJ1700 (■) de *R. etli* y cultivadas en bolsas de germinación. El número de nódulos formado por planta fue registrado diariamente desde el día 7 hasta el día 30 después de la inoculación. Los datos representan el promedio de tres diferentes experimentos, consistiendo de seis plantas por tratamiento. (*) diferencia significativa comparado con los valores de raíces inoculadas con la WT ($P \leq 0.05$, prueba t-student).

Si la ausencia del regulador RetPC57 afecta negativamente la nodulación también podría afectar a la capacidad fijadora de nitrógeno de la cepa. Sin embargo, observamos que las plantas de frijol inoculadas con la mutante presentaron una actividad reductora de acetileno (ARA) mayor al observado en las plantas inoculadas con la WT (Figura 4.10 A), así como un mayor contenido de leghemoglobina (Figura 4.10 B) y formaron nódulos de mayor tamaño (figura 4.10 C y D). En conjunto, estos resultados sugieren que RetPC57 es necesario para una óptima nodulación, mientras que tiene un impacto negativo en la fijación de nitrógeno con frijol.

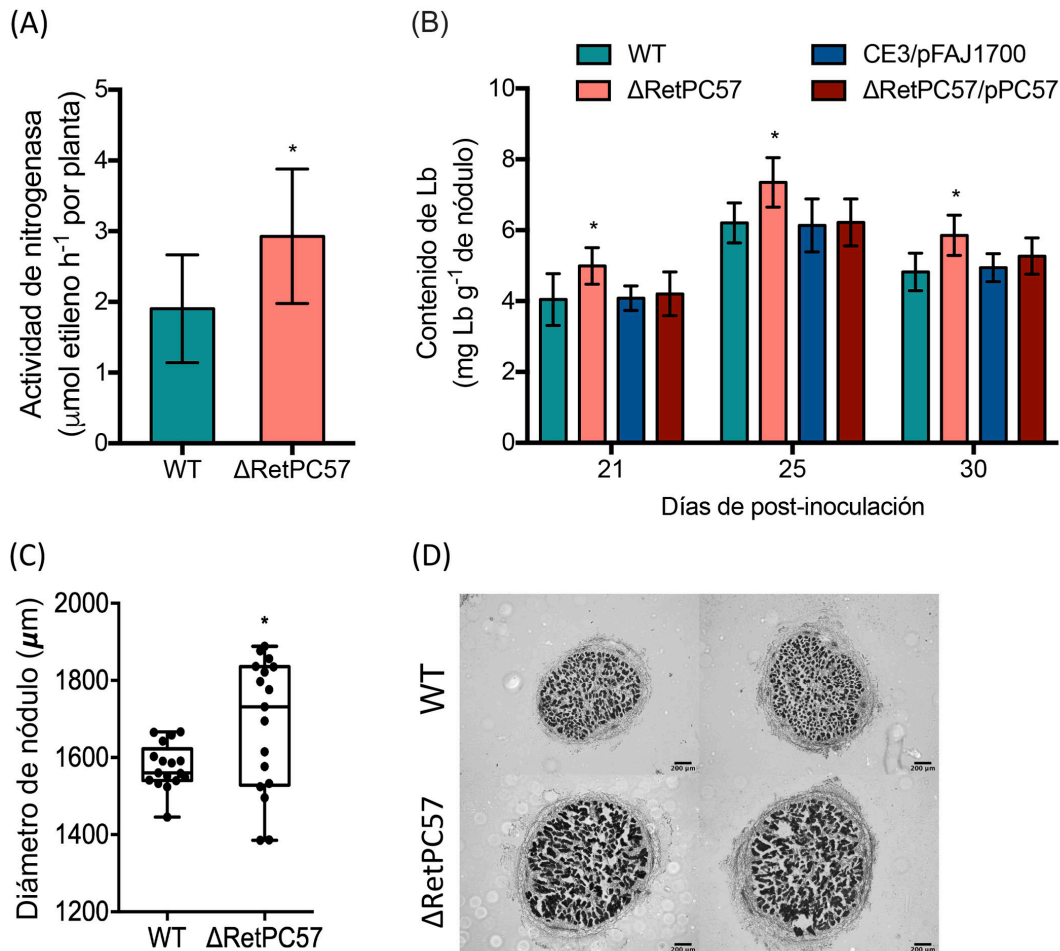


Figura 4.10 Fenotipo simbiótico de la mutante $\Delta\text{RetPC57}$ de *R. etli*. Semillas de frijol fueron inoculadas con la cepa WT, $\Delta\text{RetPC57}$, $\Delta\text{RetPC57/pPC57}$, o CE3/pFAJ1700 y cultivadas en bolsas de germinación. **(A)** actividad de nitrogenasa (ARA) a los 21 dpi. Los datos son el promedio de tres diferentes experimentos, consistiendo de seis plantas por tratamiento. **(B)** contenido de leghemoglobina (Lb) en plantas de 21, 25 y 30 dpi. Los datos son el promedio de tres réplicas biológicas en tres experimentos independientes y **(C)** diámetro de los nódulos de 21 dpi. En la gráfica, la caja representa el primer y tercer cuartil y los límites mínimo y máximo de los datos. Los valores representan el promedio de 20 nódulos/ cepa. (*) diferencia significativa comparado con los valores obtenidos de plantas inoculadas con la WT ($P \leq 0.05$, prueba t-student). **(D)** imágenes representativas de cortes transversales de nódulos maduros de frijol teñidos con safranina y visualizados al microscopio. Los nódulos fueron colectados 21 dpi de plantas inoculadas con la cepa WT o la cepa mutante.

4.6 RetPC57 se requiere para una infección apropiada de *R. etli* en la raíz de *P. vulgaris*

La respuesta quimiotáctica a los flavonoides secretados por las raíces de las leguminosas y la adhesión de los rhizobia a los pelos radicales, son dos pasos cruciales para el inicio del proceso de infección (Wheatley and Poole, 2018). Para investigar más a fondo la relevancia de RetPC57 en la relación simbiótica con su leguminosa huésped, exploramos la capacidad de adhesión a los pelos de la raíz del frijol de la cepa Δ RetPC57. Para ello, conjugamos un plásmido estable en *Rhizobium* que expresa constitutivamente el gen *uidA* (pGUS) tanto en la cepa WT como en la mutante Δ RetPC57 (WT/pGUS y Δ RetPC57/pGUS, respectivamente). Para reintroducir un gen *RetPC57* silvestre a la cepa mutante, el pGUS fue modificado clonándole el gen *RetPC57* con su propio promotor (Δ RetPC57/pGUS-PC57). Para comprobar que el fondo genético no afecta el nivel de expresión constitutiva del gene *uidA*, llevamos a cabo un experimento control en el que las cepas WT/pGUS, Δ RetPC57/pGUS y Δ RetPC57/pGUS-PC57 fueron inoculadas a una D.O.₅₄₀=0.3 en solución nutritiva Fahreus y se incubaron a 30°C sin agitación. Después de 4 y 6 días se determinó la actividad específica de GUS (ver detalles en material y métodos). Encontramos que el nivel de expresión de GUS es similar entre las cepas WT/pGUS (204.13 ± 34 y 192.75 ± 22 nmol min⁻¹ mg de proteína⁻¹), Δ RetPC57/pGUS (211.01 ± 73 y 204.41 ± 37 nmol min⁻¹ mg de proteína⁻¹) y Δ RetPC57/pGUS-PC57 (203.90 ± 79 y 205.69 ± 27 nmol min⁻¹ mg de proteína⁻¹) a los 4 y 6 días respectivamente. Una vez que comprobamos que el nivel de expresión de GUS es la misma independientemente del fondo genético, llevamos a cabo el experimento de adhesión con las tres cepas generadas en plántulas de frijol. Después de 4 dpi, las raíces inoculadas fueron teñidas para revelar la actividad de GUS. Las raíces inoculadas con la cepa WT mostraron una fuerte señal de GUS en la zona susceptible, mientras que en las raíces inoculadas con la mutante Δ RetPC57 se observó una señal mas débil (Figura 4.11 A). Interesantemente, a los 6 dpi no observamos diferencias en la señal de GUS en las raíces inoculadas tanto con la cepa WT como con la mutante Δ RetPC57 (Figura 4.11 B). La confirmación de que el retardo en la adhesión mostrada por la mutante Δ RetPC57 se debe a la ausencia del gen *RetPC57*, se obtuvo con raíces inoculadas con la cepa complementada (Δ RetPC57/pGUS-pc57), las cuales desarrollaron una señal de GUS similar a la observada en las raíces inoculadas con la cepa WT a los 4 y 6 dpi (Figura 4.11). Estos datos indican que RetPC57 se requiere para una adhesión eficiente y oportuna de los rhizobia a las raíces de frijol, y sugiere que su ausencia retrasa o afecta la comunicación eficiente entre los rhizobia y su leguminosa huésped.

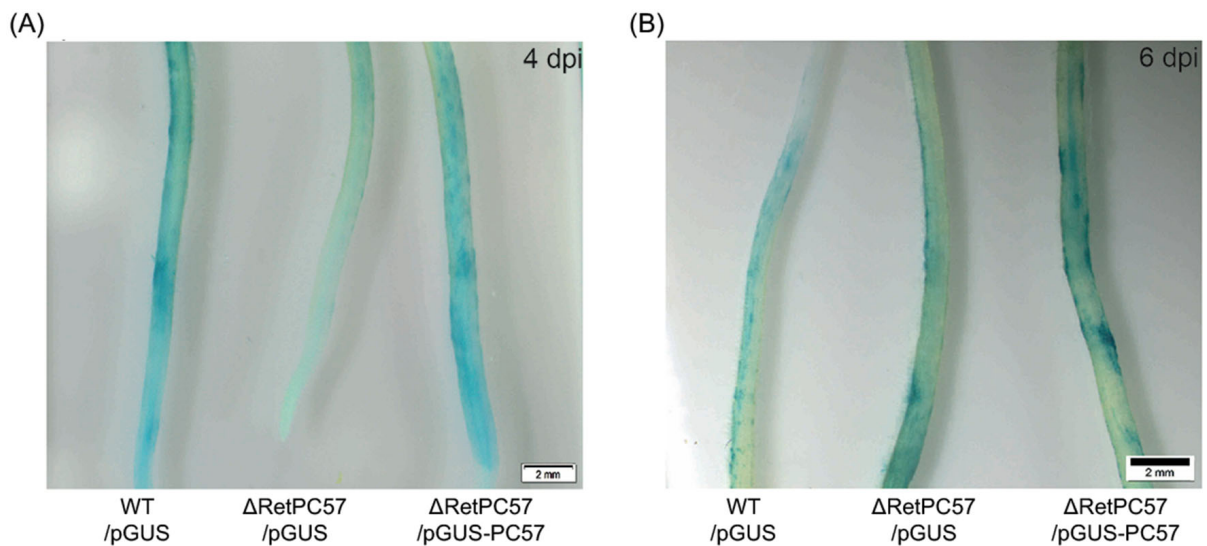


Figura 4.11 RetPC57 se requiere para una apropiada adhesión de *R. etli* a las raíces de frijol. Raíces de frijol fueron inoculadas con la cepa WT/pGUS, Δ RetPC57/pGUS o Δ RetPC57/pGUS-pc57 de *R. etli*, y analizadas después de 4 (A) y 6 (B) dpi. Se muestran mágenes representativas de raíces de frijol teñidas con GUS después de la adhesión de los rhizobia (barras = 2 mm).

Al adherirse al pelo radical, los rhizobia producen FN, que inducen una reorientación continua del crecimiento de la punta de los pelos de las raíces, ocasionando su curvatura y el atrapamiento de los rhizobia en la cámara de infección (Catoira et al., 2000; Fournier et al., 2015). El hecho de que RetPC57 se requiera para que *Rhizobium* se adhiera adecuadamente a la raíz, nos llevó a evaluar si la ausencia de este regulador afecta la deformación del pelo radical. Con este fin, se inocularon plántulas de frijol con la cepa WT (WT/pGUS), la cepa mutante (Δ RetPC57/pGUS) o la cepa complementada (Δ RetPC57/pGUS-pc57). Después de 4 dpi, los eventos de deformación observados en las raíces inoculadas tanto con la WT como con la Δ RetPC57 o la cepa complementada fueron similares (Figura 4.12 A). Sin embargo, se observó una diferencia cuantitativa de los eventos de deformación de pelos radicales. Mientras que las raíces inoculadas con la cepa WT o con la cepa complementada en *trans* con el gen *RetPC57* desarrollaron en promedio 50 pelos deformados, las raíces inoculadas con la mutante desarrollaron en promedio únicamente 20 eventos de deformación (Figura 4.12 B). Interesantemente, después de 6 dpi el número de pelos radicales deformados fue similar independientemente de la cepa utilizada como inoculante. Estos resultados indican que la ausencia de RetPC57 da como resultado un retraso del reconocimiento mutuo entre ambos socios simbióticos, indicando que este regulador participa en el proceso de infección por rhizobia.

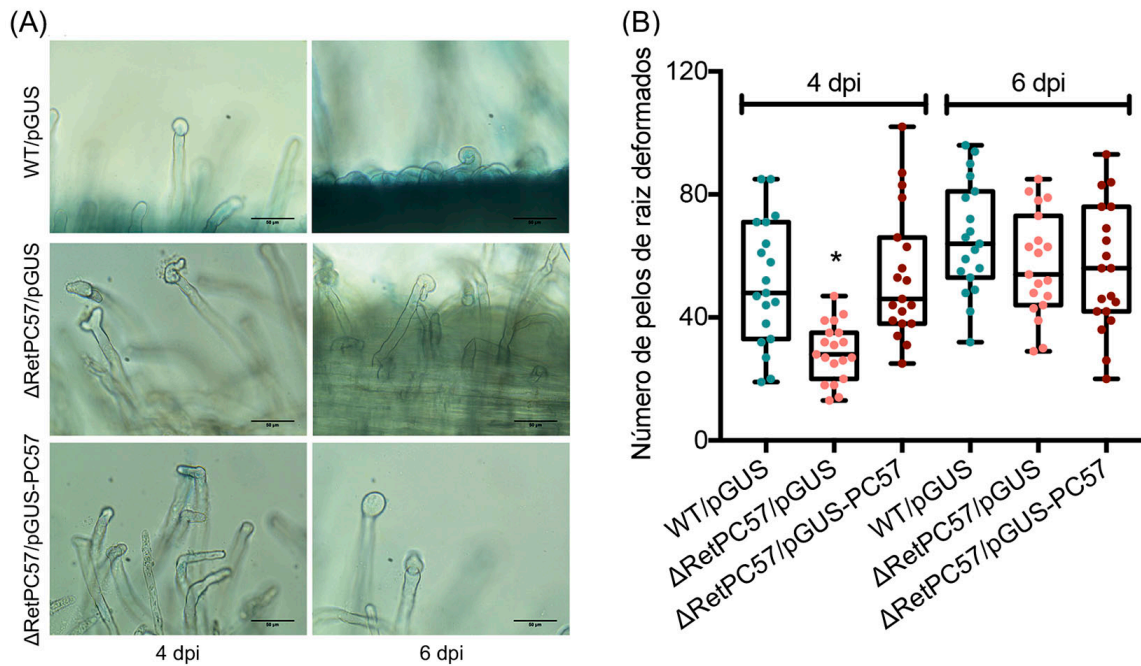


Figura 4.12 RetPC57 participa en el proceso de infección de las raíces de frijol. Raíces de frijol fueron inoculadas con la cepa WT/pGUS, Δ RetPC57/pGUS o Δ RetPC57/pGUS-pc57 de *R. etli*, y fueron analizadas después de 4 y 6 dpi. **(A)** Imágenes representativas que muestran la deformación de pelos radicales inducidos por los rhizobia (barras = 100 μ m). **(B)** Número de eventos de deformación de pelos radicales inducidos por los rhizobia. En el diagrama, la caja representa el primer y tercer cuartil y los límites mínimo y máximo de los datos. Los datos fueron obtenidos de cuatro réplicas biológicas, cada una con seis raíces. (*) diferencia significativa comparada con los valores de la WT ($P \leq 0.05$, prueba t-student).

4.7 La ausencia de RetPC57 afecta la expresión de genes de la bacteria y de la planta involucrados en el proceso de infección

Los metabolitos secundarios producidos por las raíces de las plantas se secretan a la rizosfera y juegan un papel importante en la interacción entre las plantas y los microbios del suelo. Los flavonoides secretados por las raíces de la planta huésped activan en los rhizobia la expresión de los genes de nodulación necesarios para la síntesis y secreción de los factores de nodulación (FN). En el establecimiento de una infección exitosa de las raíces de las leguminosas por rhizobia son esenciales, tanto la actividad biológica de los FN como las funciones fisiológicas de los sistemas de eflujo de resistencia a múltiples drogas (MDR) (González-Pasayo and Martínez-Romero, 2000; Bhattacharya et al., 2010; Lindemann et al., 2010). Para comprender mejor el posible papel de RetPC57 como un activador y/o represor transcripcional, realizamos un análisis de expresión de genes relacionados con la infección por rhizobia y etapas tempranas de la nodulación en raíces de plantas de frijol inoculadas con la cepa WT o con la mutante Δ RetPC57 a diferentes tiempos después de la inoculación y en nódulos de 21 dpi.

Los genes *nodA* y *nodB* codifican proteínas responsables de la síntesis del esqueleto sacarídico de los FN. Los resultados muestran que la ausencia del regulador RetPC57 tiene un impacto negativo en la abundancia de transcritos en raíces de frijol de los genes *nodA* (Figura 4.13 A) y *nodB* (Figura 4.13 B).

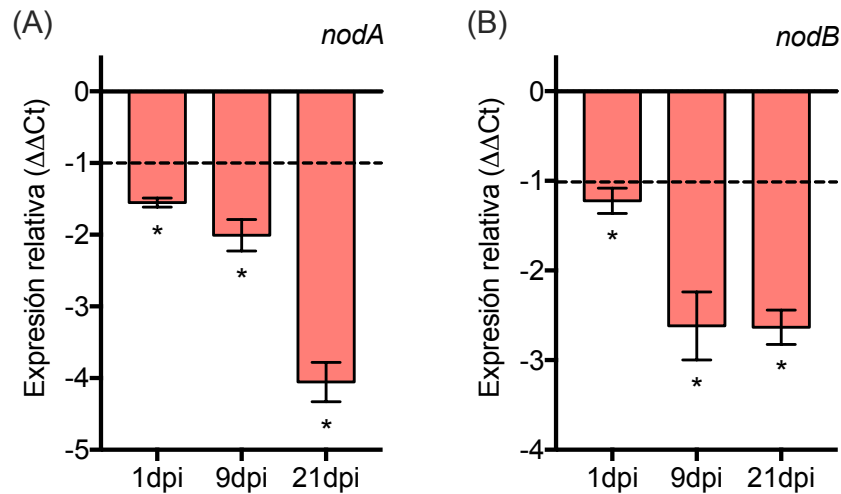


Figura 4.13 RetPC57 es necesario para la expresión adecuada de los genes *nodA* y *nodB* en raíces de frijol. Semillas de frijol fueron inoculadas con la cepa WT o Δ RetPC57 de *R. etli*. La expresión relativa normalizada (Δ RetPC57:WT) de los genes fue determinada en raíces de 1, 9 y 21 dpi. El gen *rpoA* fue usado para normalizar la expresión de los genes. Cuando los valores son menores a 1, calculamos el valor inverso (WT: Δ RetPC57) de los datos y el signo del producto se invirtió. Los datos son el promedio de valores de tres réplicas de tres muestras independientes en un experimento de qRT-PCR. (*) diferencia significativa comparada con los valores de plantas inoculadas con la WT ($P \leq 0.05$, prueba t-student).

Se ha reportado que la expresión de los sistemas MDR está sujeta a múltiples niveles de regulación que incluyen a un regulador miembro de los represores transcripcionales tipo TetR y a un regulador transcripcional global como los SDC. En *E. coli*, el SDC EvgAS, PhoPQ y BaeSR participan en la regulación/modulación de la expresión de estos transportadores (Ramos et al., 2005; Li and Nikaido, 2009). Por lo tanto, investigamos si la expresión de diferentes genes de *R. etli* que se predice codifican probables proteínas miembro de los sistemas de eflujo MDR está influenciada por la ausencia de RetPC57.

Como se describió anteriormente, el análisis de expresión de los genes *RetPC55*, *RetPC56* y *nodTc*, genes vecinos de *RetPC57* y que codifican proteínas que forman parte de los sistemas MDR, realizado en la WT en condiciones aeróbicas y simbióticas, sugiere que el regulador RetPC57 participa en el control de su expresión (Tabla 4.2 y Figura 4.8 B, C y D). Si es ese el caso, la expresión de estos genes en plantas inoculadas con la Δ RetPC57 debería verse afectada negativamente. Como se muestra en la figura 4.14 A, B y C, el nivel de expresión de los genes *RetPC55*, *RetPC56* y *nodTc* disminuye en comparación con la

expresión observada en plantas inoculadas con la cepa WT. Estos resultados indican que RetPC57 es necesario como regulador positivo para su expresión.

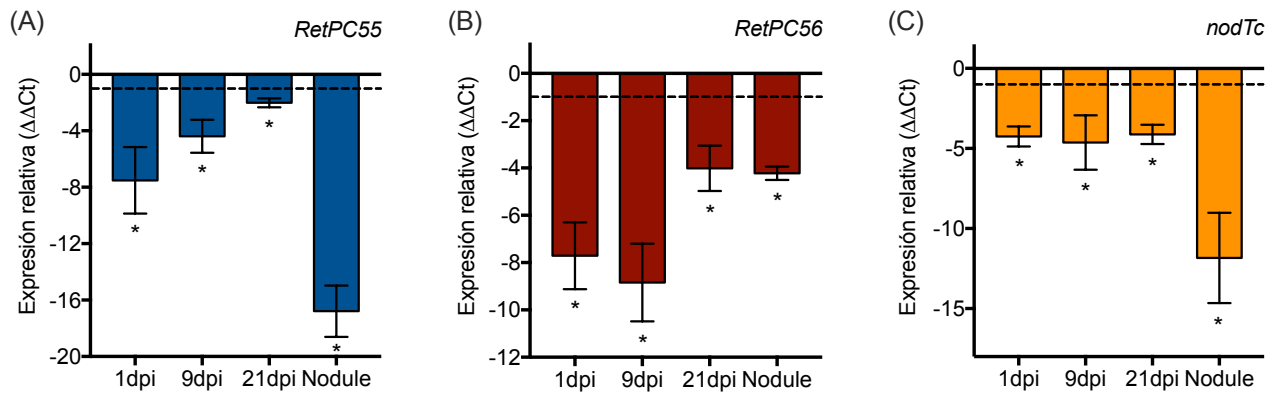


Figura 4.14 RetPC57 regula positivamente la expresión de los genes *RetPC55*, *RetPC56* y *nodTc* en las raíces de frijol. Semillas de frijol fueron inoculadas con las cepas WT o Δ RetPC57 de *R. etli*. La expresión relativa normalizada (Δ RetPC57:WT) de los genes se determinó en raíces de 1, 9 y 21 dpi, y en nódulos de 21 dpi. El gen *rpoA* fue usado para normalizar la expresión de los genes. Cuando los valores eran menores a 1, calculamos el valor inverso (WT: Δ RetPC57) de los datos y el signo del producto se invirtió. Los datos son el promedio de valores de tres réplicas de tres muestras independientes en un experimento de qRT-PCR. (*) diferencia significativa comparada con los valores de plantas inoculadas con la WT ($P \leq 0.05$, prueba t-student).

También analizamos la expresión de otros genes cuyos productos se predice que codifican proteínas que pertenecen a las bombas de eflujo de la familia RND o proteínas que pertenecen a los sistemas de bombas de eflujo MFS. Observamos diferentes patrones de expresión. De forma similar a los genes *nod*, *RetPC55*, *RetPC56* y *nodTc*, la expresión de los genes *rmrA*, *rmrR*, que codifica al probable regulador de los genes *rmrAB*, y *RHE_CH03357*, disminuye significativamente tanto en las raíces como en los nódulos de plantas inoculadas con la mutante Δ RetPC57 en comparación con las inoculadas con la cepa WT (Figura 4.15 A, B y C).

Mientras que el patrón de expresión de los genes *RHE_CH01192* y *RHE_CH01305* (Figura 4.16 A, B) es el mismo en las raíces inoculadas con la mutante que con la cepa WT, su expresión en los nódulos formados en plantas inoculadas con la cepa Δ RetPC57 es mucho menor que en los nódulos formados en las plantas inoculadas con la cepa WT.

En contraste, la ausencia del RetPC57 provocó una inducción de la expresión de los genes *mexE1* y *mexF1* (Figura 4.17 A y B, respectivamente). Estos resultados indican que en *R. etli*, el regulador RetPC57 es importante para la expresión adecuada de genes asociados con la producción de FN y genes asociados con el transporte de señales químicas durante el establecimiento de la simbiosis *R. etli* – *P. vulgaris*.

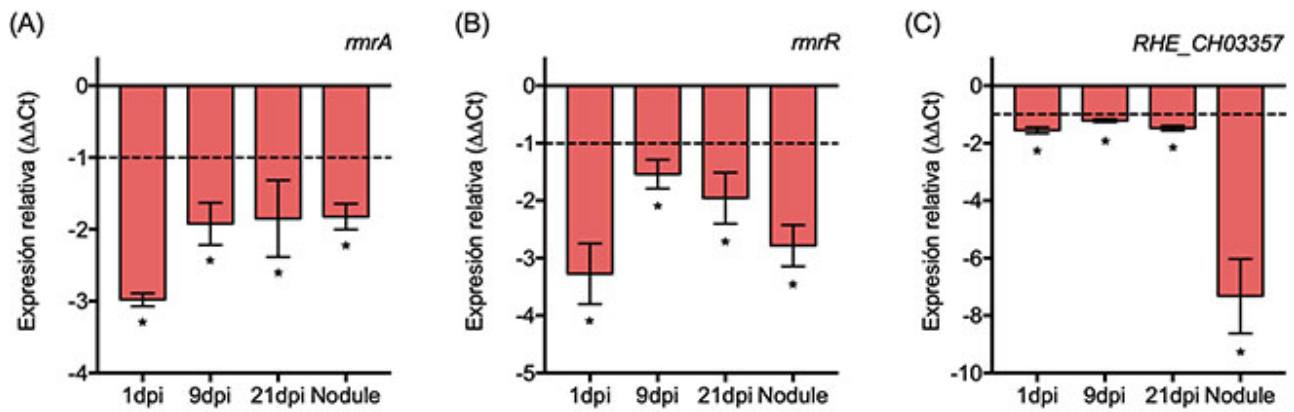


Figura 4.15 Patrón de expresión relativa de los genes *rmrA*, *rmrR* y *RHE_CH03357* en raíces y nódulos de frijol. Semillas de frijol fueron inoculadas con las cepas WT o Δ RetPC57 de *R. etli*. La expresión relativa normalizada (Δ RetPC57:WT) de los genes se determinó en raíces de 1, 9 y 21 dpi, y en nódulos de 21 dpi. El gen *rpoA* fue usado para normalizar la expresión de los genes. Cuando los valores fueron menores a 1, calculamos el valor inverso (WT: Δ RetPC57) de los datos y el signo del producto se invirtió. Los datos son el promedio de valores de tres réplicas de tres muestras independientes en un experimento de qRT-PCR. (*) diferencia significativa comparada con los valores de plantas inoculadas con la WT ($P \leq 0.05$, prueba t-student).

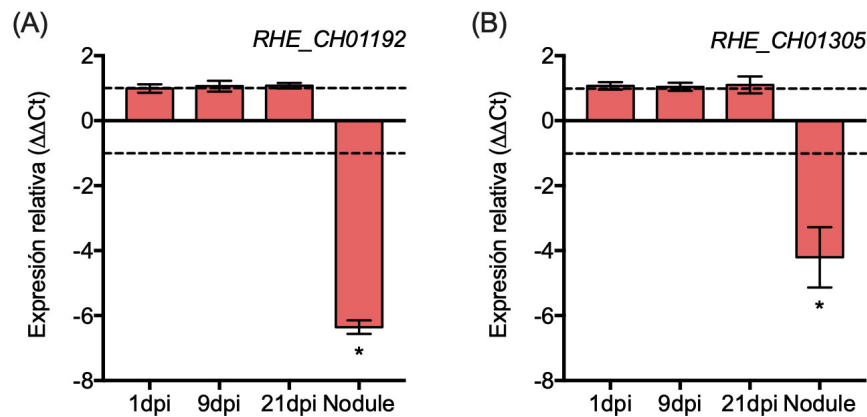


Figura 4.16 Expresión relativa de los genes *RHE_CH01192* y *RHE_CH01305* en raíces y nódulos de frijol. Semillas de frijol fueron inoculadas con las cepas WT o Δ RetPC57 de *R. etli*. La expresión relativa normalizada (Δ RetPC57:WT) de los genes fue determinada en raíces de 1, 9 y 21 dpi, y en nódulos de 21 dpi. El gen *rpoA* fue usado para normalizar la expresión. Cuando los valores fueron menores a 1, calculamos el valor inverso (WT: Δ RetPC57) de los datos y el signo del producto se invirtió. Los datos son el promedio de valores de tres réplicas de tres muestras independientes en un experimento de qRT-PCR. (*) diferencia significativa comparada con los valores de plantas inoculadas con la WT ($P \leq 0.05$, prueba t-student).

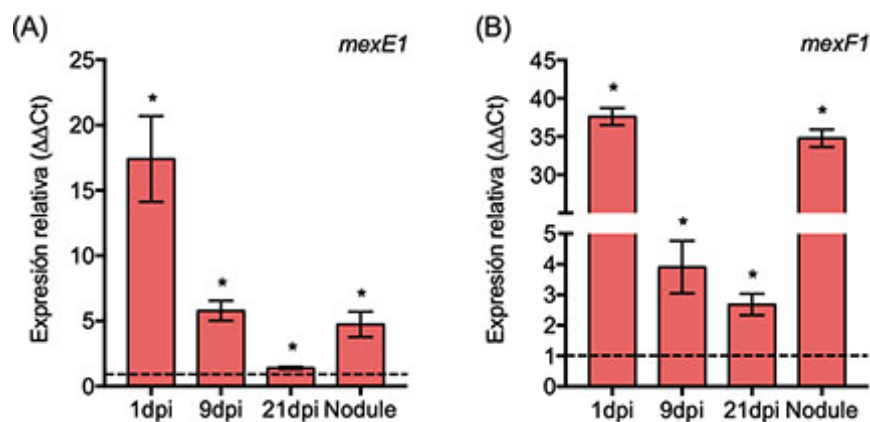


Figura 4.17 RetPC57 regula negativamente la expresión de los genes *mexE1* y *mexF1* relacionados con la síntesis de bombas de eflujo RND. Semillas de frijol fueron inoculadas con las cepas WT o Δ RetPC57 de *R. etli*. La expresión relativa normalizada (Δ RetPC57:WT) de los genes fueron determinados de raíces de 1, 9 y 21 dpi, y nódulos de 21 dpi. El gen *rpoA* fue usado para normalizar la expresión. Los datos son el promedio de valores de tres réplicas de tres muestras independientes en un experimento de qRT-PCR. (*) diferencia significativa comparada con los valores de plantas inoculadas con la WT ($P \leq 0.05$, prueba t-student).

El hecho de que la expresión de genes rhizobiales implicados en el reconocimiento mutuo de la leguminosa huésped esté afectada en la mutante Δ RetPC57, nos llevó a evaluar la expresión de genes vegetales implicados en el proceso de infección por rhizobia (Oldroyd, 2013; Nova-Franco et al., 2015; Roy et al., 2020). Analizamos la expresión de los genes *CYCLOPS*, *NSP2*, *NIN* y *NF-YA* en raíces inoculadas con la mutante Δ RetPC57 en comparación con raíces inoculadas con la cepa WT después de 1 dpi. Encontramos que, a excepción de *CYCLOPS*, la expresión de genes simbióticos de frijol relacionados con la simbiosis con *Rhizobium* fue menor en raíces inoculadas con la mutante Δ RetPC57 (Figura 4.18). Adicionalmente, nuestro análisis de expresión reveló que la expresión del gen de la nodulina temprana *ENOD40*, involucrada en el desarrollo del nódulo (Kumagai et al., 2006; Oldroyd and Downie, 2008), es menor cuando usamos Δ RetPC57 como inoculante (Figura 4.18). En conjunto, nuestros datos de expresión fortalecen la idea de que la presencia del regulador RetPC57 es necesaria para una expresión adecuada de genes bacterianos y vegetales que son determinantes durante las etapas tempranas de la simbiosis rhizobia-leguminosa.

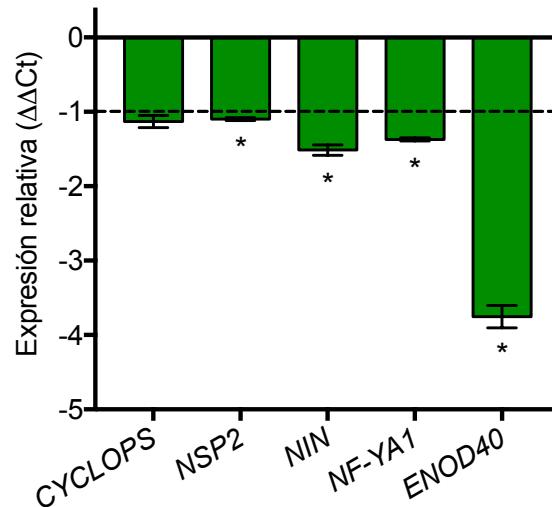


Figura 4.18 Expresión de genes de frijol común relacionados con la infección por rhizobia y nodulación temprana. Semillas de frijol fueron inoculadas con las cepas WT o Δ RetPC57 de *R. etli*. La expresión relativa normalizada (Δ RetPC57:WT) de los genes se determinó en raíces de 1 dpi. El gen de la ubiquitina *UBC9* se usó para la normalización de la expresión. Cuando los valores fueron menores a 1, calculamos el valor inverso (WT: Δ RetPC57) de los datos y el signo del producto se invirtió.. Los datos son el promedio de valores de tres réplicas de tres muestras independientes en un experimento de qRT-PCR. (*) diferencia significativa comparada con los valores de plantas inoculadas con la WT ($P \leq 0.05$, prueba t-student).

4.8 Genes esenciales para la fijación simbiótica de nitrógeno se sobre-expresan en nódulos formados por la mutante en RetPC57

El mecanismo de regulación que controla la FSN implica la participación de factores transcripcionales que controlan la expresión de los genes rizobiales *nif* y *fix*. Nuestros resultados mostraron que la ausencia del regulador RetPC57 mejoró la capacidad de fijar nitrógeno de *R. etli* CE3 con plantas de frijol (sección 4.5 de esta Tesis). Por lo tanto, analizamos la expresión de un conjunto de genes importantes para la fijación de nitrógeno, *hfixL*, *fxkR*, *fixKf*, *fnrNch*, *fnrNd*, *fixNd*, *nifA* y *nifH*, en bacteroides de nódulos de plantas de frijol inoculadas con la cepa WT o con la mutante Δ RetPC57. Nuestro análisis reveló que, a excepción de *fxkR*, la ausencia del regulador RetPC57 resulta en un aumento de la expresión de los genes estudiados (Figura 4.19 A, B).

El incremento en la expresión de los genes *nif* y *fix* bacterianos en los nódulos de plantas inoculadas con la mutante Δ RetPC57 correlaciona con una mayor expresión de genes que codifican enzimas relevantes del metabolismo de carbono y de nitrógeno en nódulos, como la fosfoenolpiruvato carboxilasa (*PEPC*) y glutamato sintasa (*GOGAT*) (Figura 4.20). En conjunto, estos datos sugieren que la regulación negativa de fijación de nitrógeno ejercida por RetPC57 implica cambios en la expresión de genes bacterianos y de la planta en el

nódulo, que participan en la fijación de nitrógeno y en el metabolismo de carbono y nitrógeno dentro de los nódulos.

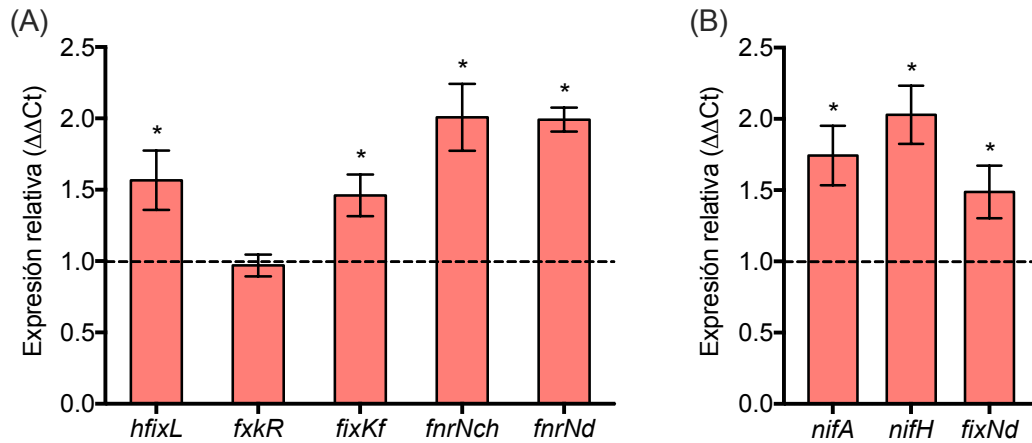


Figura 4.19 Expresión de genes simbióticos esenciales para la FSN en bacteroides de nódulos de *P. vulgaris* formados por las cepas WT y $\Delta RetPC57$. Semillas de frijol fueron inoculadas con las cepas *R. etli* WT y $\Delta RetPC57$. La expresión relativa normalizada ($\Delta RetPC57:WT$) se determinó en bacteroides de 21 dpi. El gen *rpoA* se utilizó para normalizar la expresión. Los datos son el promedio de valores de tres réplicas de tres muestras independientes en un experimento de qRT-PCR. (*) diferencia significativa comparada con los valores de plantas inoculadas con la WT ($P \leq 0.05$, prueba t-student).

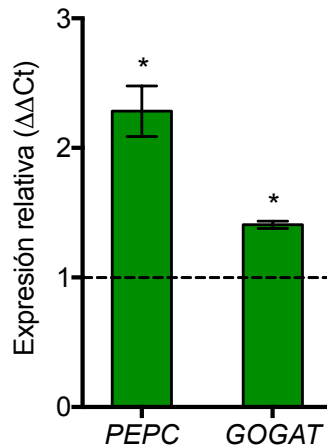


Figura 4.20 Expresión de genes simbióticos esenciales para el metabolismo de nitrógeno y de carbono en los nódulos de *P. vulgaris* inducidos por las cepas WT y $\Delta RetPC57$ de *R. etli*. Semillas de frijol inoculadas con las cepas WT y $\Delta RetPC57$. La expresión relativa normalizada ($\Delta RetPC57:WT$) fue determinada en nódulos de 21 dpi. El gen de ubiquitina *UBC9* se utilizó para normalizar la expresión. Los datos son el promedio de valores de tres réplicas de tres muestras independientes en un experimento de qRT-PCR. (*) diferencia significativa comparada con los valores de plantas inoculadas con la WT ($P \leq 0.05$, prueba t-student).

5. Discusión

Los reguladores OmpR/PhoB son los más caracterizados dentro de las diversas familias de reguladores de respuesta. El genoma de *R. etli* CE3 codifica 18 reguladores de este tipo, localizados en diferentes replicones (González et al., 2006), y cuya función, en la mayoría de ellos aún no ha sido descrita. Los resultados de este estudio proporcionan conocimientos novedosos sobre la participación de estos reguladores en diferentes etapas de la simbiosis de *R. etli* CE3 con su planta huésped *Phaseolus vulgaris*.

Anteriormente, se demostró la participación de diferentes reguladores tipo OmpR/PhoB en el control de la FSN (Lipa and Janczarek, 2020). Por ejemplo, en *S. meliloti*, ChvI y FeuP son importantes para la invasión de las raíces de alfalfa al regular la producción de succinoglicano y glucanos cíclicos, respectivamente (Griffitts et al., 2008; Bélanger et al., 2009; Wang et al., 2010; Vanderlinde and Yost, 2012). Por su parte, PhoB regula la respuesta a la limitación de fósforo e induce la expresión de genes implicados en la captación y metabolismo de fósforo, así como de genes encargados de la producción de exopolisacáridos y la protección celular (Bardin and Finan, 1998; Mendrygal and González, 2000; Krol and Becker, 2004; Yuan et al., 2006). En limitación de fósforo, PhoB regula positivamente la expresión de genes involucrados en la producción de galactoglucano EPSII requerido para la elongación del hilo de infección en la simbiosis con leguminosas y para la protección contra las respuestas de defensa de la planta (Niehaus et al., 1993; Fraysse et al., 2003; Bahlawane et al., 2008a). Por otro lado, Rem regula la expresión de los genes flagelares en *S. meliloti* y *R. leguminosarum* bv *viciae*. Su ausencia afecta la capacidad de nado de estas bacterias y probablemente su adhesión a superficies bióticas como las raíces de las leguminosas (Rotter et al., 2006; Tambalo et al., 2010). El regulador del ciclo celular CtrA controla la expresión de genes importantes para los estilos de vida saprófitos y simbióticos de *S. meliloti* (Barnett et al., 2001; De Nisco et al., 2014; Xue and Biondi, 2019). Los reguladores FxkR de *R. etli* CE3 y *S. meliloti* SM11 regulan la expresión de los genes *fix* requeridos para la actividad de la nitrogenasa y para la respiración microaeróbica dentro de nódulos de frijol y alfalfa, respectivamente (Zamorano-Sánchez et al., 2012; Reyes-González et al., 2016).

En este trabajo, demostramos que RetPC57, un regulador de respuesta de la familia OmpR no caracterizado previamente, tiene un papel importante en la simbiosis entre *R. etli* y frijol. El gen *RetPC57* está localizado en el plásmido pRet42c y se encuentra formando un operón con el gen *RetPC58* que codifica una proteína que es una histidina quinasa con la cual RetPC57 forma un sistema de dos componentes. El análisis del contexto genómico reveló que tanto el operón *RetPC57-RetPC58* como los genes *RetPC55*, *RetPC56* y *nodTc* están altamente conservados y mantienen una organización genética similar en bacterias fijadoras de nitrógeno. Tal conservación sugiere que este grupo de genes evolucionó conjunta y posiblemente conserva una función similar. Nuestros datos indican que *RetPC55*, *RetPC56* y *nodTc* codifican proteínas que forman parte de la estructura de las bombas de eflujo de la familia RND (Pidcock, 2006): una proteína transportadora ubicada en la membrana interna,

una proteína de fusión de membrana ubicada en el espacio periplásmico y una proteína de membrana externa, respectivamente. Demostramos que la expresión de estos genes está bajo el control de RetPC57 en respuesta a exudados fenólicos y contribuyen a la interacción exitosa de *R. etli* con frijol común. Esta probable bomba de eflujo podría participar, junto con otros componentes como NodI y NodJ, en la secreción de FN y de moléculas señal adicionales derivadas de rizobia, como los succinoglicanos, que juegan un papel crucial en la progresión de la infección por rizobia más allá de las células epidérmicas de la raíz (Kawaharada et al., 2015; Maillet et al., 2020). En *R. etli* y *R. leguminosarum* bv. trifolii, las mutaciones en los genes *nodI* y *nodJ* afectan la cantidad de FN secretados (McKay and Djordjevic, 1993; Cárdenas et al., 1996). Las mutantes NodI y NodJ de *R. etli* presentan un fenotipo de nodulación retardada y una reducción en el número de nódulos formados, lo que sugiere que sistemas de transporte adicionales están involucrados en la secreción de FN en *R. etli* (Cárdenas et al., 1996). La caracterización funcional de RetPC55 y RetPC56, a través del análisis fenotípico de mutantes en estos genes es necesaria para comprobar esta hipótesis.

Se ha demostrado que los sistemas de eflujo MDR contribuyen a una interacción simbiótica exitosa entre las bacterias fijadoras de nitrógeno y sus plantas hospederas, previniendo la acumulación de compuestos tóxicos derivados de las plantas (González-Pasayo and Martínez-Romero, 2000; Karunakaran et al., 2009; Lindemann et al., 2010; Eda et al., 2011; Santos et al., 2014; Tett et al., 2014). El genoma de *R. etli* CFN42 posee 44 genes que codifican probables bombas de eflujo de antimicrobianos (Ormeño-Orrillo et al., 2012). En este estudio, demostramos que, en condiciones simbióticas, la funcionalidad del regulador RetPC57 afecta la respuesta transcripcional de genes de *R. etli* que forman parte de los sistemas de eflujo MDR. Ha sido reportado que en mutantes RmrAB de *R. etli* se afecta la nodulación en frijol y son más sensibles a las fitoalexinas, flavonoides y ácido salicílico, compuestos derivados de la planta (González-Pasayo and Martínez-Romero, 2000). Curiosamente, en *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 una mutación en *rmrA* no afecta la susceptibilidad a los antimicrobianos de la cepa. No solo se ha encontrado que la expresión del gen *rmrA* es diferente entre estas dos bacterias estrechamente relacionadas, al contrario de lo que se observa en *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 (Tett et al., 2014), encontramos que en *R. etli*, se requiere de un regulador RetPC57 funcional para la expresión dentro del nódulo del gen RHE_CH01192 (ortólogo putativo del gen RL1329). También observamos que los genes *mexE1* y *mexF1* se inducen en la mutante Δ RetPC57. En *R. etli* se desconoce el papel de estos genes, sin embargo, en *A. tumefaciens* mutantes defectuosas en estos genes son menos virulentas en respuesta a acetosiringona y más sensibles a los efectos tóxicos del cloranfenicol (Binns and Zhao, 2020). Reportes anteriores indican que la expresión del gen *nodTc* de *R. etli* es constitutiva y que su ausencia no afecta a la nodulación con frijol ni la sensibilidad a compuestos tóxicos (Hernández-Mendoza et al., 2007). Sin embargo, en este trabajo hemos demostrado que la expresión del gen *nodTc* se induce en simbiosis. La discrepancia entre Hernández-Mendoza y col. (2007) y este trabajo puede deberse a la presencia de múltiples bombas de eflujo con funciones redundantes. Por otra

parte, también se ha demostrado que la especificidad del huésped es requerida para el funcionamiento de las bombas de flujo (Lindemann et al., 2010). Por ejemplo, nuestros resultados mostraron claramente que la simbiosis con plantas de frijol común induce la expresión de los genes *RetPC55*, *RetPC56* y *nodTc*. Por el contrario, análisis del transcriptoma de *R. leguminosarum*, muestra que los genes *pRL100186-87* y *pRL100291* (los ortólogos putativos de estos genes) están regulados negativamente en los bacteroides de nódulos de frijol común y guisante (Green et al., 2019). Aún más, mutantes en los genes *pRL100186-87* mejoran la colonización bacteriana en las raíces del guisante (Wheatley et al., 2020). En *R. leguminosarum* bv. *viciae*, mutantes en el gen *nodT* conducen a un retraso en la nodulación en *Trifolium subterraneum* pero no en plantas de *Vicia sativa* (Canter Cremers et al., 1989). Sin embargo, en una mutante *nodT* de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* la nodulación no se ve afectada (Spaink et al., 1995).

Aunque el mecanismo específico de acción del regulador RetPC57 aún no está claro, una posibilidad es que el SDC RetPC57-RetPC58 promueva, directa o indirectamente, la expresión adecuada de los genes *nod* necesarios para la síntesis y secreción óptima de los FN indispensables para la infección e inicio de la formación del nódulo. Se conoce que algunos SDC participan como reguladores de la expresión de los sistemas MDR, por lo que la otra posibilidad es que este SDC pueda contribuir a prevenir la acumulación de compuestos vegetales tóxicos para proteger al bacteroide dentro de los nódulos mediante la modificación de la expresión de los sistemas MDR. Para explorar estas posibilidades es necesaria la obtención de evidencias experimentales en el futuro.

A diferencia de otros reguladores tipo OmpR analizados en este estudio, únicamente la ausencia de RetPC57 afectó la motilidad de nado de *R. etli*. La motilidad de nado de los rhizobia es crucial en los primeros eventos de la simbiosis con las leguminosas, particularmente en su adhesión a los pelos radiculares, lo que también es relevante para mantener una comunicación óptima con la leguminosa huésped (Caetano Anollés and Favelukes, 1986; Caetano-Anollés et al., 1988; Wei and Bauer, 1998). Reportes anteriores han demostrado que las plantas inoculadas con rhizobia defectuosos en la motilidad flagelar o en quimiotaxis retrasan la infección y el desarrollo de los nódulos (Caetano Anollés and Favelukes, 1986; Fujishige et al., 2006). Por lo tanto, la motilidad flagelar en los rhizobia es importante en las etapas tempranas de la simbiosis, ya sea para competir por los sitios de iniciación de la formación del nódulo en la raíz del huésped o para la adhesión de las bacterias a los sitios susceptibles de infección en la raíz de la leguminosa (Caetano-Anollés et al., 1988; Wei and Bauer, 1998; Vicario et al., 2015; Zheng et al., 2015). Las bases moleculares y la regulación de la motilidad de nado no han sido caracterizadas en *R. etli*; sin embargo, esta bacteria tiene genes ortólogos de los genes flagelares presentes en *S. meliloti* y *R. leguminosarum* bv. *viciae* y sus reguladores conocidos VisN, VisR y Rem (Sourjik et al., 2000; González et al., 2006; Rotter et al., 2006; Tambalo et al., 2010). Se ha reportado que los genes de quimiotaxis y motilidad están regulados negativamente en bacteroides de *S. meliloti* (Becker et al., 2004; Capela et al., 2006) y *R. leguminosarum* (Yost

et al., 2004; Karunakaran et al., 2009; Tambalo et al., 2010). La etapa simbiótica en la que se produce esta regulación sigue siendo desconocida, sin embargo, parece que no depende de reguladores simbióticos conocidos (Scharf et al., 2016). Basándonos en nuestros resultados, planteamos la hipótesis de que RetPC57 puede ser un importante modulador de la transcripción de genes flagelares en diferentes etapas del proceso de infección y colonización.

En este trabajo demostramos que cuando se utiliza una cepa mutante Δ RetPC57 como inoculante de frijol, la adhesión a las raíces se retarda y forma un menor número de nódulos. Sin embargo, los nódulos inducidos por esta mutante presentan una mayor actividad de nitrogenasa en comparación con los nódulos de las plantas de frijol inoculadas con WT. La comunicación óptima entre los rhizobia y las raíces de su planta hospedera asegura la activación de dos programas genéticos vegetales que controlan de manera independiente la infección por rhizobia y el desarrollo del nódulo (Tsyganov et al., 2002; Suzaki et al., 2015; Liu et al., 2019; Roy et al., 2020). El número reducido de nódulos inducidos por la mutante Δ RetPC57 podría explicarse, al menos parcialmente, por la menor expresión de los genes implicados en la síntesis de FN (*nodA*, *nodB*). Adicionalmente, las plantas inoculadas con la cepa Δ RetPC57 mostraron también una reducción en la expresión de genes que participan en la cascada de señalización que controla el proceso de infección por rhizobia (*CYCLOPS*, *NSP2*, *NIN* y *NF-YA*) y el desarrollo de los nódulos (*ENOD40*), en comparación con las plantas inoculadas con la cepa silvestre. Diferentes estudios en varias leguminosas indican que un retraso en la activación del proceso de infección por rhizobia resulta en un retraso en la activación del programa de desarrollo del nódulo (Oldroyd and Downie, 2008; Murray, 2011; Oldroyd et al., 2011; Roy et al., 2020). El retraso observado durante la infección inicial por la cepa Δ RetPC57 parece traducirse en una menor capacidad para promover la nodulación. La actividad de fijación de nitrógeno fue mayor en los nódulos ocupados por la cepa que carece del gen *RetPC57*, coincidiendo con un aumento en la expresión de genes bacterianos involucrados en la respiración microaeróbica (*hfixL*, *fixKf*, *fnrNch*, *fnrNd* y *fixNd*) y en la biosíntesis de la nitrogenasa (*nifA* y *nifH*). Aún no está claro si RetPC57 ejerce una regulación directa o indirecta sobre estos genes. Hasta ahora, *fixKf* es el único gen que se sabe que está regulado por una proteína similar a OmpR (FxrR) (Zamorano-Sánchez et al., 2012) y desconocemos si RetPC57 podría reconocer el mismo sitio regulatorio en *cis* que los reconocidos por FxrR. Es posible que RetPC57 active reguladores transcripcionales adicionales que, a su vez, promuevan la expresión de genes simbióticos. En esta dirección, se están realizando experimentos para conocer la expresión génica global que ejerce el regulador RetPC57.

La ausencia de RetPC57 no solo afecta la expresión de genes del bacterioide, también en las raíces de la planta ocurren cambios importantes en la expresión de genes de frijol. Esto es, genes que codifican las enzimas fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y glutamato sintasa (GOGAT), que son cruciales para un metabolismo eficiente del carbono y del nitrógeno en el nódulo (Udvardi and Poole, 2013) mostraron una mayor expresión en los

nódulos inducidos por la mutante Δ RetPC57. Esta expresión alterada de genes de frijol probablemente responda a cambios en el requerimiento del carbono por los bacteroides y/o al exceso de amonio debido a la fijación mejorada de nitrógeno. Es ampliamente conocido que la fijación de nitrógeno en los nódulos de las raíces es un proceso energéticamente costoso, por lo que las plantas leguminosas controlan la cantidad de nódulos formados principalmente a través del mecanismo regulador llamado autorregulación de la nodulación (AON) (Reid et al., 2011). Aquí demostramos que los nódulos formados en las plantas de frijol inoculadas con la mutante Δ RetPC57 son efectivos, e incluso más grandes y con una mayor capacidad de fijar nitrógeno que los formados en las plantas inoculadas con la WT, indicándonos que la funcionalidad de los bacteroides de Δ RetPC57 dentro del nódulo compensa la fijación de nitrógeno con un menor número de nódulos formados.

6. Conclusiones

Los resultados de este trabajo agregan un nuevo elemento a los sofisticados circuitos reguladores de la transcripción que gobiernan la simbiosis entre *R. etli* y *Phaseolus vulgaris*. Una relación simbiótica eficaz entre las plantas leguminosas y los rizobios que fijan N_2 requiere determinantes genéticos tanto de las plantas hospederas como de las bacterias. En este trabajo identificamos y caracterizamos la participación de un nuevo regulador de respuesta tipo OmpR de *R. etli*, RetPC57. Hemos descrito el papel funcional de RetPC57 a lo largo de las diferentes etapas del proceso simbiótico. Los resultados indican que RetPC57 tiene una función reguladora directa o indirecta para la activación o represión de la expresión de genes bacterianos y vegetales involucrados en la nodulación, el metabolismo de los nódulos y la fijación de nitrógeno. Este gen es necesario para la adecuada motilidad de la bacteria, así como para la formación de los nódulos. Sin embargo, ejerce un control negativo sobre la fijación de nitrógeno. Nuestros resultados también proporcionan conocimiento novedoso relacionado con la regulación de la expresión de los sistemas de bombas de eflujo MDR en los rizobias, las cuales son importantes para que se lleve a cabo una simbiosis exitosa. En conclusión, este estudio contribuye a comprender mejor los mecanismos moleculares que permiten la infección de las leguminosas por los rizobias, el desarrollo de los nódulos y la fijación simbiótica de nitrógeno (SNF) en la simbiosis *Rhizobium etli* - *Phaseolus vulgaris*, una asociación de gran importancia ecológica.

Basados en el conocimiento actual del mecanismo de regulación de los genes que participan en el establecimiento de una simbiosis efectiva entre *R. etli* y el frijol común, y los resultados de este estudio, proponemos un modelo de la red de regulación de RetPC57 (figura 6.1 y 6.2).

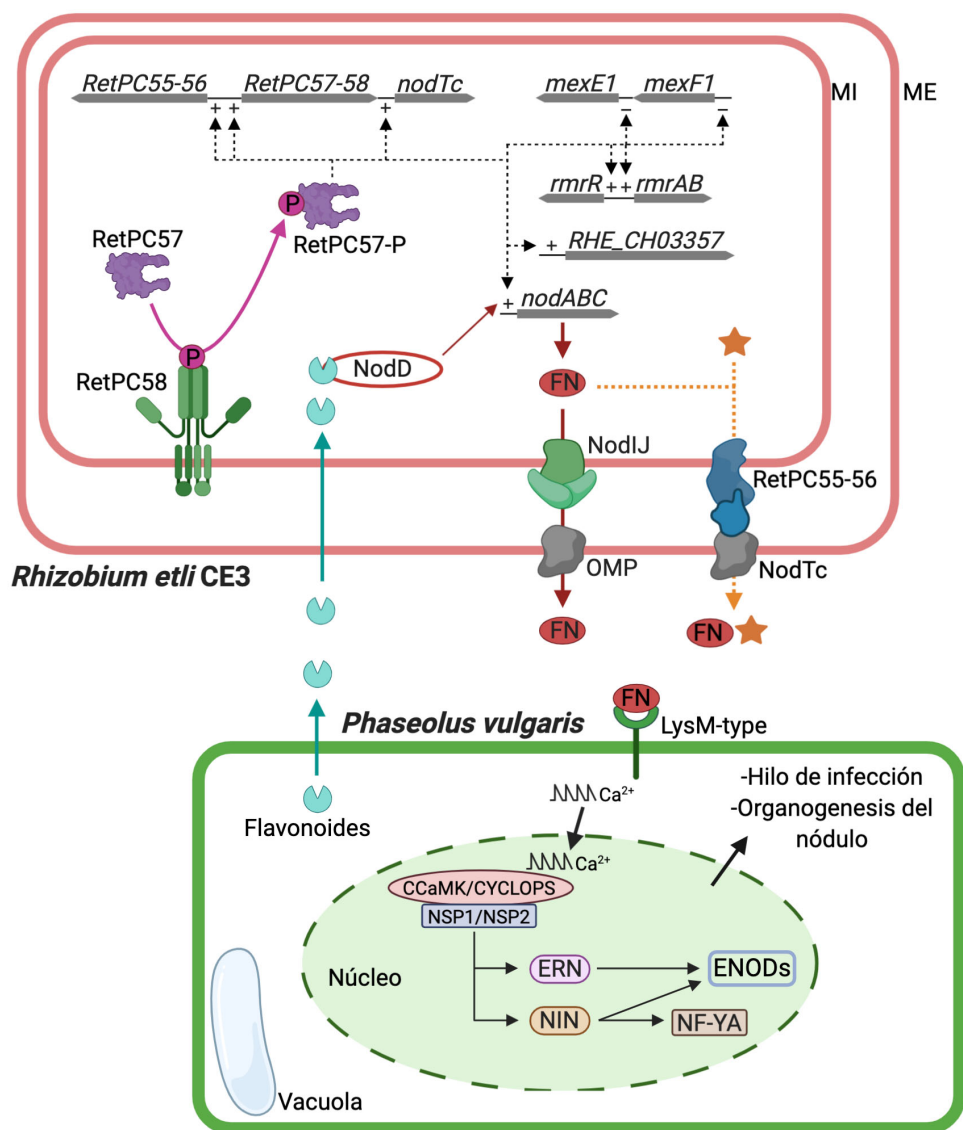
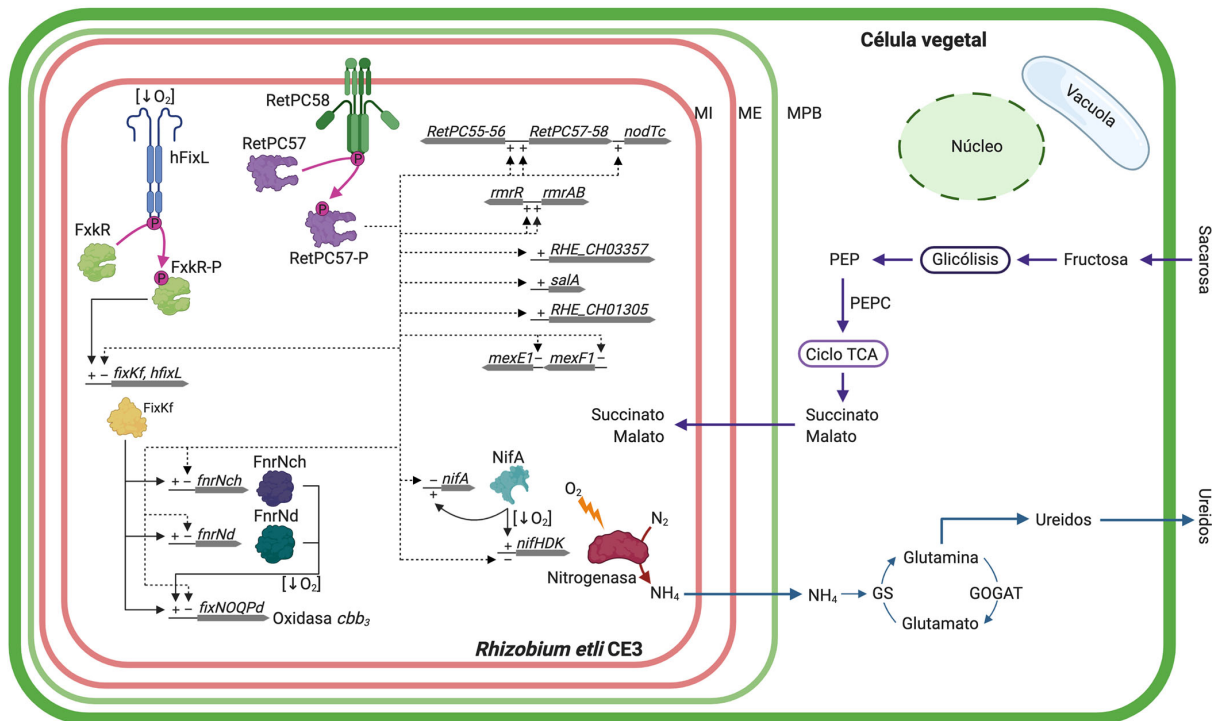


Figura 6.1 Participación del regulador RetPC57 en las etapas tempranas de la simbiosis *R. etli* – *P. vulgaris*. La interacción simbiótica *Rhizobium* – leguminosa inicia con un diálogo molecular entre ambos simbioses en la rizosfera. Los flavonoides secretados por la raíz son detectados por el regulador transcripcional bacteriano NodD (línea azul claro), el cual activa la expresión de los genes que participan en la síntesis y secreción de los factores de nodulación (FN) (línea roja). Los FN sintetizados son secretados a la rizosfera a través del transportador NodIJ (línea roja) (McKay and Djordjevic, 1993; Cárdenas et al., 1996) activando las cascadas de señalización en la que participan los genes de la planta *CYCLOPS*, *NSP2*, *NIN*, *NF-YA* y *ENOD40*. Esto resulta en la activación de la formación del hilo de infección y del nódulo. De acuerdo con los resultados de este estudio, el SDC RetPC58/RetPC57 regula (directa o indirectamente) la expresión de genes que codifican para la síntesis y secreción de los FN y bombas de eflujo MDR (líneas negras punteadas). La probable bomba RND formada por RetPC55-RetPC56-NodTc podría estar participando junto con NodIJ, en la secreción de FN o de moléculas señal (estrella naranja) importantes para la simbiosis (línea naranja punteadas). En líneas rosas indica la transferencia del grupo fosforilo de la HK al RR. Bomba RND: MexE1-MexF1. Bombas MFS: RmrAB, RHE_CH03357. RmrR, regulador transcripcional tipo TetR de bombas MDR. MI, membrana interna. ME, membrana externa.



6.2 Participación del regulador RetPC57 en la etapa de fijación de nitrógeno de la simbiosis *R. etli* – *P. vulgaris*. El nódulo provee al bacteroide fuentes de carbono, fósforo y otros nutrientes y el ambiente de bajo oxígeno necesario para la actividad de la nitrogenasa (línea morada). A cambio, el bacteroide le provee a la planta el nitrógeno en forma de amonio (línea azul). En respuesta a las bajas concentraciones de oxígeno, se activa la red de regulación de los genes *fix* y *nif* que codifican la oxidasa terminal de alta afinidad *cbb₃* y la nitrogenasa (líneas negras; Girard et al., 2000; López et al., 2001; Zamorano-Sánchez et al., 2012). De acuerdo con los resultados de este estudio, el SDC RetPC58-RetPC57 participa en la regulación de la expresión de genes que codifican bombas MDR, genes involucrados en la regulación de los genes *fix* y *nif*, así como en la expresión de su propio locus (líneas negras punteadas). En líneas rosas se indica la transferencia del grupo fosforilo de la HK al RR. Bombas RND: MexE1-MexF1, RHE_CH01305. Bombas MFS: RmrAB, SalA, RHE_CH03357. RmrR, regulador transcripcional tipo TetR de bombas MDR. MI, membrana interna. ME, membrana externa. MPB, membrana peribacteroidal. PEP, fosfoenolpituvato. PEPC, PEP-carboxilasa. GS, glutamino sintetasa. GOGAT, glutamato sintasa.

7. Perspectivas

El regulador RetPC57 interviene en la simbiosis de *R. etli* con las raíces de frijol común en los estadios tempranos de la interacción y durante el proceso de fijación de nitrógeno. Nuestros resultados muestran claramente que la ausencia de este regulador modifica la expresión de algunos genes tanto de la planta como de la bacteria, pero desconocemos como se lleva a cabo esta regulación (directa o indirecta) y que tan general es esta regulación.

El análisis del transcriptoma de la mutante RetPC57 en ambas etapas de la simbiosis con frijol podría darnos información más precisa de cómo regula el proceso simbiótico y las vías en las que participa durante el establecimiento de la simbiosis (1 dpi) o bien durante la fijación de nitrógeno (nódulos de 21 dpi). Adicionalmente, el análisis de la región regulatoria de los genes expresados diferencialmente permitirá la identificación de la probable caja de unión de RetPC57 y comprobarlo mediante ensayos tipo EMSA (“Electrophoretic Mobility Shift Assay”) o “DNA footprinting”.

Una de las preguntas más interesantes que surgen de nuestros resultados es si RetPC57 está involucrado en la síntesis o en la secreción de factores de nodulación. Por lo que es indispensable la cuantificación de dichos FN en la mutante RetPC57 mediante HPLC (“High Performance Liquid Chromatography”) o TLC (“Thin Layer Chromatography”), comparando con las cepas de *R. etli* silvestre y mutantes NodIJ.

El análisis de fenotipos simbióticos en mutantes en los genes *RetPC55*, *RetPC56* y *nodTc*, permitirá determinar si las proteínas codificadas por estos genes constituyen una bomba de eflujo de la familia RND, cuya función es contribuir a secretar moléculas señal de la bacteria importantes para la simbiosis, y/o prevenir la acumulación de compuestos derivados de la planta.

Los reguladores tipo OmpR que han sido estudiados en Rhizobiales muestran que tienen un papel importante en la simbiosis *Rhizobium* – leguminosa, y probablemente otros reguladores de la familia OmpR, cuya función aún es desconocida, están involucrados en este proceso. Por lo tanto, es importante continuar con el estudio de estos reguladores para determinar su participación en este proceso, así como su posible interacción y probable redundancia funcional.

8. Referencias

- Altamirano-Silva, P., Meza-Torres, J., Castillo-Zeledón, A., Ruiz-Villalobos, N., Zuniga-Pereira, A.M., Chacón-Díaz, C., et al. (2018). *Brucella abortus* Senses the Intracellular Environment through the BvrR/BvrS Two-Component System, Which Allows *B. abortus* To Adapt to Its Replicative Niche. *Infect Immun* 86(4). doi: 10.1128/IAI.00713-17.
- Altenhoff, A.M., Glover, N.M., Train, C.M., Kaleb, K., Warwick Vesztrocy, A., Dylus, D., et al. (2018). The OMA orthology database in 2018: retrieving evolutionary relationships among all domains of life through richer web and programmatic interfaces. *Nucleic Acids Res* 46(D1), D477-D485. doi: 10.1093/nar/gkx1019.
- Alvarez-Ortega, C., Olivares, J., and Martínez, J.L. (2013). RND multidrug efflux pumps: what are they good for? *Front Microbiol* 4, 7. doi: 10.3389/fmicb.2013.00007.
- Anand, A., Uppalapati, S.R., Ryu, C.M., Allen, S.N., Kang, L., Tang, Y., et al. (2008). Salicylic acid and systemic acquired resistance play a role in attenuating crown gall disease caused by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol* 146(2), 703-715. doi: 10.1104/pp.107.111302.
- Bahlawane, C., Baumgarth, B., Serrania, J., Rüberg, S., and Becker, A. (2008a). Fine-tuning of galactoglucan biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti* by differential WggR (ExpG)-, PhoB-, and MucR-dependent regulation of two promoters. *J Bacteriol* 190(10), 3456-3466. doi: 10.1128/JB.00062-08.
- Bahlawane, C., McIntosh, M., Krol, E., and Becker, A. (2008b). *Sinorhizobium meliloti* regulator MucR couples exopolysaccharide synthesis and motility. *Mol Plant Microbe Interact* 21(11), 1498-1509. doi: 10.1094/MPMI-21-11-1498.
- Barakat, M., Ortet, P., and Whitworth, D.E. (2011). P2CS: a database of prokaryotic two-component systems. *Nucleic Acids Res* 39(Database issue), D771-776. doi: 10.1093/nar/gkq1023.
- Bardin, S.D., and Finan, T.M. (1998). Regulation of phosphate assimilation in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*. *Genetics* 148(4), 1689-1700.
- Barnett, M.J., Hung, D.Y., Reisenauer, A., Shapiro, L., and Long, S.R. (2001). A homolog of the CtrA cell cycle regulator is present and essential in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 183(10), 3204-3210. doi: 10.1128/JB.183.10.3204-3210.2001.
- Barnett, M.J., and Long, S.R. (2018). Novel Genes and Regulators That Influence Production of Cell Surface Exopolysaccharides in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 200(3). doi: 10.1128/JB.00501-17.
- Bauer, E., Kaspar, T., Fischer, H.M., and Hennecke, H. (1998). Expression of the fixR-nifA operon in *Bradyrhizobium japonicum* depends on a new response regulator, RegR. *J Bacteriol* 180(15), 3853-3863. doi: 10.1128/JB.180.15.3853-3863.1998.
- Becker, A., Berges, H., Krol, E., Bruand, C., Ruberg, S., Capela, D., et al. (2004). Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions. *Mol Plant Microbe Interact* 17(3), 292-303. doi: 10.1094/MPMI.2004.17.3.292.
- Belanger, L., and Charles, T.C. (2013). Members of the *Sinorhizobium meliloti* ChvI regulon identified by a DNA binding screen. *BMC Microbiol* 13, 132. doi: 10.1186/1471-2180-13-132.
- Bélanger, L., Dimmick, K.A., Fleming, J.S., and Charles, T.C. (2009). Null mutations in *Sinorhizobium meliloti* *exoS* and *chvI* demonstrate the importance of this two-component regulatory system for symbiosis. *Mol Microbiol* 74(5), 1223-1237. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06931.x.
- Berg, H.C. (2003). The rotary motor of bacterial flagella. *Annu Rev Biochem* 72, 19-54. doi: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161737.
- Bhattacharya, A., Sood, P., and Citovsky, V. (2010). The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. *Mol Plant Pathol* 11(5), 705-719. doi: 10.1111/j.1364-3703.2010.00625.x.
- Binns, A.N., and Zhao, J. (2020). The MexE/MexF/AmeC Efflux Pump of *Agrobacterium tumefaciens* and Its Role in Ti Plasmid Virulence Gene Expression. *J Bacteriol* 202(8). doi: 10.1128/JB.00609-19.
- Biondi, E.G., Reisinger, S.J., Skerker, J.M., Arif, M., Perchuk, B.S., Ryan, K.R., et al. (2006). Regulation of the bacterial cell cycle by an integrated genetic circuit. *Nature* 444(7121), 899-904. doi: 10.1038/nature05321.
- Bittinger, M.A., Gross, J.A., Widom, J., Clardy, J., and Handelsman, J. (2000). *Rhizobium etli* CE3 carries *vir* gene homologs on a self-transmissible plasmid. *Mol Plant Microbe Interact* 13(9), 1019-1021. doi: 10.1094/MPMI.2000.13.9.1019.
- Blanco, A.G., Sola, M., Gomis-Ruth, F.X., and Coll, M. (2002). Tandem DNA recognition by PhoB, a two-component signal transduction transcriptional activator. *Structure* 10(5), 701-713. doi: 10.1016/S0969-2126(02)00761-X.

- Blanco, P., Hernando-Amado, S., Reales-Calderon, J.A., Corona, F., Lira, F., Alcalde-Rico, M., et al. (2016). Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. *Microorganisms* 4(1). doi: 10.3390/microorganisms4010014.
- Braeken, K., Daniels, R., Vos, K., Fauvart, M., Bachaspatimayum, D., Vanderleyden, J., et al. (2008). Genetic determinants of swarming in *Rhizobium etli*. *Microb Ecol* 55(1), 54-64. doi: 10.1007/s00248-007-9250-1.
- Bravo, A., and Mora, J. (1988). Ammonium assimilation in *Rhizobium phaseoli* by the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway. *J Bacteriol* 170(2), 980-984. doi: 10.1128/jb.170.2.980-984.1988.
- Brom, S., García-de los Santos, A., Cervantes, L., Palacios, R., and Romero, D. (2000). In *Rhizobium etli* symbiotic plasmid transfer, nodulation competitiveness and cellular growth require interaction among different replicons. *Plasmid* 44(1), 34-43. doi: 10.1006/plas.2000.1469.
- Caetano Anollés, G., and Favelukes, G. (1986). Host-Symbiont Specificity Expressed during Early Adsorption of *Rhizobium meliloti* to the Root Surface of Alfalfa. *Appl Environ Microbiol* 52(2), 377-382.
- Caetano-Anollés, G., Wall, L.G., De Micheli, A.T., Macchi, E.M., Bauer, W.D., and Favelukes, G. (1988). Role of Motility and Chemotaxis in Efficiency of Nodulation by *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol* 86(4), 1228-1235. doi: 10.1104/pp.86.4.1228.
- Cangelosi, G.A., Ankenbauer, R.G., and Nester, E.W. (1990). Sugars induce the *Agrobacterium* virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(17), 6708-6712. doi: 10.1073/pnas.87.17.6708.
- Canter Cremers, H.C.J., Spaink, H.P., Wijffes, A.H.M., Pees, E., Wijffelman, C.A., Okker, R.J.H., et al. (1989). Additional nodulation genes on the Sym plasmid of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae. *Plant Molecular Biology* 13, 163-174. doi: 10.1007/BF00016135.
- Capela, D., Filipe, C., Bobik, C., Batut, J., and Bruand, C. (2006). *Sinorhizobium meliloti* differentiation during symbiosis with alfalfa: a transcriptomic dissection. *Mol Plant Microbe Interact* 19(4), 363-372. doi: 10.1094/MPMI-19-0363.
- Cárdenas, L., Dominguez, J., Santana, O., and Quinto, C. (1996). The role of the *nodI* and *nodJ* genes in the transport of Nod metabolites in *Rhizobium etli*. *Gene* 173(2), 183-187. doi: 10.1016/0378-1119(96)00166-7.
- Carlyon, R.E., Ryther, J.L., VanYperen, R.D., and Griffiths, J.S. (2010). FeuN, a novel modulator of two-component signalling identified in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Microbiol* 77(1), 170-182. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07198.x.
- Catoira, R., Galera, C., de Billy, F., Penmetsa, R.V., Journet, E.P., Maillet, F., et al. (2000). Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway. *Plant Cell* 12(9), 1647-1666. doi: 10.1105/tpc.12.9.1647.
- Chang, C.H., Zhu, J., and Winans, S.C. (1996). Pleiotropic phenotypes caused by genetic ablation of the receiver module of the *Agrobacterium tumefaciens* VirA protein. *J Bacteriol* 178(15), 4710-4716.
- Charon, C., Sousa, C., Crespi, M., and Kondorosi, A. (1999). Alteration of *enod40* expression modifies *Medicago truncatula* root nodule development induced by *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell* 11(10), 1953-1966. doi: 10.1105/tpc.11.10.1953.
- Chen, E.J., Fisher, R.F., Perovich, V.M., Sabio, E.A., and Long, S.R. (2009). Identification of direct transcriptional target genes of ExoS/ChvI two-component signaling in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 191(22), 6833-6842. doi: 10.1128/JB.00734-09.
- Chen, I.A., Chu, K., Palaniappan, K., Pillay, M., Ratner, A., Huang, J., et al. (2019). IMG/M v.5.0: an integrated data management and comparative analysis system for microbial genomes and microbiomes. *Nucleic Acids Res* 47(D1), D666-D677. doi: 10.1093/nar/gky901.
- Cho, H., and Winans, S.C. (2005). VirA and VirG activate the Ti plasmid *repABC* operon, elevating plasmid copy number in response to wound-released chemical signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(41), 14843-14848. doi: 10.1073/pnas.0503458102.
- Chubiz, L.M., Purswani, J., Carroll, S.M., and Marx, C.J. (2013). A novel pair of inducible expression vectors for use in *Methylobacterium extorquens*. *BMC Res Notes* 6, 183. doi: 10.1186/1756-0500-6-183.
- Cosme, A.M., Becker, A., Santos, M.R., Sharypova, L.A., Santos, P.M., and Moreira, L.M. (2008). The outer membrane protein TolC from *Sinorhizobium meliloti* affects protein secretion, polysaccharide biosynthesis, antimicrobial resistance, and symbiosis. *Mol Plant Microbe Interact* 21(7), 947-957. doi: 10.1094/MPMI-21-7-0947.
- Danese, P.N., and Silhavy, T.J. (1998). CpxP, a stress-combative member of the Cpx regulon. *J Bacteriol* 180(4), 831-839. doi: 10.1128/JB.180.4.831-839.1998.
- Danhorn, T., Hentzer, M., Givskov, M., Parsek, M.R., and Fuqua, C. (2004). Phosphorus limitation enhances biofilm formation of the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens* through the PhoR-PhoB regulatory system. *J Bacteriol* 186(14), 4492-4501. doi: 10.1128/JB.186.14.4492-4501.2004.
- Daniels, R., Reynaert, S., Hoekstra, H., Verreth, C., Janssens, J., Braeken, K., et al. (2006). Quorum signal molecules as biosurfactants affecting swarming in *Rhizobium etli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(40), 14965-14970. doi: 10.1073/pnas.0511037103.

- De Nisco, N.J., Abo, R.P., Wu, C.M., Penterman, J., and Walker, G.C. (2014). Global analysis of cell cycle gene expression of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(9), 3217-3224. doi: 10.1073/pnas.1400421111.
- Dixon, R., and Kahn, D. (2004). Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat Rev Microbiol* 2(8), 621-631. doi: 10.1038/nrmicro954.
- Djordjevic, M.A., Mohd-Radzman, N.A., and Imin, N. (2015). Small-peptide signals that control root nodule number, development, and symbiosis. *J Exp Bot* 66(17), 5171-5181. doi: 10.1093/jxb/erv357.
- Dombrecht, B., Vanderleyden, J., and Michiels, J. (2001). Stable RK2-derived cloning vectors for the analysis of gene expression and gene function in gram-negative bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* 14(3), 426-430. doi: 10.1094/MPMI.2001.14.3.426.
- Domian, I.J., Quon, K.C., and Shapiro, L. (1997). Cell type-specific phosphorylation and proteolysis of a transcriptional regulator controls the G1-to-S transition in a bacterial cell cycle. *Cell* 90(3), 415-424.
- Domínguez-Ferreras, A., Munoz, S., Olivares, J., Soto, M.J., and Sanjuán, J. (2009). Role of potassium uptake systems in *Sinorhizobium meliloti* osmoadaptation and symbiotic performance. *J Bacteriol* 191(7), 2133-2143. doi: 10.1128/JB.01567-08.
- Du, D., Wang-Kan, X., Neuberger, A., van Veen, H.W., Pos, K.M., Piddock, L.J.V., et al. (2018). Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nat Rev Microbiol* 16(9), 523-539. doi: 10.1038/s41579-018-0048-6.
- Eda, S., Mitsui, H., and Minamisawa, K. (2011). Involvement of the SmeAB multidrug efflux pump in resistance to plant antimicrobials and contribution to nodulation competitiveness in *Sinorhizobium meliloti*. *Appl Environ Microbiol* 77(9), 2855-2862. doi: 10.1128/AEM.02858-10.
- Fåhræus, G. (1957). The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J Gen Microbiol* 16(2), 374-381. doi: 10.1099/00221287-16-2-374.
- Figurski, D.H., and Helinski, D.R. (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(4), 1648-1652. doi: 10.1073/pnas.76.4.1648.
- Fleischer, R., Heermann, R., Jung, K., and Hunke, S. (2007). Purification, reconstitution, and characterization of the CpxRAP envelope stress system of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 282(12), 8583-8593. doi: 10.1074/jbc.M605785200.
- Foreman, D.L., Vanderlinde, E.M., Bay, D.C., and Yost, C.K. (2010). Characterization of a gene family of outer membrane proteins (*ropB*) in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39SM and the role of the sensor kinase ChvG in their regulation. *J Bacteriol* 192(4), 975-983. doi: 10.1128/JB.01140-09.
- Fournier, J., Teillet, A., Chabaud, M., Ivanov, S., Genre, A., Limpens, E., et al. (2015). Remodeling of the infection chamber before infection thread formation reveals a two-step mechanism for rhizobial entry into the host legume root hair. *Plant Physiol* 167(4), 1233-1242. doi: 10.1104/pp.114.253302.
- Frayse, N., Couderc, F., and Poinso, V. (2003). Surface polysaccharide involvement in establishing the *rhizobium*-legume symbiosis. *Eur J Biochem* 270(7), 1365-1380. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03492.x.
- Freeman, Z.N., Dorus, S., and Waterfield, N.R. (2013). The KdpD/KdpE two-component system: integrating K(+) homeostasis and virulence. *PLoS Pathog* 9(3), e1003201. doi: 10.1371/journal.ppat.1003201.
- Frohlich, K.S., Forstner, K.U., and Gitai, Z. (2018). Post-transcriptional gene regulation by an Hfq-independent small RNA in *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acids Res*. doi: 10.1093/nar/gky765.
- Fujishige, N.A., Kapadia, N.N., De Hoff, P.L., and Hirsch, A.M. (2006). Investigations of *Rhizobium* biofilm formation. *FEMS Microbiol Ecol* 56(2), 195-206. doi: 10.1111/j.1574-6941.2005.00044.x.
- Gage, D.J. (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev* 68(2), 280-300. doi: 10.1128/MMBR.68.2.280-300.2004.
- Galperin, M.Y. (2006). Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. *J Bacteriol* 188(12), 4169-4182. doi: 10.1128/JB.01887-05.
- Galperin, M.Y. (2010). Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Curr Opin Microbiol* 13(2), 150-159. doi: 10.1016/j.mib.2010.01.005.
- Gao, R., Bouillet, S., and Stock, A.M. (2019). Structural Basis of Response Regulator Function. *Annu Rev Microbiol*. doi: 10.1146/annurev-micro-020518-115931.
- Gao, R., and Stock, A.M. (2009). Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu Rev Microbiol* 63, 133-154. doi: 10.1146/annurev.micro.091208.073214.
- Gao, R., Tao, Y., and Stock, A.M. (2008). System-level mapping of *Escherichia coli* response regulator dimerization with FRET hybrids. *Mol Microbiol* 69(6), 1358-1372. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06355.x.

- Gardner, S.G., Johns, K.D., Tanner, R., and McCleary, W.R. (2014). The PhoU protein from *Escherichia coli* interacts with PhoR, PstB, and metals to form a phosphate-signaling complex at the membrane. *J Bacteriol* 196(9), 1741-1752. doi: 10.1128/JB.00029-14.
- Geiger, O., Rohrs, V., Weissenmayer, B., Finan, T.M., and Thomas-Oates, J.E. (1999). The regulator gene *phoB* mediates phosphate stress-controlled synthesis of the membrane lipid diacylglycerol-N,N,N-trimethylhomoserine in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*. *Mol Microbiol* 32(1), 63-73.
- Gibson, K.E., Barnett, M.J., Toman, C.J., Long, S.R., and Walker, G.C. (2007). The symbiosis regulator CbrA modulates a complex regulatory network affecting the flagellar apparatus and cell envelope proteins. *J Bacteriol* 189(9), 3591-3602. doi: 10.1128/JB.01834-06.
- Girard, L., Brom, S., Dávalos, A., López, O., Soberón, M., and Romero, D. (2000). Differential regulation of *fixN*-reiterated genes in *Rhizobium etli* by a novel *fixL*-*fixK* cascade. *Mol Plant Microbe Interact* 13(12), 1283-1292. doi: 10.1094/MPMI.2000.13.12.1283.
- Girard, L., Valderrama, B., Palacios, R., Romero, D., and Dávila, G. (1996). Transcriptional activity of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* is affected by different environmental conditions. *Microbiology* 142, 2847-2856.
- Gomez-Hernández, N., Reyes-González, A., Sánchez, C., Mora, Y., Delgado, M.J., and Girard, L. (2011). Regulation and symbiotic role of *nirK* and *norC* expression in *Rhizobium etli*. *Mol Plant Microbe Interact* 24(2), 233-245. doi: 10.1094/MPMI-07-10-0173.
- González, V., Bustos, P., Ramírez-Romero, M.A., Medrano-Soto, A., Salgado, H., Hernández-Gonzalez, I., et al. (2003). The mosaic structure of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 and its relation to other symbiotic genome compartments. *Genome Biol* 4(6), R36. doi: 10.1186/gb-2003-4-6-r36.
- González, V., Santamaría, R.I., Bustos, P., Hernández-González, I., Medrano-Soto, A., Moreno-Hagelsieb, G., et al. (2006). The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(10), 3834-3839. doi: 10.1073/pnas.0508502103.
- González-Pasayo, R., and Martínez-Romero, E. (2000). Multiresistance genes of *Rhizobium etli* CFN42. *Mol Plant Microbe Interact* 13(5), 572-577. doi: 10.1094/MPMI.2000.13.5.572.
- Granados-Baeza, M.J., Gomez-Hernández, N., Mora, Y., Delgado, M.J., Romero, D., and Girard, L. (2007). Novel reiterated Fnr-type proteins control the production of the symbiotic terminal oxidase *ccb3* in *Rhizobium etli* CFN42. *Mol Plant Microbe Interact* 20(10), 1241-1249. doi: 10.1094/MPMI-20-10-1241.
- Green, R.T., East, A.K., Karunakaran, R., Downie, J.A., and Poole, P.S. (2019). Transcriptomic analysis of *Rhizobium leguminosarum* bacteroids in determinate and indeterminate nodules. *Microb Genom* 5(2). doi: 10.1099/mgen.0.000254.
- Griffitts, J.S., Carlyon, R.E., Erickson, J.H., Moulton, J.L., Barnett, M.J., Toman, C.J., et al. (2008). A *Sinorhizobium meliloti* osmosensory two-component system required for cyclic glucan export and symbiosis. *Mol Microbiol* 69(2), 479-490. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06304.x.
- Guefrachi, I., Verly, C., Kondorosi, É., Alunni, B., and Mergaert, P. (2015). "Role of the Bacterial BacA ABC-Transporter in Chronic Infection of Nodule Cells by *Rhizobium* Bacteria," in *Biological Nitrogen Fixation*, ed. F.J.d. Bruijn., 315-324.
- Gumerov, V.M., Ortega, D.R., Adebali, O., Ulrich, L.E., and Zhulin, I.B. (2020). MiST 3.0: an updated microbial signal transduction database with an emphasis on chemosensory systems. *Nucleic Acids Res* 48(D1), D459-D464. doi: 10.1093/nar/gkz988.
- Haag, A.F., Arnold, M.F., Myka, K.K., Kerscher, B., Dall'Angelo, S., Zanda, M., et al. (2013). Molecular insights into bacteroid development during *Rhizobium*-legume symbiosis. *FEMS Microbiology Reviews* 37(3), 364-383. doi: 10.1111/1574-6976.12003.
- Halbleib, C.M., and Ludden, P.W. (2000). Regulation of biological nitrogen fixation. *J Nutr* 130(5), 1081-1084. doi: 10.1093/jn/130.5.1081.
- Hardy, R.W., Holsten, R.D., Jackson, E.K., and Burns, R.C. (1968). The acetylene-ethylene assay for n_2 fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol* 43(8), 1185-1207. doi: 10.1104/pp.43.8.1185.
- Heavner, M.E., Qiu, W.G., and Cheng, H.P. (2015). Phylogenetic Co-Occurrence of ExoR, ExoS, and ChvI, Components of the RSI Bacterial Invasion Switch, Suggests a Key Adaptive Mechanism Regulating the Transition between Free-Living and Host-Invading Phases in Rhizobiales. *PLoS One* 10(8), e0135655. doi: 10.1371/journal.pone.0135655.
- Hernández-Mendoza, A., Nava, N., Santana, O., Abreu-Goodger, C., Tovar, A., and Quinto, C. (2007). Diminished redundancy of outer membrane factor proteins in rhizobiales: a *nodT* homolog is essential for free-living *Rhizobium etli*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 13(1-3), 22-34. doi: 10.1159/000103594.
- Hoang, H.H., Gurich, N., and González, J.E. (2008). Regulation of motility by the ExpR/Sin quorum-sensing system in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 190(3), 861-871. doi: 10.1128/JB.01310-07.

- Hubber, A., Vergunst, A.C., Sullivan, J.T., Hooykaas, P.J., and Ronson, C.W. (2004). Symbiotic phenotypes and translocated effector proteins of the *Mesorhizobium loti* strain R7A VirB/D4 type IV secretion system. *Mol Microbiol* 54(2), 561-574. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04292.x.
- Hubber, A.M., Sullivan, J.T., and Ronson, C.W. (2007). Symbiosis-induced cascade regulation of the *Mesorhizobium loti* R7A VirB/D4 type IV secretion system. *Mol Plant Microbe Interact* 20(3), 255-261. doi: 10.1094/MPMI-20-3-0255.
- Hynes, M.F., and McGregor, N.F. (1990). Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol Microbiol* 4(4), 567-574. doi: 10.1111/j.1365-2958.1990.tb00625.x.
- Iniesta, A.A., McGrath, P.T., Reisenauer, A., McAdams, H.H., and Shapiro, L. (2006). A phospho-signaling pathway controls the localization and activity of a protease complex critical for bacterial cell cycle progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(29), 10935-10940. doi: 10.1073/pnas.0604554103.
- Isidra-Arellano, M.C., Reyero-Saavedra, M.D.R., Sánchez-Correa, M.D.S., Pingault, L., Sen, S., Joshi, T., et al. (2018). Phosphate Deficiency Negatively Affects Early Steps of the Symbiosis between Common Bean and Rhizobia. *Genes (Basel)* 9(10). doi: 10.3390/genes9100498.
- Janczarek, M., K. Rachwal, A. Marzec, J. Grzadziel, M. Palusinska-Szys (2015). Signal molecules and cell-surface components involved in early stages of the legume-rhizobium interactions. *Applied Soil Ecology* 85, 94-113.
- Jenal, U., and Galperin, M.Y. (2009). Single domain response regulators: molecular switches with emerging roles in cell organization and dynamics. *Curr Opin Microbiol* 12(2), 152-160. doi: 10.1016/j.mib.2009.01.010.
- Jones, K.M., Kobayashi, H., Davies, B.W., Taga, M.E., and Walker, G.C. (2007). How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nat Rev Microbiol* 5(8), 619-633. doi: 10.1038/nrmicro1705.
- Karunakaran, R., Haag, A.F., East, A.K., Ramachandran, V.K., Prell, J., James, E.K., et al. (2010). BacA is essential for bacteroid development in nodules in Galeogoid, but not in Phaseoloid, Legumes. *Journal of Bacteriology* 192(11), 2920-2928. doi: 10.1128/JB.00020-10.
- Karunakaran, R., Ramachandran, V.K., Seaman, J.C., East, A.K., Mouhsine, B., Mauchline, T.H., et al. (2009). Transcriptomic analysis of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae in symbiosis with host plants *Pisum sativum* and *Vicia cracca*. *J Bacteriol* 191(12), 4002-4014. doi: 10.1128/JB.00165-09.
- Kassaw, T., J. Frugoli (2013). "Journey to Nodule Formation: From Molecular Dialogue to Nitrogen Fixation," in *Symbiotic Endophytes*, ed. R. Aroca. Springer, Berlin, Heidelberg), 3-25.
- Kawaharada, Y., Kelly, S., Nielsen, M.W., Hjuler, C.T., Gysel, K., Muszynski, A., et al. (2015). Receptor-mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection. *Nature* 523(7560), 308-312. doi: 10.1038/nature14611.
- Kelly, A.J., Sackett, M.J., Din, N., Quardokus, E., and Brun, Y.V. (1998). Cell cycle-dependent transcriptional and proteolytic regulation of FtsZ in *Caulobacter*. *Genes Dev* 12(6), 880-893.
- Khemthong, S., Nuonming, P., Dokpikul, T., Sukchawalit, R., and Mongkolsuk, S. (2019). Regulation and function of the flavonoid-inducible efflux system, *emrR-emrAB*, in *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Appl Microbiol Biotechnol* 103(14), 5763-5780. doi: 10.1007/s00253-019-09899-5.
- Kobayashi, H., De Nisco, N.J., Chien, P., Simmons, L.A., and Walker, G.C. (2009). *Sinorhizobium meliloti* CpdR1 is critical for coordinating cell cycle progression and the symbiotic chronic infection. *Mol Microbiol* 73(4), 586-600. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06794.x.
- Koronakis, V., Eswaran, J., and Hughes, C. (2004). Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs. *Annu Rev Biochem* 73, 467-489. doi: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.074104.
- Krell, T., Lacal, J., Busch, A., Silva-Jimenez, H., Guazzaroni, M.E., and Ramos, J.L. (2010). Bacterial sensor kinases: diversity in the recognition of environmental signals. *Annu Rev Microbiol* 64, 539-559. doi: 10.1146/annurev.micro.112408.134054.
- Krol, E., and Becker, A. (2004). Global transcriptional analysis of the phosphate starvation response in *Sinorhizobium meliloti* strains 1021 and 2011. *Mol Genet Genomics* 272(1), 1-17. doi: 10.1007/s00438-004-1030-8.
- Kumagai, H., Kinoshita, E., Ridge, R.W., and Kouchi, H. (2006). RNAi knock-down of ENOD40s leads to significant suppression of nodule formation in *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol* 47(8), 1102-1111. doi: 10.1093/pcp/pcj081.
- Lacroix, B., and Citovsky, V. (2013). The roles of bacterial and host plant factors in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *Int J Dev Biol* 57(6-8), 467-481. doi: 10.1387/ijdb.130199bl.
- Lacroix, B., and Citovsky, V. (2016). A Functional Bacterium-to-Plant DNA Transfer Machinery of *Rhizobium etli*. *PLoS Pathog* 12(3), e1005502. doi: 10.1371/journal.ppat.1005502.

- Lacroix, B., and Citovsky, V. (2019). Pathways of DNA Transfer to Plants from *Agrobacterium tumefaciens* and Related Bacterial Species. *Annu Rev Phytopathol* 57, 231-251. doi: 10.1146/annurev-phyto-082718-100101.
- Lamarque, M.G., Wanner, B.L., Crepin, S., and Harel, J. (2008). The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev* 32(3), 461-473. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00101.x.
- Landeta, C., Dávalos, A., Cevallos, M.A., Geiger, O., Brom, S., and Romero, D. (2011). Plasmids with a chromosome-like role in rhizobia. *J Bacteriol* 193(6), 1317-1326. doi: 10.1128/JB.01184-10.
- LaRue, T.A., and Child, J.J. (1979). Sensitive fluorometric assay for leghemoglobin. *Anal Biochem* 92(1), 11-15. doi: 10.1016/0003-2697(79)90618-3.
- Laub, M.T., Chen, S.L., Shapiro, L., and McAdams, H.H. (2002). Genes directly controlled by CtrA, a master regulator of the *Caulobacter* cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(7), 4632-4637. doi: 10.1073/pnas.062065699.
- Laub, M.T., and Goulian, M. (2007). Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annu Rev Genet* 41, 121-145. doi: 10.1146/annurev.genet.41.042007.170548.
- Layzell, D.B., and Hunt, S. (1990). Oxygen and the regulation of nitrogen fixation in legume nodules. *Physiologia Plantarum* 80, 322-327.
- Letunic, I., and Bork, P. (2019). Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res* 47(W1), W256-W259. doi: 10.1093/nar/gkz239.
- Li, X.Z., and Nikaido, H. (2009). Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs* 69(12), 1555-1623. doi: 10.2165/11317030-000000000-00000.
- Lindemann, A., Koch, M., Pessi, G., Muller, A.J., Balsiger, S., Hennecke, H., et al. (2010). Host-specific symbiotic requirement of BdeAB, a RegR-controlled RND-type efflux system in *Bradyrhizobium japonicum*. *FEMS Microbiol Lett* 312(2), 184-191. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02115.x.
- Lindemann, A., Moser, A., Pessi, G., Hauser, F., Friberg, M., Hennecke, H., et al. (2007). New target genes controlled by the *Bradyrhizobium japonicum* two-component regulatory system RegSR. *J Bacteriol* 189(24), 8928-8943. doi: 10.1128/JB.01088-07.
- Lipa, P., and Janczarek, M. (2020). Phosphorylation systems in symbiotic nitrogen-fixing bacteria and their role in bacterial adaptation to various environmental stresses. *PeerJ* 8, e8466. doi: 10.7717/peerj.8466.
- Liu, A., Contador, C.A., Fan, K., and Lam, H.M. (2018). Interaction and Regulation of Carbon, Nitrogen, and Phosphorus Metabolisms in Root Nodules of Legumes. *Front Plant Sci* 9, 1860. doi: 10.3389/fpls.2018.01860.
- Liu, C.W., Breakspear, A., Guan, D., Cerri, M.R., Jackson, K., Jiang, S., et al. (2019). NIN Acts as a Network Hub Controlling a Growth Module Required for Rhizobial Infection. *Plant Physiol* 179(4), 1704-1722. doi: 10.1104/pp.18.01572.
- López, O., Morera, C., Miranda-Rios, J., Girard, L., Romero, D., and Soberon, M. (2001). Regulation of gene expression in response to oxygen in *Rhizobium etli*: role of FnrN in *fixNOQP* expression and in symbiotic nitrogen fixation. *J Bacteriol* 183(24), 6999-7006. doi: 10.1128/JB.183.24.6999-7006.2001.
- López-Leal, G., Tabche, M.L., Castillo-Ramírez, S., Mendoza-Vargas, A., Ramírez-Romero, M.A., and Dávila, G. (2014). RNA-Seq analysis of the multipartite genome of *Rhizobium etli* CE3 shows different replicon contributions under heat and saline shock. *BMC Genomics* 15, 770. doi: 10.1186/1471-2164-15-770.
- Lubin, E.A., Henry, J.T., Fiebig, A., Crosson, S., and Laub, M.T. (2016). Identification of the PhoB Regulon and Role of PhoU in the Phosphate Starvation Response of *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* 198(1), 187-200. doi: 10.1128/JB.00658-15.
- Maillet, F., Fournier, J., Mendis, H.C., Tadege, M., Wen, J., Ratet, P., et al. (2020). *Sinorhizobium meliloti* succinylated high-molecular-weight succinoglycan and the *Medicago truncatula* LysM receptor-like kinase MtLYK10 participate independently in symbiotic infection. *Plant J*. doi: 10.1111/tbj.14625.
- Martinez, J.L., Sánchez, M.B., Martínez-Solano, L., Hernandez, A., Garmendia, L., Fajardo, A., et al. (2009). Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* 33(2), 430-449. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00157.x.
- Martinez-Nunez, C., Altamirano-Silva, P., Alvarado-Guillen, F., Moreno, E., Guzman-Verri, C., and Chaves-Olarte, E. (2010). The two-component system BvrR/BvrS regulates the expression of the type IV secretion system VirB in *Brucella abortus*. *J Bacteriol* 192(21), 5603-5608. doi: 10.1128/JB.00567-10.
- McKay, I.A., and Djordjevic, M.A. (1993). Production and Excretion of Nod Metabolites by *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii Are Disrupted by the Same Environmental Factors That Reduce Nodulation in the Field. *Appl Environ Microbiol* 59(10), 3385-3392. doi: 10.1128/AEM.59.10.3385-3392.1993.

- Mendrygal, K.E., and González, J.E. (2000). Environmental regulation of exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 182(3), 599-606. doi: 10.1128/jb.182.3.599-606.2000.
- Mergaert, P., Uchiyama, T., Alunni, B., Evanno, G., Cheron, A., Catrice, O., et al. (2006). Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the Rhizobium-legume symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(13), 5230-5235. doi: 10.1073/pnas.0600912103.
- Miller, L.D., Yost, C.K., Hynes, M.F., and Alexandre, G. (2007). The major chemotaxis gene cluster of Rhizobium leguminosarum bv. viciae is essential for competitive nodulation. *Mol Microbiol* 63(2), 348-362. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05515.x.
- Monds, R.D., Newell, P.D., Gross, R.H., and O'Toole, G.A. (2007). Phosphate-dependent modulation of c-di-GMP levels regulates *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 biofilm formation by controlling secretion of the adhesin LapA. *Mol Microbiol* 63(3), 656-679. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05539.x.
- Morris, J., and Gonzalez, J.E. (2009). The novel genes *emmABC* are associated with exopolysaccharide production, motility, stress adaptation, and symbiosis in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 191(19), 5890-5900. doi: 10.1128/JB.00760-09.
- Murray, J.D. (2011). Invasion by invitation: rhizobial infection in legumes. *Mol Plant Microbe Interact* 24(6), 631-639. doi: 10.1094/MPMI-08-10-0181.
- Narayanan, A., Paul, L.N., Tomar, S., Patil, D.N., Kumar, P., and Yernool, D.A. (2012). Structure-function studies of DNA binding domain of response regulator KdpE reveals equal affinity interactions at DNA half-sites. *PLoS One* 7(1), e30102. doi: 10.1371/journal.pone.0030102.
- Nguyen, M.P., Yoon, J.M., Cho, M.H., and Lee, S.W. (2015). Prokaryotic 2-component systems and the OmpR/PhoB superfamily. *Can J Microbiol* 61(11), 799-810. doi: 10.1139/cjm-2015-0345.
- Niehaus, K., Kapp, D., and Pühler, A. (1993). Plant defence and delayed infection of alfalfa pseudonodules induced by an exopolysaccharide (EPS I)-deficient *Rhizobium meliloti* mutant. *Planta* 190(3), 415-425. doi: 10.1007/BF00196971.
- Noel, K.D., Sanchez, A., Fernandez, L., Leemans, J., and Cevallos, M.A. (1984). *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. *J Bacteriol* 158(1), 148-155.
- Nova-Franco, B., Íñiguez, L.P., Valdés-López, O., Alvarado-Affantranger, X., Leija, A., Fuentes, S.I., et al. (2015). The micro-RNA72c-APETALA2-1 node as a key regulator of the common bean-*Rhizobium etli* nitrogen fixation symbiosis. *Plant Physiol* 168(1), 273-291. doi: 10.1104/pp.114.255547.
- Oldroyd, G.E. (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol* 11(4), 252-263. doi: 10.1038/nrmicro2990.
- Oldroyd, G.E., and Downie, J.A. (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol* 59, 519-546. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839.
- Oldroyd, G.E., Harrison, M.J., and Udvardi, M. (2005). Peace talks and trade deals. Keys to long-term harmony in legume-microbe symbioses. *Plant Physiol* 137(4), 1205-1210. doi: 10.1104/pp.104.057661.
- Oldroyd, G.E., Murray, J.D., Poole, P.S., and Downie, J.A. (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu Rev Genet* 45, 119-144. doi: 10.1146/annurev-genet-110410-132549.
- Ormeño-Orrillo, E., Menna, P., Almeida, L.G., Ollero, F.J., Nicolás, M.F., Pains Rodrigues, E., et al. (2012). Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp. PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC Genomics* 13, 735. doi: 10.1186/1471-2164-13-735.
- Palumbo, J.D., Kado, C.I., and Phillips, D.A. (1998). An isoflavonoid-inducible efflux pump in *Agrobacterium tumefaciens* is involved in competitive colonization of roots. *J Bacteriol* 180(12), 3107-3113. doi: 10.1128/JB.180.12.3107-3113.1998.
- Piddock, L.J. (2006). Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat Rev Microbiol* 4(8), 629-636. doi: 10.1038/nrmicro1464.
- Pini, F., De Nisco, N.J., Ferri, L., Penterman, J., Fioravanti, A., Brilli, M., et al. (2015). Cell Cycle Control by the Master Regulator CtrA in *Sinorhizobium meliloti*. *PLoS Genet* 11(5), e1005232. doi: 10.1371/journal.pgen.1005232.
- Pini, F., Frage, B., Ferri, L., De Nisco, N.J., Mohapatra, S.S., Taddei, L., et al. (2013). The DivJ, CbrA and PleC system controls DivK phosphorylation and symbiosis in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Microbiol* 90(1), 54-71. doi: 10.1111/mmi.12347.
- Poole, P., Ramachandran, V., and Terpolilli, J. (2018). Rhizobia: from saprophytes to endosymbionts. *Nat Rev Microbiol* 16(5), 291-303. doi: 10.1038/nrmicro.2017.171.
- Prell, J., Mulley, G., Haufe, F., White, J.P., Williams, A., Karunakaran, R., et al. (2012). The PTS(Ntr) system globally regulates ATP-dependent transporters in *Rhizobium leguminosarum*. *Mol Microbiol* 84(1), 117-129. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08014.x.

- Quon, K.C., Marczyński, G.T., and Shapiro, L. (1996). Cell cycle control by an essential bacterial two-component signal transduction protein. *Cell* 84(1), 83-93.
- Ramírez, M., Flores-Pacheco, G., Reyes, J.L., Álvarez, A.L., Drevon, J.J., Girard, L., et al. (2013). Two common bean genotypes with contrasting response to phosphorus deficiency show variations in the microRNA 399-mediated PvPHO2 regulation within the PvPHR1 signaling pathway. *Int J Mol Sci* 14(4), 8328-8344. doi: 10.3390/ijms14048328.
- Ramos, J.L., Martínez-Bueno, M., Molina-Henares, A.J., Teran, W., Watanabe, K., Zhang, X., et al. (2005). The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol Mol Biol Rev* 69(2), 326-356. doi: 10.1128/MMBR.69.2.326-356.2005.
- Ratib, N.R., Sabio, E.Y., Mendoza, C., Barnett, M.J., Clover, S.B., Ortega, J.A., et al. (2018). Genome-wide identification of genes directly regulated by Chv1 and a consensus sequence for Chv1 binding in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Microbiol* 110(4), 596-615. doi: 10.1111/mmi.14119.
- Rees, D.C., and Howard, J.B. (2000). Nitrogenase: standing at the crossroads. *Curr Opin Chem Biol* 4(5), 559-566. doi: 10.1016/s1367-5931(00)00132-0.
- Reid, D.E., Ferguson, B.J., Hayashi, S., Lin, Y.H., and Gresshoff, P.M. (2011). Molecular mechanisms controlling legume autoregulation of nodulation. *Ann Bot* 108(5), 789-795. doi: 10.1093/aob/mcr205.
- Reisenauer, A., Quon, K., and Shapiro, L. (1999). The CtrA response regulator mediates temporal control of gene expression during the *Caulobacter* cell cycle. *J Bacteriol* 181(8), 2430-2439.
- Reyero-Saavedra, M.D.R., Qiao, Z., Sánchez-Correa, M.D.S., Díaz-Pineda, M.E., Reyes, J.L., Covarrubias, A.A., et al. (2017). Gene Silencing of *Argonaute5* Negatively Affects the Establishment of the Legume-Rhizobia Symbiosis. *Genes (Basel)* 8(12). doi: 10.3390/genes8120352.
- Reyes-González, A., Talbi, C., Rodríguez, S., Rivera, P., Zamorano-Sánchez, D., and Girard, L. (2016). Expanding the regulatory network that controls nitrogen fixation in *Sinorhizobium meliloti*: elucidating the role of the two-component system hFixL-FxkR. *Microbiology* 162(6), 979-988. doi: 10.1099/mic.0.000284.
- Reyes-Pérez, A., Vargas Mdel, C., Hernández, M., Aguirre-von-Wobeser, E., Pérez-Rueda, E., and Encarnación, S. (2016). Transcriptomic analysis of the process of biofilm formation in *Rhizobium etli* CFN42. *Arch Microbiol* 198(9), 847-860. doi: 10.1007/s00203-016-1241-5.
- Rípodas, C., Castaingts, M., Clúa, J., Villafane, J., Blanco, F.A., and Zanetti, M.E. (2019). The PvNF-YA1 and PvNF-YB7 Subunits of the Heterotrimeric NF-Y Transcription Factor Influence Strain Preference in the *Phaseolus vulgaris*-*Rhizobium etli* Symbiosis. *Front Plant Sci* 10, 221. doi: 10.3389/fpls.2019.00221.
- Roszbach, S., Kunze, K., Albert, S., Zehner, S., and Göttfert, M. (2014). The *Sinorhizobium meliloti* EmrAB efflux system is regulated by flavonoids through a TetR-like regulator (EmrR). *Mol Plant Microbe Interact* 27(4), 379-387. doi: 10.1094/MPMI-09-13-0282-R.
- Rotter, C., Mühlbacher, S., Salamon, D., Schmitt, R., and Scharf, B. (2006). Rem, a new transcriptional activator of motility and chemotaxis in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 188(19), 6932-6942. doi: 10.1128/JB.01902-05.
- Roy, S., Liu, W., Nandety, R.S., Crook, A., Mysore, K.S., Pislariu, C.I., et al. (2020). Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation. *Plant Cell* 32(1), 15-41. doi: 10.1105/tpc.19.00279.
- Ruberg, S., Puhler, A., and Becker, A. (1999). Biosynthesis of the exopolysaccharide galactoglucan in *Sinorhizobium meliloti* is subject to a complex control by the phosphate-dependent regulator PhoB and the proteins ExpG and MucR. *Microbiology* 145 (Pt 3), 603-611. doi: 10.1099/13500872-145-3-603.
- Rutten, P.J., and Poole, P.S. (2019). Oxygen regulatory mechanisms of nitrogen fixation in rhizobia. *Adv Microb Physiol* 75, 325-389. doi: 10.1016/bs.ampbs.2019.08.001.
- Rutten, P.J., Steel, H., Hood, G.A., Ramachandran, V.K., McMurtry, L., Geddes, B., Papachristodoulou, A., Poole, P.S. (2021). A multiple sensors provides spatiotemporal oxygen regulation of gene expression in a *Rhizobium*-legume symbiosis. *PLoS Genet* 17(2):e1009099. doi: 10.1371/journal.pgen.1009099.
- Saier, M.H., Jr., and Paulsen, I.T. (2001). Phylogeny of multidrug transporters. *Semin Cell Dev Biol* 12(3), 205-213. doi: 10.1006/scdb.2000.0246.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY, U.S.A.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, J., and Rusell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Santos, M.R., Marques, A.T., Becker, J.D., and Moreira, L.M. (2014). The *Sinorhizobium meliloti* EmrR regulator is required for efficient colonization of *Medicago sativa* root nodules. *Mol Plant Microbe Interact* 27(4), 388-399. doi: 10.1094/MPMI-09-13-0284-R.
- Santos-Beneit, F. (2015). The Pho regulon: a huge regulatory network in bacteria. *Front Microbiol* 6, 402. doi: 10.3389/fmicb.2015.00402.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., and Pühler, A. (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145(1), 69-73. doi: 10.1016/0378-1119(94)90324-7.
- Schallies, K.B., Sadowski, C., Meng, J., Chien, P., and Gibson, K.E. (2015). *Sinorhizobium meliloti* CtrA Stability Is Regulated in a CbrA-Dependent Manner That Is Influenced by CpdR1. *J Bacteriol* 197(13), 2139-2149. doi: 10.1128/JB.02593-14.
- Scharf, B.E., Hynes, M.F., and Alexandre, G.M. (2016). Chemotaxis signaling systems in model beneficial plant-bacteria associations. *Plant Mol Biol* 90(6), 549-559. doi: 10.1007/s11103-016-0432-4.
- Schauser, L., Roussis, A., Stiller, J., and Stougaard, J. (1999). A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature* 402(6758), 191-195. doi: 10.1038/46058.
- Schluter, J.P., Reinkensmeier, J., Barnett, M.J., Lang, C., Krol, E., Giegerich, R., et al. (2013). Global mapping of transcription start sites and promoter motifs in the symbiotic alpha-proteobacterium *Sinorhizobium meliloti* 1021. *BMC Genomics* 14, 156. doi: 10.1186/1471-2164-14-156.
- Shevchuk, N.A., Bryksin, A.V., Nusinovich, Y.A., Cabello, F.C., Sutherland, M., and Ladisch, S. (2004). Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously. *Nucleic Acids Res* 32(2), e19. doi: 10.1093/nar/gnh014.
- Siarot, L., Toyazaki, H., Hidaka, M., Kurumisawa, K., Hirakawa, T., Morohashi, K., et al. (2017). A Novel Regulatory Pathway for K(+) Uptake in the Legume Symbiont *Azorhizobium caulinodans* in Which TrkJ Represses the *kdpFABC* Operon at High Extracellular K(+) Concentrations. *Appl Environ Microbiol* 83(19). doi: 10.1128/AEM.01197-17.
- Skerker, J.M., and Shapiro, L. (2000). Identification and cell cycle control of a novel pilus system in *Caulobacter crescentus*. *EMBO J* 19(13), 3223-3234. doi: 10.1093/emboj/19.13.3223.
- Smith, S.C., Joshi, K.K., Zik, J.J., Trinh, K., Kamajaya, A., Chien, P., et al. (2014). Cell cycle-dependent adaptor complex for ClpXP-mediated proteolysis directly integrates phosphorylation and second messenger signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(39), 14229-14234. doi: 10.1073/pnas.1407862111.
- Sourjik, V., Muschler, P., Scharf, B., and Schmitt, R. (2000). VisN and VisR are global regulators of chemotaxis, flagellar, and motility genes in *Sinorhizobium (Rhizobium) meliloti*. *J Bacteriol* 182(3), 782-788. doi: 10.1128/jb.182.3.782-788.2000.
- Spaink, H.P. (2000). Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu Rev Microbiol* 54, 257-288. doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.257.
- Spaink, H.P., Wijffjes, A.H., and Lugtenberg, B.J. (1995). *Rhizobium* NodI and NodJ proteins play a role in the efficiency of secretion of lipochitin oligosaccharides. *J Bacteriol* 177(21), 6276-6281. doi: 10.1128/jb.177.21.6276-6281.1995.
- Spengler, G., Kincses, A., Gajdács, M., and Amaral, L. (2017). New Roads Leading to Old Destinations: Efflux Pumps as Targets to Reverse Multidrug Resistance in Bacteria. *Molecules* 22(3). doi: 10.3390/molecules22030468.
- Stachel, S.E., and Zambryski, P.C. (1986). *virA* and *virG* control the plant-induced activation of the T-DNA transfer process of *A. tumefaciens*. *Cell* 46(3), 325-333. doi: 10.1016/0092-8674(86)90653-7.
- Stock, A.M., Robinson, V.L., and Goudreau, P.N. (2000). Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* 69, 183-215. doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.183.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., and Dubendorff, J.W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* 185, 60-89. doi: 10.1016/0076-6879(90)85008-c.
- Suzuki, T., Yoro, E., and Kawaguchi, M. (2015). Leguminous plants: inventors of root nodules to accommodate symbiotic bacteria. *Int Rev Cell Mol Biol* 316, 111-158. doi: 10.1016/bs.ircmb.2015.01.004.
- Taiz, L., and Zeiger, E. (2003). "Assimilation of mineral nutrients," in *Plant Physiology*, ed. T. Lazar. 3rd ed: Sinauer Associates), 259-282.
- Tamamoto, S., Aoyama, T., Takanami, M., and Oka, A. (1990). Binding of the regulatory protein VirG to the phased signal sequences upstream from virulence genes on the hairy-root-inducing plasmid. *J Mol Biol* 215(4), 537-547. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80166-4.

- Tambalo, D.D., C. Y. Yost, y M. F. Hynes (2015). "Motility and Chemotaxis in the Rhizobia," in *Biological Nitrogen Fixation*, ed. F.J.d. Bruijn.), 337-348.
- Tambalo, D.D., Del Bel, K.L., Bustard, D.E., Greenwood, P.R., Steedman, A.E., and Hynes, M.F. (2010). Regulation of flagellar, motility and chemotaxis genes in *Rhizobium leguminosarum* by the VisN/R-Rem cascade. *Microbiology* 156(Pt 6), 1673-1685. doi: 10.1099/mic.0.035386-0.
- Tett, A.J., Karunakaran, R., and Poole, P.S. (2014). Characterisation of SalRAB a salicylic acid inducible positively regulated efflux system of *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* 3841. *PLoS One* 9(8), e103647. doi: 10.1371/journal.pone.0103647.
- Toro-Roman, A., Mack, T.R., and Stock, A.M. (2005). Structural analysis and solution studies of the activated regulatory domain of the response regulator ArcA: a symmetric dimer mediated by the alpha4-beta5-alpha5 face. *J Mol Biol* 349(1), 11-26. doi: 10.1016/j.jmb.2005.03.059.
- Tsoy, O.V., Ravcheev, D.A., Cuklina, J., and Gelfand, M.S. (2016). Nitrogen Fixation and Molecular Oxygen: Comparative Genomic Reconstruction of Transcription Regulation in Alphaproteobacteria. *Front Microbiol* 7, 1343. doi: 10.3389/fmicb.2016.01343.
- Tsyganov, V.E., Voroshilova, V.A., Priefer, U.B., Borisov, A.Y., and Tikhonovich, I.A. (2002). Genetic dissection of the initiation of the infection process and nodule tissue development in the *Rhizobium-pea (Pisum sativum L.)* symbiosis. *Ann Bot* 89(4), 357-366. doi: 10.1093/aob/mcf051.
- Tun-Garrido, C., Bustos, P., González, V., and Brom, S. (2003). Conjugative transfer of p42a from *Rhizobium etli* CFN42, which is required for mobilization of the symbiotic plasmid, is regulated by quorum sensing. *J Bacteriol* 185(5), 1681-1692. doi: 10.1128/jb.185.5.1681-1692.2003.
- Udvardi, M., and Poole, P.S. (2013). Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annu Rev Plant Biol* 64, 781-805. doi: 10.1146/annurev-arplant-050312-120235.
- Ulrich, L.E., and Zhulin, I.B. (2010). The MiST2 database: a comprehensive genomics resource on microbial signal transduction. *Nucleic Acids Res* 38(Database issue), D401-407. doi: 10.1093/nar/gkp940.
- Untiet, V., Karunakaran, R., Kramer, M., Poole, P., Priefer, U., and Prell, J. (2013). ABC transport is inactivated by the PTS(Ntr) under potassium limitation in *Rhizobium leguminosarum* 3841. *PLoS One* 8(5), e64682. doi: 10.1371/journal.pone.0064682.
- Vanderlinde, E.M., and Yost, C.K. (2012). Mutation of the sensor kinase *chvG* in *Rhizobium leguminosarum* negatively impacts cellular metabolism, outer membrane stability, and symbiosis. *J Bacteriol* 194(4), 768-777. doi: 10.1128/JB.06357-11.
- Vercruyse, M., Fauvart, M., Beullens, S., Braeken, K., Cloots, L., Engelen, K., et al. (2011). A comparative transcriptome analysis of *Rhizobium etli* bacteroids: specific gene expression during symbiotic nongrowth. *Mol Plant Microbe Interact* 24(12), 1553-1561. doi: 10.1094/MPMI-05-11-0140.
- Viadas, C., Rodriguez, M.C., Sangari, F.J., Gorvel, J.P., Garcia-Lobo, J.M., and Lopez-Goni, I. (2010). Transcriptome analysis of the *Brucella abortus* BvrR/BvrS two-component regulatory system. *PLoS One* 5(4), e10216. doi: 10.1371/journal.pone.0010216.
- Vicario, J.C., Dardanelli, M.S., and Giordano, W. (2015). Swimming and swarming motility properties of peanut-nodulating rhizobia. *FEMS Microbiol Lett* 362(2), 1-6. doi: 10.1093/femsle/fnu038.
- Vogt, S.L., and Raivio, T.L. (2012). Just scratching the surface: an expanding view of the Cpx envelope stress response. *FEMS Microbiol Lett* 326(1), 2-11. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02406.x.
- Walderhaug, M.O., Polarek, J.W., Voelkner, P., Daniel, J.M., Hesse, J.E., Altendorf, K., et al. (1992). KdpD and KdpE, proteins that control expression of the *kdpABC* operon, are members of the two-component sensor-effector class of regulators. *J Bacteriol* 174(7), 2152-2159. doi: 10.1128/jb.174.7.2152-2159.1992.
- Wan, X., Hontelez, J., Lillo, A., Guarnerio, C., van de Peut, D., Fedorova, E., et al. (2007). *Medicago truncatula* ENOD40-1 and ENOD40-2 are both involved in nodule initiation and bacteroid development. *J Exp Bot* 58(8), 2033-2041. doi: 10.1093/jxb/erm072.
- Wang, C., Kemp, J., Da Fonseca, I.O., Equi, R.C., Sheng, X., Charles, T.C., et al. (2010). *Sinorhizobium melliloti* 1021 loss-of-function deletion mutation in *chvI* and its phenotypic characteristics. *Mol Plant Microbe Interact* 23(2), 153-160. doi: 10.1094/MPMI-23-2-0153.
- Wang, D., S. Yang, F. Tang, y H. Zhu (2012). "Symbiosis specificity in the legume-rhizobium mutualism," in *Cellular microbiology.*), 334-342.
- Wang, L., Lacroix, B., Guo, J., and Citovsky, V. (2017). Transcriptional Activation of Virulence Genes of *Rhizobium etli*. *J Bacteriol* 199(6). doi: 10.1128/JB.00841-16.
- Wanner, B.L. (1996). Signal transduction in the control of phosphate-regulated genes of *Escherichia coli*. *Kidney Int* 49(4), 964-967.

- Wei, X., and Bauer, W.D. (1998). Starvation-Induced Changes in Motility, Chemotaxis, and Flagellation of *Rhizobium meliloti*. *Appl Environ Microbiol* 64(5), 1708-1714.
- Wheatley, R.M., Ford, B.L., Li, L., Aroney, S.T.N., Knights, H.E., Ledermann, R., et al. (2020). Lifestyle adaptations of *Rhizobium* from rhizosphere to symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117(38), 23823-23834. doi: 10.1073/pnas.2009094117.
- Wheatley, R.M., and Poole, P.S. (2018). Mechanisms of bacterial attachment to roots. *FEMS Microbiol Rev* 42(4), 448-461. doi: 10.1093/femsre/fuy014.
- Wu, C.F., Lin, J.S., Shaw, G.C., and Lai, E.M. (2012). Acid-induced type VI secretion system is regulated by ExoR-ChvG/ChvI signaling cascade in *Agrobacterium tumefaciens*. *PLoS Pathog* 8(9), e1002938. doi: 10.1371/journal.ppat.1002938.
- Xue, S., and Biondi, E.G. (2019). Coordination of symbiosis and cell cycle functions in *Sinorhizobium meliloti*. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech* 1862(7), 691-696. doi: 10.1016/j.bbagrm.2018.05.003.
- Yoshida, Y., Sugiyama, S., Oyamada, T., Yokoyama, K., and Makino, K. (2012). Novel members of the phosphate regulon in *Escherichia coli* O157:H7 identified using a whole-genome shotgun approach. *Gene* 502(1), 27-35. doi: 10.1016/j.gene.2012.03.064.
- Yost, C.K., Del Bel, K.L., Quandt, J., and Hynes, M.F. (2004). *Rhizobium leguminosarum* methyl-accepting chemotaxis protein genes are down-regulated in the pea nodule. *Arch Microbiol* 182(6), 505-513. doi: 10.1007/s00203-004-0736-7.
- Yuan, Z.C., Edlind, M.P., Liu, P., Saenkham, P., Banta, L.M., Wise, A.A., et al. (2007). The plant signal salicylic acid shuts down expression of the vir regulon and activates quorum-quenching genes in *Agrobacterium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(28), 11790-11795. doi: 10.1073/pnas.0704866104.
- Yuan, Z.C., Haudecoeur, E., Faure, D., Kerr, K.F., and Nester, E.W. (2008). Comparative transcriptome analysis of *Agrobacterium tumefaciens* in response to plant signal salicylic acid, indole-3-acetic acid and gamma-amino butyric acid reveals signalling cross-talk and *Agrobacterium*-plant co-evolution. *Cell Microbiol* 10(11), 2339-2354. doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01215.x.
- Yuan, Z.C., Zaheer, R., and Finan, T.M. (2005). Phosphate limitation induces catalase expression in *Sinorhizobium meliloti*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Microbiol* 58(3), 877-894. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04874.x.
- Yuan, Z.C., Zaheer, R., Morton, R., and Finan, T.M. (2006). Genome prediction of PhoB regulated promoters in *Sinorhizobium meliloti* and twelve proteobacteria. *Nucleic Acids Res* 34(9), 2686-2697. doi: 10.1093/nar/gkl365.
- Zamorano-Sánchez, D., and Girard, L. (2015). "FNR-Like Proteins in Rhizobia: Past and Future," in *Biological Nitrogen Fixation*, ed. F.J.d. Bruijn., 155-165.
- Zamorano-Sánchez, D., Reyes-González, A., Gómez-Hernández, N., Rivera, P., Georgellis, D., and Girard, L. (2012). FxkR provides the missing link in the *fixL-fixK* signal transduction cascade in *Rhizobium etli* CFN42. *Mol Plant Microbe Interact* 25(11), 1506-1517. doi: 10.1094/MPMI-05-12-0136-R.
- Zanetti, M.E., Blanco, F.A., Beker, M.P., Battaglia, M., and Aguilar, O.M. (2010). A C subunit of the plant nuclear factor NF-Y required for rhizobial infection and nodule development affects partner selection in the common bean-*Rhizobium etli* symbiosis. *Plant Cell* 22(12), 4142-4157. doi: 10.1105/tpc.110.079137.
- Zheng, H., Mao, Y., Teng, J., Zhu, Q., Ling, J., and Zhong, Z. (2015). Flagellar-dependent motility in *Mesorhizobium tianshanense* is involved in the early stage of plant host interaction: study of an *flgE* mutant. *Curr Microbiol* 70(2), 219-227. doi: 10.1007/s00284-014-0701-x.
- Zipfel, C., and Oldroyd, G.E. (2017). Plant signalling in symbiosis and immunity. *Nature* 543(7645), 328-336. doi: 10.1038/nature22009.



A Novel OmpR-Type Response Regulator Controls Multiple Stages of the *Rhizobium etli* – *Phaseolus vulgaris* N₂-Fixing Symbiosis

Susana Rodríguez¹, David Correa-Galeote^{1†}, Mishael Sánchez-Pérez^{1,2}, Mario Ramírez³, Mariel C. Isidra-Arellano⁴, María del Rocío Reyero-Saavedra⁴, David Zamorano-Sánchez¹, Georgina Hernández³, Oswaldo Valdés-López⁴ and Lourdes Girard^{1*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Akiko Sugio,
Institut de Génétique, Environnement
et Protection des Plantes, Institut
National de la Recherche
Agronomique, France

Reviewed by:

Pascal Ratet,
UMR9213 Institut des Sciences des
Plantes de Paris Saclay (IPSP), France
Philip Simon Poole,
University of Oxford, United Kingdom

*Correspondence:

Lourdes Girard
girard@ccg.unam.mx

† Present address:

David Correa-Galeote,
Departamento de Microbiología,
Facultad de Farmacia, Universidad
de Granada, Granada, Spain

Specialty section:

This article was submitted to
Microbial Symbioses,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 09 October 2020

Accepted: 26 November 2020

Published: 15 December 2020

Citation:

Rodríguez S, Correa-Galeote D,
Sánchez-Pérez M, Ramírez M,
Isidra-Arellano MC,
Reyero-Saavedra MdR,
Zamorano-Sánchez D, Hernández G,
Valdés-López O and Girard L (2020) A
Novel OmpR-Type Response
Regulator Controls Multiple Stages
of the *Rhizobium etli* – *Phaseolus
vulgaris* N₂-Fixing Symbiosis.
Front. Microbiol. 11:615775.
doi: 10.3389/fmicb.2020.615775

¹ Programa de Biología de Sistemas y Biología Sintética, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mexico, ² Programa de Genómica Computacional, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mexico, ³ Programa de Genómica Funcional de Eucariontes, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mexico, ⁴ Laboratorio de Genómica Funcional de Leguminosas, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla de Baz, Mexico

OmpR, is one of the best characterized response regulators families, which includes transcriptional regulators with a variety of physiological roles including the control of symbiotic nitrogen fixation (SNF). The *Rhizobium etli* CE3 genome encodes 18 OmpR-type regulators; the function of the majority of these regulators during the SNF in common bean, remains elusive. In this work, we demonstrated that a *R. etli* mutant strain lacking the OmpR-type regulator RetPC57 (Δ RetPC57), formed less nodules when used as inoculum for common bean. Furthermore, we observed reduced expression level of bacterial genes involved in Nod Factors production (*nodA* and *nodB*) and of plant early-nodulation genes (*NSP2*, *NIN*, *NF-YA* and *ENOD40*), in plants inoculated with Δ RetPC57. RetPC57 also contributes to the appropriate expression of genes which products are part of the multidrug efflux pumps family (MDR). Interestingly, nodules elicited by Δ RetPC57 showed increased expression of genes relevant for Carbon/Nitrogen nodule metabolism (*PEPC* and *GOGAT*) and Δ RetPC57 bacteroids showed higher nitrogen fixation activity as well as increased expression of key genes directly involved in SNF (*hfixL*, *fixKf*, *fnrN*, *fixN*, *nifA* and *nifH*). Taken together, our data show that the previously uncharacterized regulator RetPC57 is a key player in the development of the *R. etli* - *P. vulgaris* symbiosis.

Keywords: OmpR-type regulator, nodulation, nitrogen fixation, symbiosis, gene expression, multidrug efflux pumps

INTRODUCTION

Nitrogen is an essential component of relevant biomolecules (e.g., nucleic acids and proteins) for all living organisms. However, only a few prokaryotic organisms can fix atmospheric nitrogen (reduction of dinitrogen into ammonia) and make it available for bio-assimilation. Within this selected bacterial group are the rhizobia, that fix nitrogen within

specialized organs, the nodules, elicited in the roots of several legume species.

The transition from a soil dwelling bacterium lifestyle to forming a symbiotic relationship with a specific partner involves interkingdom chemical-communication, the entrance into an infective stage and eventually a differentiation process to a nitrogen-fixing bacteroid (Murray, 2011; Downie, 2014). This process is tightly regulated by signal molecules that include legume-derived flavonoids and isoflavonoids that attract and are sensed by compatible rhizobia through activating the transcriptional factor NodD (Fischer, 1994). NodD, in turn, activates the transcription of *nodABC* genes that produces signal molecules called Nod Factors (NF) that induce a root-infection process. The NF are chemically decorated lipochitooligosaccharides that are sensed by the legume host through lysine motif receptor-like kinases (LysM) (Oldroyd and Downie, 2008; Oldroyd, 2013). NF perception triggers a series of molecular responses that activate cellular rearrangements enabling rhizobia infection and nodule development (Venkateshwaran et al., 2013). Some of these molecular responses regulate the rhizobia-induced root hair deformations, that are necessary to entrap the rhizobia into an infection chamber and to initiate the infection of the root cortical cells (Fournier et al., 2015; Suzaki et al., 2015). Once in the infection thread rhizobia differentiate into bacteroids and will engage into the nitrogen-fixation process in mature nodules (Spaink, 2000; Oldroyd and Downie, 2008). From the legume host side, a suite of nodulin genes, which finely regulate nodule development and rhizobial infection, are activated (Mylona et al., 1995; Oldroyd et al., 2005; Suzaki et al., 2015). For instance, the activation of the master regulator *Nodule Inception* (*NIN*) is crucial to coordinate both rhizobial and nodule development (Schäuser et al., 1999; Liu et al., 2019; Roy et al., 2020). Legumes have also evolved specific molecular mechanism that allow them to select the appropriate symbiotic partner. For instance, in common bean (*Phaseolus vulgaris*), the expression of the subunits *PvNF-YA1*, *PvNF-YB7*, and *PvNF-YC1* of the heterotrimeric Nuclear Factor-Y (NF-Y) transcription factor is important to promote both rhizobial infection and nodule development in common bean but also to select the most efficient *Rhizobium etli* strains to improved nitrogen fixation efficiency (Zanetti et al., 2010; Ripodas et al., 2019).

For an adequate and successful interaction between both symbiotic partners, the multidrug resistance efflux pumps (MDR) have a relevant role protecting bacteria from the plant defense response and the toxic levels of flavonoids (Bhattacharya et al., 2010; Alvarez-Ortega et al., 2013). MDR pumps have the ability to efflux a broad range of compounds such as antibiotics, toxins, antimicrobials and flavonoids, among others (Martinez et al., 2009; Blanco et al., 2016). Bacterial MDR efflux pumps are grouped into five different structural families (Saier and Paulsen, 2001; Li and Nikaido, 2009). In rhizobia, the major facilitator superfamily (MFS) and the resistance-nodulation division (RND) systems contribute to a successful symbiotic nitrogen fixation (SNF) interaction with legumes, processing a variety of symbiotic signals derived from both partners (González-Pasayo and Martínez-Romero, 2000; Lindemann et al., 2010;

Eda et al., 2011; Alvarez-Ortega et al., 2013; Santos et al., 2014; Tett et al., 2014). In *Rhizobium etli* (*R. etli*), the absence of the MDR efflux pump RmrAB results in increased sensitivity to flavonoids and decreased ability to nodulate common bean (González-Pasayo and Martínez-Romero, 2000). Other pumps such as BdeAB in *Bradyrhizobium japonicum* positively influence SNF in inoculated soybean (Lindemann et al., 2010). The *Sinorhizobium meliloti* TolC protein is necessary for the secretion of proteins and exopolysaccharide, antimicrobial resistance and for a successful nitrogen-fixing symbiosis (Cosme et al., 2008). Similarly, the SmeAB pump is important in mediating resistance to antimicrobials and in nodulation competitiveness (Eda et al., 2011). In *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841, absence of the SalRAB pump results in increased sensitivity toward salicylic acid but has no effect on nodulation or nitrogen fixation (Tett et al., 2014).

Functional nodules provide the bacteroids an appropriate environment for nitrogen fixation, supplying a carbon source (e.g., malate) and mineral nutrients (e.g., iron and phosphate), as well as the low-oxygen levels required for nitrogen reduction by the oxygen-labile nitrogenase enzyme complex, but sufficient for bacteroid respiration to energize the process (Oldroyd and Downie, 2008; revised in Rutten and Poole, 2019). The low-oxygen environment established in the nodule, differs from that present in other plant structures, and it is the main signal that initiates the activation of nitrogen fixation (*nif*) genes and other bacterial genes involved in maintaining the metabolic adjustments needed to preserve ATP production (*fix* genes) through a series of sophisticated regulatory networks (revised in detail in Fischer, 1994; Dixon and Kahn, 2004; Udvardi and Poole, 2013; Rutten and Poole, 2019, among others).

The molecular basis of SNF and its regulation has been studied in multiple model organisms of the Rhizobiaceae group (Masson-Boivin and Sachs, 2018). These include *R. etli*, a bacterium that establishes a symbiotic relationship with common bean (*Phaseolus vulgaris*), a legume crop with great economic importance worldwide. The genome of *R. etli* strain CE3 is composed of one chromosome and six large plasmids (pRet42a to pRet42f) whose sizes range from 184.4 to 642.5 kb (González et al., 2006). Important advances have been made to elucidate the regulatory mechanisms involved in the symbiotic relationship between *R. etli* and *P. vulgaris*; however, most of this work has focused in just a few signaling modules from the vast repertoire available in the genome of *R. etli*.

The Microbial Signal Transduction Database 3.0 (Gumerov et al., 2020¹) indicates that the genome of *R. etli* CE3 encodes 677 signaling proteins, which form part of one-component and two-component regulatory systems as well as chemosensory systems and extracytoplasmic sigma factors. These observations strongly suggest that the behavior of *R. etli* is exquisitely controlled by a plethora of signaling systems that respond to a variety of external cues. The two-component systems (TCS) represent one of the most prevalent types of signaling modules in bacteria. The knowledge related to their function, structure, specificity, detection mechanisms and evolution has greatly increased in

¹https://mistdb.com/genomes/GCF_000092045.1

recent years (for a review, see Casino et al., 2009; Gao and Stock, 2009; Podgornaia and Laub, 2013; Salazar and Laub, 2015). In its most simplified scheme, TCSs are composed of regulatory pairs, consisting of one histidine kinase (HK) and one response regulator (RR) that allow bacteria to deal with different environmental stimuli (Stock et al., 2000). The genome of *R. etli* encodes 47 HKs and 68 RRs (Gumerov et al., 2020; see footnote 1), however, function of most of these remains unknown.

Members of the OmpR/PhoB family of RRs are highly represented among studied genomes and have been described to be involved in metabolism, stress response, virulence, multidrug resistance, and host–microbe interactions among other processes (Barakat et al., 2010; Howden et al., 2011; Delauné et al., 2012; Huang et al., 2013; Ortet et al., 2015; Chakraborty et al., 2017). In *R. etli* CE3, the OmpR family contains 18 RRs. Despite the importance and multiple processes in which OmpR regulators are involved, only two of them have been characterized in *R. etli* CE3. FxkR, the response regulator which controls the microoxic-dependent expression of *fix* genes in *R. etli* (Zamorano-Sánchez et al., 2012) and VirG, the response regulator that activates the expression of *vir* genes involved in type IV pili production (Wang et al., 2017).

Here, we report on the functional analysis of the RHE_PC00057 OmpR-like response regulator (here referred as RetPC57) and demonstrated that it is required for a successful establishment of a symbiotic relationship between *R. etli* and common bean plants. The absence of this regulator resulted in the formation of less nodules and enhanced nitrogen fixation, that were accompanied by changes in the expression of symbiotic genes from both partners. Our results reveal that RetPC57 is a key player in the development of the *R. etli* - *P. vulgaris* symbiosis and further expand our knowledge regarding the contribution of *R. etli* OmpR-type regulators to the control of SNF.

RESULTS

***Rhizobium etli* ORF RHE_PC00057 Encodes a Response Regulator Highly Conserved in the *Rhizobium/Agrobacterium* Group**

From the eighteen OmpR-type regulators included in the MiST 3.0 database, only two have been characterized (Zamorano-Sánchez et al., 2012; Wang et al., 2017). To get further insights about these regulators, we first performed a bioinformatic analysis of all these OmpR-type regulators. The results showed that seven of the *R. etli* CE3 OmpR-like RRs have orthologs with known function in the Rhizobiaceae family; whereas the remaining eleven have less predictable functions. *In silico* analyses revealed that gene *RetPC57*, mapping in megaplasmid pRet42c, encodes for an OmpR-type response regulator with homology (48.7%) to the *Escherichia coli* CpxR regulator. CpxR response regulator form a TCS with the histidine kinase CpxA. The CpxRA is present in many bacteria and regulates a large number of genes in response to periplasmic stress. In *E. coli*, CpxP and

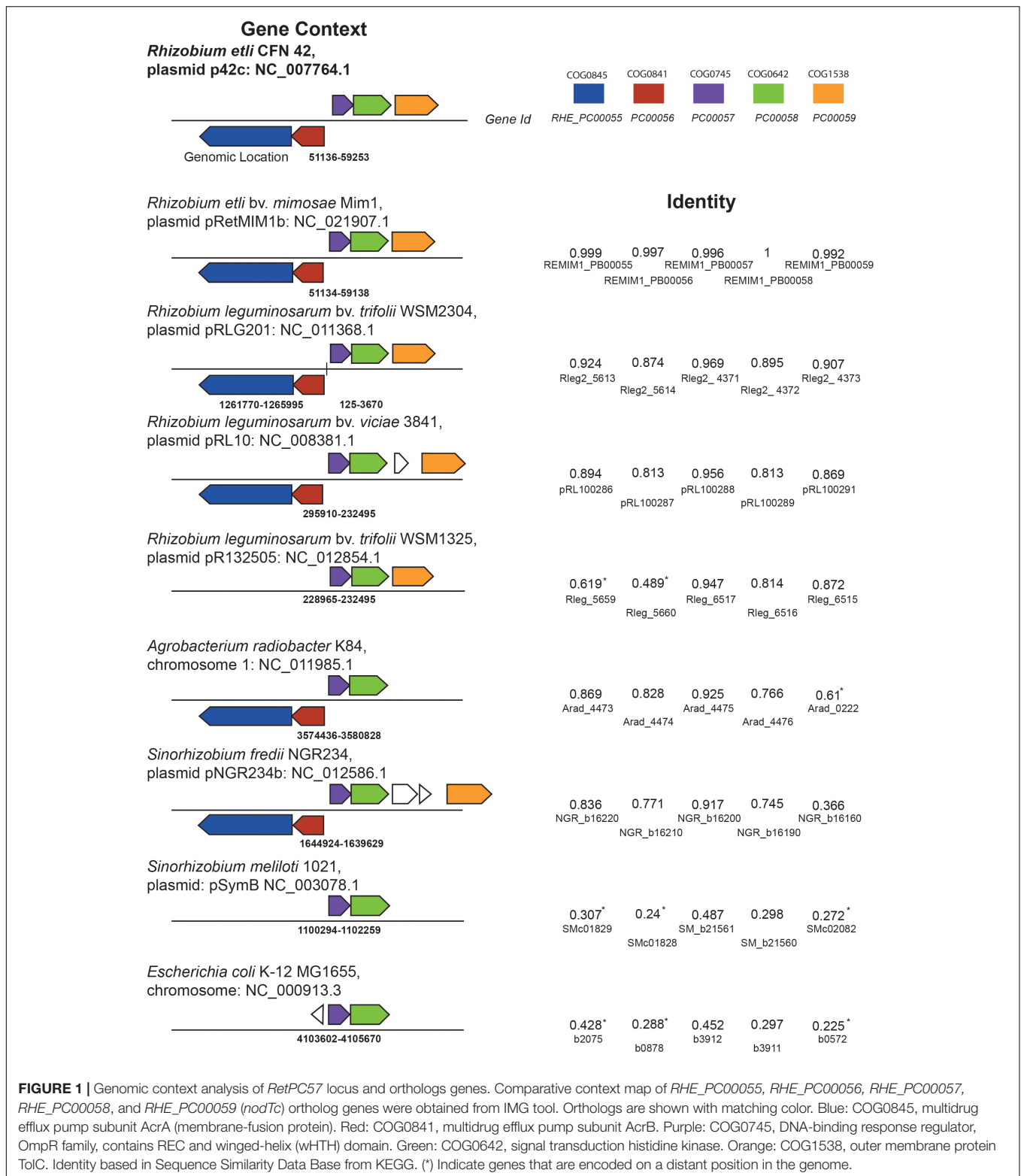
NlpE, two periplasmic auxiliary signaling proteins are part of the Cpx system (Danese and Silhavy, 1998; Vogt and Raivio, 2012). A multiple sequence alignment (CLUSTAL W) showed that RetPC57 conserves a high percentage of identity (90 to 99.6%) to proteins annotated as CpxR in bacteria belonging to the *Rhizobium/Agrobacterium* group whose function has not been described to date (**Supplementary Table 1**). The genomic context of *R. etli* *RetPC57* and its homologs in rhizobia strains was analyzed using public databases^{2,3} (**Figure 1**). Interestingly, we observed that these genes are organized similarly in most of the rhizobia strains studied. *RetPC57* homologs are located next to a highly conserved sensor histidine kinase protein gene, RHE_PC00058 (here referred as RetPC58). Similar to RetPC57, the proteins with the highest percentage of identity to RetPC58 (74.5 to 100%) belong to bacteria from the rhizobial group, whereas RetPC58 and CpxA from *E. coli* share only 29.8% identity. In the rhizobial strains, we could not identify genes homologous to *cpxP* or *nlpE* (Danese and Silhavy, 1998; Fleischer et al., 2007). A group of genes predicted to encode proteins belonging to multidrug resistance (MDR) and efflux pumps (Li and Nikaido, 2009) flank *RetPC57* and *RetPC58*. RHE_PC00059, encoding NodTc, an outer membrane efflux protein (OEP) of the TolC superfamily, is located downstream of and in the same orientation as *RetPC57* and *RetPC58*. Transcribed in the opposite direction to *RetPC57* are two genes, RHE_PC00056 and RHE_PC00055, that encode proteins belonging to the RND-family efflux pumps. A phylogenetic tree was constructed to estimate the relationships among *RetPC57* and its adjacent genes with their counterparts in the rhizobia strains studied (**Figure 2** and **Supplementary Table 1**). In summary, these *in silico* analyses indicate that all analyzed genes exhibit a closest relationship between *R. etli* and *R. leguminosarum* strains, followed by *Agrobacterium radiobacter* K84 and *Sinorhizobium fredii* NGR234. In contrast, *S. meliloti* and *E. coli* genes were located on a more distant branch (**Figure 2**).

RetPC57 and Symbiotic Conditions Are Required for *RetPC57* Locus Expression

Genes flanking *RetPC57* and *RetPC58* (ORFs RHE_PC00055, RHE_PC00056 and RHE_PC00059) are referred here as *RetPC55*, *RetPC56* and *nodTc*, respectively. RetPC57 and RetPC58 coding regions are located in positions pRet42c: 55707 – 56393 and 56396 – 57685, respectively. This observation led us to hypothesize that these two genes are organized in an operon. To test this hypothesis, we evaluated their gene expression in aerobic cultured bacteria, by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using total RNA from the wild type strain (WT). The synthesis of cDNA products corresponding to each gene and a single cDNA product corresponding to *RetPC57*-*RetPC58* genes supports an operon organization for *RetPC57* and *RetPC58* genes (data not shown). Further proof of this operon arrangement was obtained by generating two overlapping β-glucuronidase (GUS) transcriptional fusions. The pPC57-gus

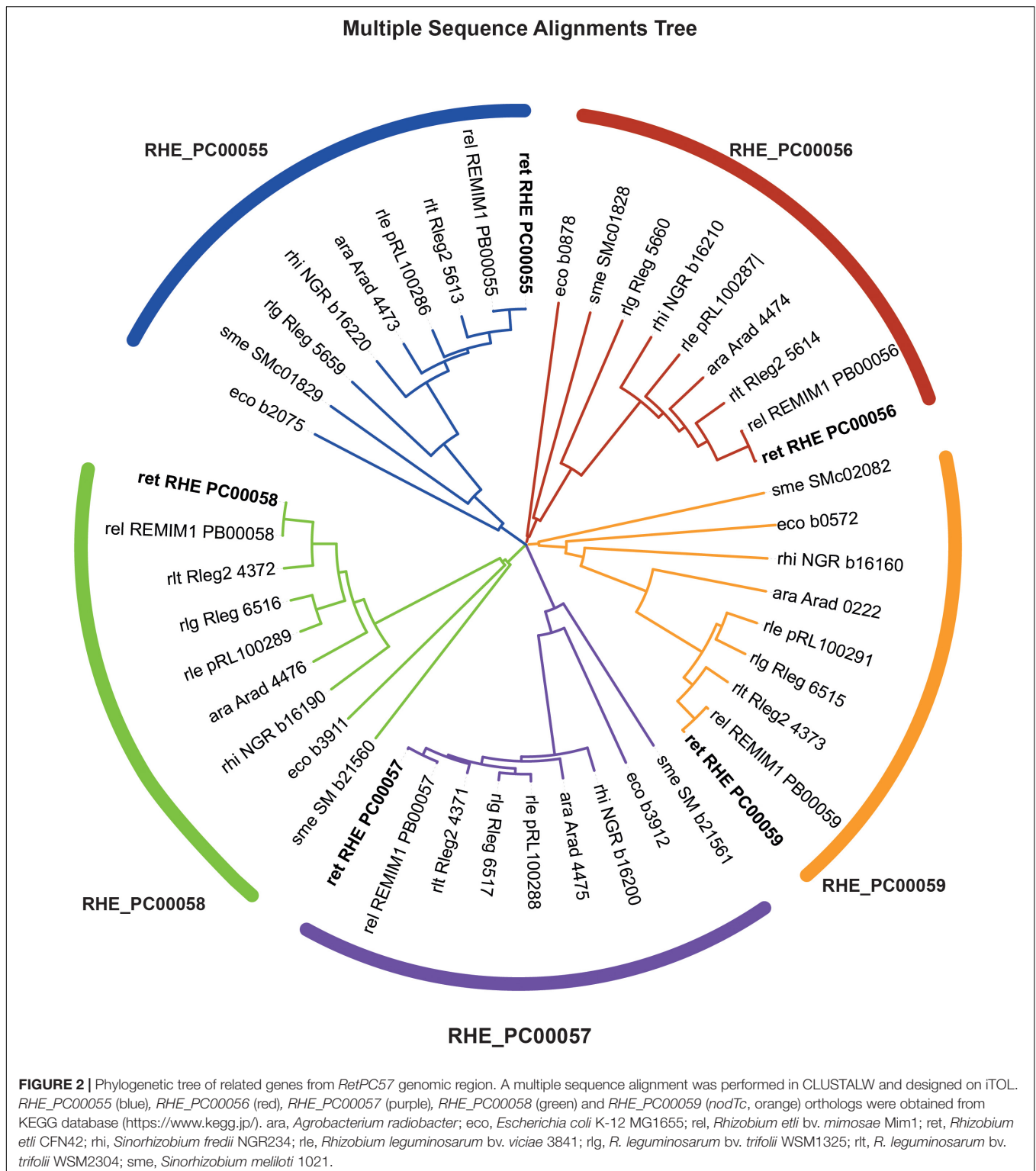
²<https://www.kegg.jp/>

³<http://www.microbesonline.org/>



fusion contains the putative promoter region whereas the pPC58-gus fusion carries part of the coding region of both genes and overlaps with the end of the pPC57-gus fusion. Both fusions were mobilized into the *R. etli* wild-type (WT) strain by conjugation

and GUS-specific activities were determined from bacteria grown in minimal media (MMY) aerobic cultures. Significant Gus activity was only detected from the strain harboring the fusion pPC57-gus, indicating that there is only one promoter in the



region and is located upstream of the *RetPC57* gene (Table 1). Most of the experimental studies and bioinformatics searches have revealed that genes encoding for a putative two component system are located adjacent in the genome (Ulrich and Zhulin, 2009). Thus, based on our expression analysis it is very likely that

RetPC58 protein is the cognate histidine kinase of the *RetPC57* response regulator. The modest level of expression displayed by the *RetPC57* promoter indicates a low basal transcription level of this gene under the assay condition used (Table 1). A similar level of expression was observed under low oxygen

TABLE 1 | Expression analysis of *RetPC57*, *RetPC58*, *RetPC56*, and *nodTc* genes in different *R. etli* derivatives.

Strain	Fusion genotype	β -glucuronidase specific activity ¹	
		MMY ²	MMYQ ³
WT/pPC57-gus	<i>RetPC57:uidA</i>	45 ± 8	Nd
WT/pPC57-gus/pQPC57	<i>RetPC57:uidA</i>	204 ± 40	793 ± 64
WT/pPC58-gus	<i>RetPC58:uidA</i>	2 ± 1	Nd
WT/pPC56-gus	<i>RetPC56:uidA</i>	5 ± 1	Nd
WT/pPC56-gus/pQPC57	<i>RetPC56:uidA</i>	29 ± 2	190 ± 23
WT/pnodTc-gus	<i>nodTc:uidA</i>	5 ± 2	Nd
WT/pnodTc-gus/pQPC57	<i>nodTc:uidA</i>	43 ± 10	1099 ± 169
WT/pPC57-gus/pLC290	<i>RetPC57:uidA</i>	41 ± 8	42 ± 4

¹Values are expressed as $\text{nmol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$. Data are the mean of three replicates from two independent experiments ± SD. ²Y minimal medium. ³Y minimal medium + Cumate at a final concentration of 5 $\mu\text{g/ml}$. Nd: not determined

condition or in the stationary growth phase (data not shown). In contrast, an increased level of expression of the pPC57-gus fusion was observed in the strain carrying the pQPC57 plasmid, that contains the wild type *RetPC57* gene under the control of a cumate-inducible promoter (Table 1). The highest level of *RetPC57* expression was observed in bacteria grown aerobically with cumate (Q) added to the growth media. These results indicate that *RetPC57* is needed to activate its own expression and that the conditions tested are not particularly efficient to promote the activation of this regulator (Table 1). The participation of *RetPC57* as a regulator of the expression of their adjacent genes *RetPC56* and *nodTc* was analyzed by determining GUS-specific activity. The upstream regions of each gene were fused to the *uidA* reporter gene in plasmids pPC56-gus and pnodTc-gus. The expression of these fusions was analyzed in both the WT and in a WT derivative strain carrying plasmid pQPC57. As shown in Table 1, *RetPC56* and *nodTc* genes displayed very low expression, unaffected by the presence of plasmid pQPC57. However, the expression of these genes was induced when cumate was added to the growth medium (Table 1). These results confirmed that *RetPC56* and *nodTc* genes are under the control of *RetPC57* and its expression depends on *RetPC57* expression.

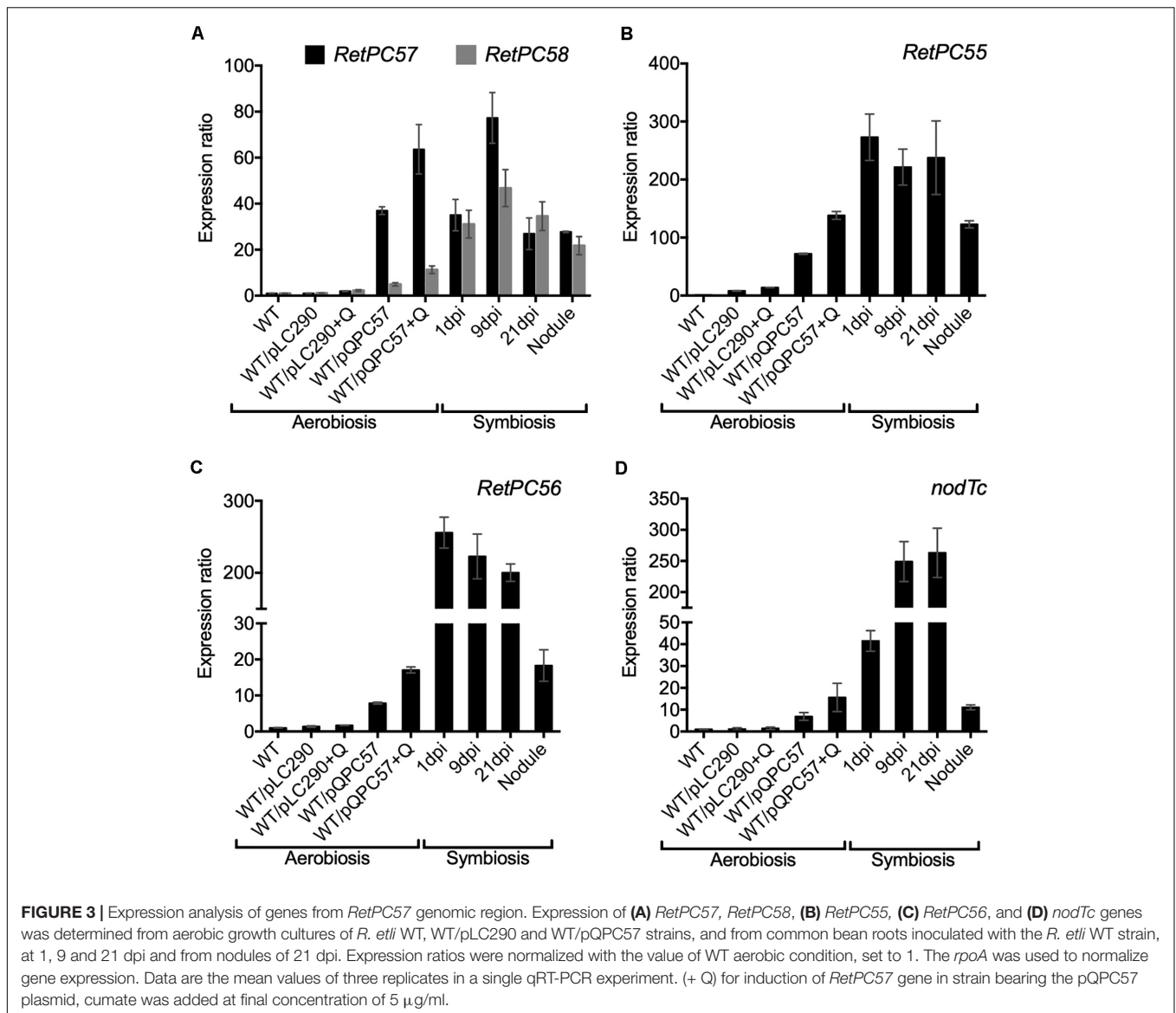
Next, we performed a transcriptional analysis of the genes from the *R. etli* *RetPC57*-*RetPC58* operon in WT bacteria engaged in symbiosis with common bean plants. The gene expression level was analyzed in roots at 1, 9, and 21 days post inoculation (dpi), from bacteria attached or infecting roots and at 21 dpi from nodules. We observed a similar increase in the level of expression of both genes in symbiotic bacteria and in aerobic cultured bacteria bearing the pQPC57 plasmid (Figure 3A). This result indicates that the symbiotic condition triggers the activation of the *RetPC57* gene. In addition, symbiotic bacteria showed a high expression level of the *RetPC55*, *RetPC56* and *nodTc* genes, compared to the expression level from bacteria under free-living aerobic conditions (Figures 3B–D). Furthermore, the similarity of the expression profile displayed by these genes with the *RetPC57* regulator suggests that the *RetPC57* locus is active and functional in *R. etli* symbiosis.

Absence of *RetPC57* Affects the *R. etli* – *Phaseolus vulgaris* Symbiosis

To explore the participation of *R. etli* *RetPC57* regulator during common bean symbiosis, we constructed a *R. etli* mutant strain with a *RetPC57* gene deleted (Δ *RetPC57*), and characterized some of its molecular responses of the Δ *RetPC57* strain during its symbiotic interaction with common bean. In a first approach, we compared the nodulation kinetics of common bean plants inoculated with either the WT, Δ *RetPC57*, Δ *RetPC57*/pPC57 (carrying the WT *RetPC57* gene) or WT/pFAJ1700 (carrying the empty vector) strains. Nodule primordia and young nodules were visible at 7 dpi regardless of the strain used. However, the number of nodules in plants inoculated with the Δ *RetPC57* strain was significantly lower compared to that observed in plants inoculated with the WT strain across the different time points tested in this study (Figure 4A). The wild-type phenotype was restored when the Δ *RetPC57* mutant was complemented with plasmid pPC57; while the WT/pFAJ1700 showed unaffected nodulation (Figure 4A). The observed nodulation phenotype raises the possibility that the absence of *RetPC57* regulator could also affect negatively the nitrogen fixation capacity of the strain. However, an increase in the nitrogenase activity (Figure 4B), a higher leghemoglobin (Lb) content (Figure 4C) and an increase in the size of the nodules (Figures 4D,E), were observed in plants inoculated with the Δ *RetPC57* mutant. Taken together, these results suggest that *RetPC57* is required for an optimal nodulation, while having a negative impact on nitrogen fixation.

RetPC57 Is Required for an Appropriate Rhizobial Infection of Common Bean

The chemotactic response to legume flavonoids and rhizobia attachment to a growing root hair tip, are two crucial steps for the initiation of the rhizobial infection process (Wheatley and Poole, 2018). To further investigate the relevance of *RetPC57* in the symbiotic relationship with common bean we explored the attachment capacity to the legume host root hairs of the *RetPC57* mutant strain. Common bean seedlings were inoculated with either the WT (WT/pGUS) or the mutant (Δ *RetPC57*/pGUS) strains, both of them constitutively expressing the *uidA* gene. After 4 dpi, common bean roots inoculated with the WT strain displayed a strong GUS signal in the susceptible zone, whereas only a faint signal was observed in the roots inoculated with the Δ *RetPC57* strain (Figure 5A). Interestingly, at 6 dpi we observed no differences in the GUS signal displayed in roots inoculated with either WT or Δ *RetPC57* strains (Figure 5A). To further confirm that the delayed attachment of the Δ *RetPC57* strain was due to the absence of *RetPC57*, we performed complementation assays by expressing the *RetPC57* gene under its native promoter (Δ *RetPC57*/pGUS-pc57). As expected, the common bean roots inoculated with the complemented strain showed a GUS signal similar to that observed in roots inoculated with the WT strain at both 4 and 6 dpi (Figure 5A). These data indicate that *RetPC57* is required for the efficient and timely attachment of rhizobia to the common bean roots, the lack of the regulator perhaps delays or affect the efficient communication between rhizobia and its legume host.



Upon attachment to the root hair, rhizobia produce NF, which induce a continuous reorientation of the root hair tip growth, leading to its curling and rhizobia entrapment in the infection chamber (Catoira et al., 2000; Fournier et al., 2015). The fact that *RetPC57* seems to regulate rhizobial attachment to the roots prompted us to evaluate whether the absence of this regulator affects the rhizobia-induced root hair deformation. To this end, 2-days-old common bean seedlings were inoculated with either WT (WT/pGUS), mutant (Δ *RetPC57*/pGUS) or the complemented (Δ *RetPC57*/pGUS-*pc57*) strains. After 4 dpi, the roots inoculated with Δ *RetPC57* or the WT strain showed similar type of root hair deformation events (Figure 5B). However, a quantitative difference of root hair deformation events was observed; while roots inoculated with the WT strain developed on average 50 rhizobia-induced root hair deformation events, the roots inoculated with the mutant strain developed on average 20 events of deformed root hairs (Figure 5C). Interestingly,

after 6 days of inoculation similar numbers of root rhizobia-induced root hair deformation events was observed despite the strain used as inoculant (Figure 5C). The delayed phenotype observed in the infection process of the Δ *RetPC57* strain was complemented by the expression of *RetPC57* in *trans* (Figures 5B,C). These data indicate that the absence of *RetPC57* results in a delay of the mutual recognition between both symbiotic partners, thus this regulator may play a role in the rhizobia infection process.

The Absence of *RetPC57* Affects the Expression of Both Rhizobial and Plant Symbiotic-Genes Involved in the Rhizobial Infection Process

Secondary metabolites produced by plant roots are secreted to the rhizosphere and play important roles in the interaction

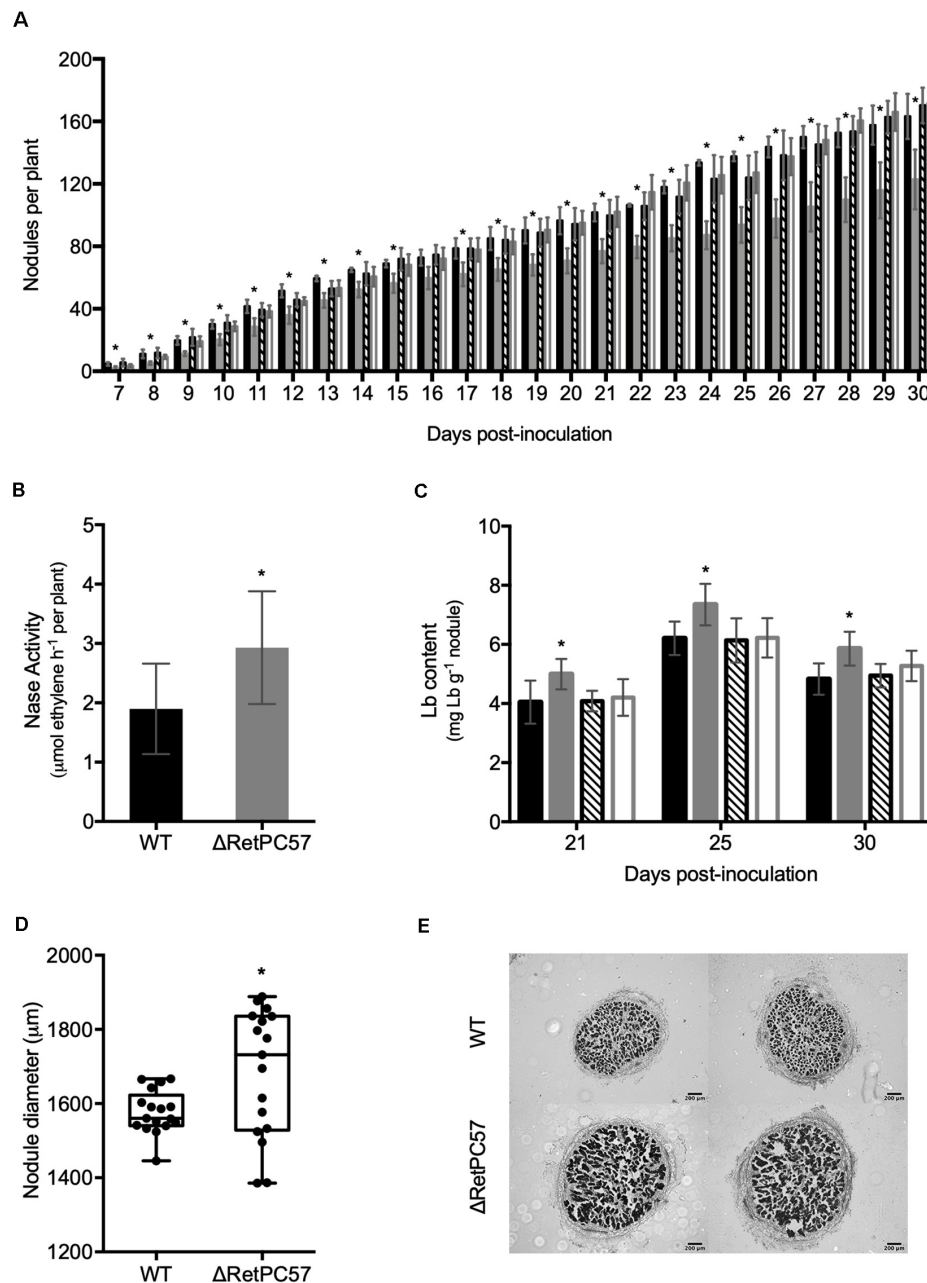
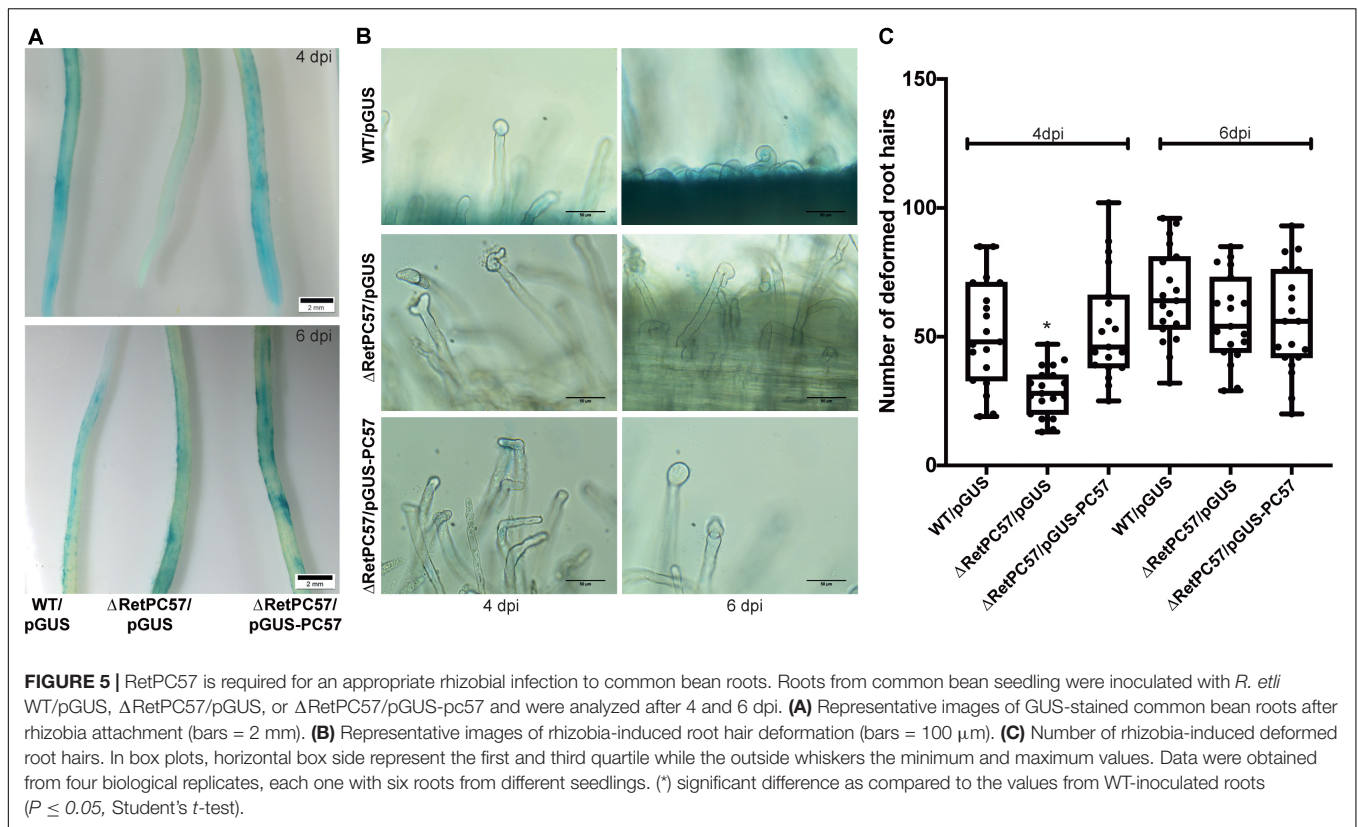


FIGURE 4 | RetPC57 regulator is involved in *R. etli* – *Phaseolus vulgaris* symbiosis. Common bean seedlings were inoculated with *R. etli* WT (●), ΔRetPC57 (●), ΔRetPC57/pPC57 (●), or WT/pFAJ1700 (○) strains and cultivated in growth pouches. **(A)** Inoculated plants were cultivated and the number of nodules formed per plant were determined daily from 7 to 30 dpi. Inoculated plants were cultivated in growth pouches, under controlled conditions to determine: **(B)** Nitrogenase activity (ARA) determined at 21 dpi. **(C)** Leghemoglobin content (Lb) determined in plants harvested after 21, 25, and 30 dpi. **(D)** Diameter from 21 dpi nodules. **(E)** Representative images of light microscopy observations of mature common bean nodule excised at 21 dpi from common bean plants inoculated with WT or ΔRetPC57 *R. etli* strains. Transversal sections of nodules from each condition were stained with safranin and visualized by microscopy. Data in **A** and **B**, represent the average from three different experiments, consisting of 6 plants per treatment. Data in **C** represent the average from three biological replicates in three independent experiments. In **D** box plots, horizontal box side represent the first and third quartile while the outside whiskers the minimum and maximum; values represent the average of 20 nodules from different seedlings. (*) significant difference as compared to the values from WT-inoculated roots ($P \leq 0.05$, Student's *t*-test).

between plants and soil microbes. Flavonoids secreted by the host plant roots activate in rhizobia the expression of nodulation genes necessary for the synthesis and secretion of NFs. To establish a successful infection of legume roots by rhizobia, both

the biological activity of NF and the physiological functions of the multidrug resistance (MDR) efflux systems are essential (González-Pasayo and Martínez-Romero, 2000; Bhattacharya et al., 2010; Lindemann et al., 2010). In order to gain insight



into the potential role of RetPC57 as transcriptional activator and/or repressor, we conducted an expression analysis of the genes related to rhizobial infection and early nodulation in plants inoculated with the WT or the Δ RetPC57 strain after different post inoculation times points (Figure 6). The absence of RetPC57 had a negative impact on the abundance of the transcripts of the bacterial NF-synthesis genes *nodaA* (Figure 6A) and *nodB* (Figure 6B). It has been reported that expression of the MDR systems is subject to multiple levels of regulation that includes a regulator member of the TetR transcriptional repressors and a global transcriptional regulator such as the TCS. In *E. coli*, the TCS EvgAS, PhoPQ and BaeSR participate in regulating/modulating the expression of these transporters (Ramos et al., 2005; Li and Nikaido, 2009). Thus, we investigated whether the expression of different *R. etli* genes predicted to encode putative proteins members of the MDR efflux systems is influenced by the absence of the RetPC57 regulator. Our previous expression analysis of *RetPC55*, *RetPC56* and *nodTc* genes performed in the WT under both aerobic and symbiotic conditions suggests that these genes are under the control of RetPC57 regulator (Table 1 and Figures 3B–D). If that is the case, the expression of these genes in plants inoculated with the Δ RetPC57 should be negatively affected. As shown in Figures 6C–E, the level of expression of *RetPC55*, *RetPC56* and *nodTc* genes was reduced in comparison with the expression observed in plants inoculated with the WT strain. These results indicate that RetPC57 is needed as a positive regulator for its expression. We also analyzed the expression of other genes

that are predicted encode for both proteins belonging to the RND-family efflux pumps (*mexF1-mexE1* and *RHE_CH01305*) and proteins belonging to the MFS-type multicomponent efflux systems (*rmrA*, *RHE_CH01192* and *RHE_CH03357*) (See Supplementary Table 2 for additional information of these genes and their orthologs). Similar to *nodAB*, *RetPC55*, *RetPC56* and *nodTc*, the expression of *rmrA* and *RHE_CH03357* genes, as well as the expression of *rmrR*, the putative regulator of *rmrAB* genes, were significantly reduced in plants inoculated with the Δ RetPC57 mutant compared to those inoculated with the WT strain (Figures 6F–H). The expression of *RHE_CH01192* and *RHE_CH01305* genes was negatively affected only in 21 days-old nodules elicited in plants inoculated with the Δ RetPC57 strain, and not in the roots at 1, 9 or 21 dpi (Figures 6I,J). In contrast, the deletion of *RetPC57* resulted in a significant induction of the expression of genes *mexE1* and *mexF1* (Figures 6K,L). These results indicate that in *R. etli*, the RetPC57 regulator is important for the proper expression of genes associated with the production of the nodulation factor and genes associated with the transport of chemical signals during the establishment of an effective *R. etli* – *P. vulgaris* symbiosis.

The fact that the expression of rhizobial genes involved in the mutual recognition of the legume host is affected in the Δ RetPC57 mutant prompted us to assess the expression of the plant genes CYCLOPS, NSP2, NIN, and NF-YA involved in the rhizobial infection process (Oldroyd, 2013; Nova-Franco et al., 2015; Roy et al., 2020) in common bean roots inoculated with the Δ RetPC57 mutant in comparison to

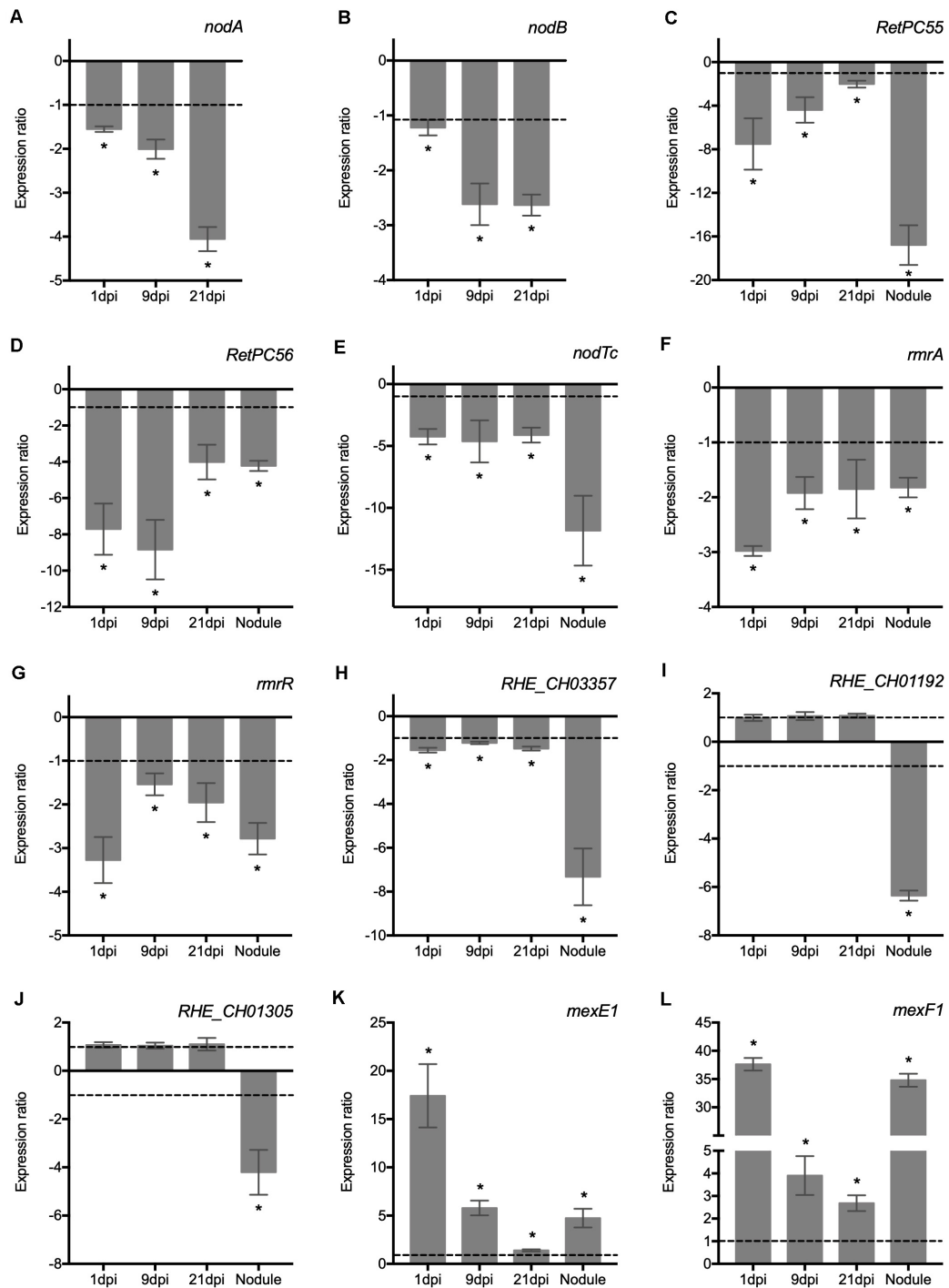
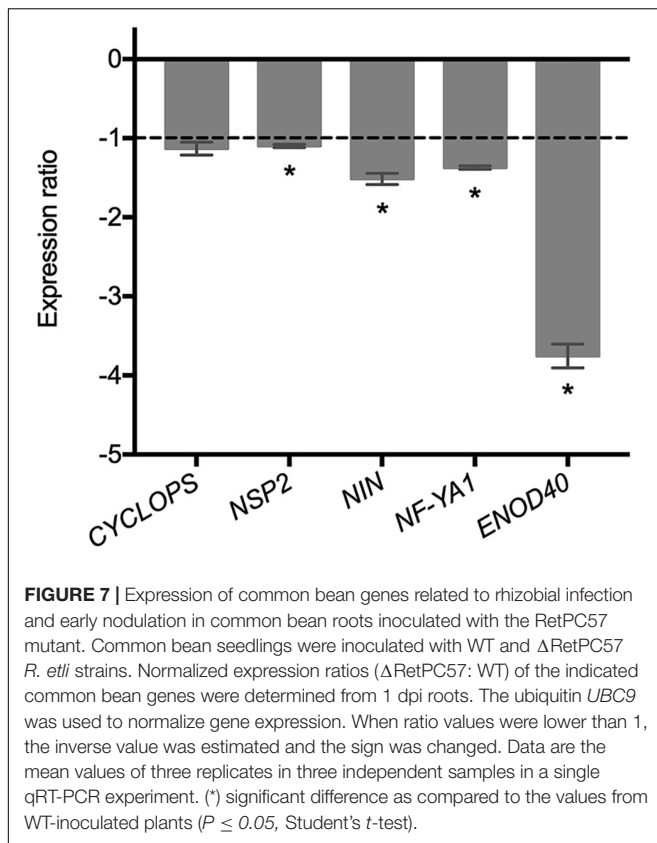


FIGURE 6 | RetPC57 is required for the adequate expression of genes related to nodulation factor synthesis and multidrug resistance efflux pumps in common bean roots. Common bean seedlings were inoculated with WT and Δ RetPC57 *R. etli* strains. Normalized expression ratios (Δ RetPC57: WT) of the indicated rhizobia (**A–L**) genes, were determined from 1, 9, and 21 dpi roots and 21 dpi nodules. The *rhoA* was used to normalize gene expression of bacterial and plant genes, respectively. When ratio values were lower than 1, the inverse value was estimated and the sign was changed. Data are the mean values of three replicates in three independent samples in a single qRT-PCR experiment. (*) significant difference as compared to the values from WT-inoculated plants ($P \leq 0.05$, Student's *t*-test).

plants inoculated with the WT strain after 1 dpi. We found that except for CYCLOPS, the expression of the common bean symbiotic-related genes, was lower in roots inoculated

with the Δ RetPC57 strain (**Figure 7**). Additionally, our expression analysis showed a reduction of the expression of the common bean ENOD40 nodulin gene, involved in nodule



development (Kumagai et al., 2006; Oldroyd and Downie, 2008), in roots inoculated with the Δ RetPC57 strain (Figure 7). Altogether, our expression data further support the notion that the presence of the regulator RetPC57 is necessary for the adequate expression of both bacterial and plant genes that are determinant during the early stages of the rhizobia-legume symbiosis.

Increased Expression of Essential Symbiotic Genes in Bacteroids and Nodules Elicited by the Δ RetPC57 Mutant Strain

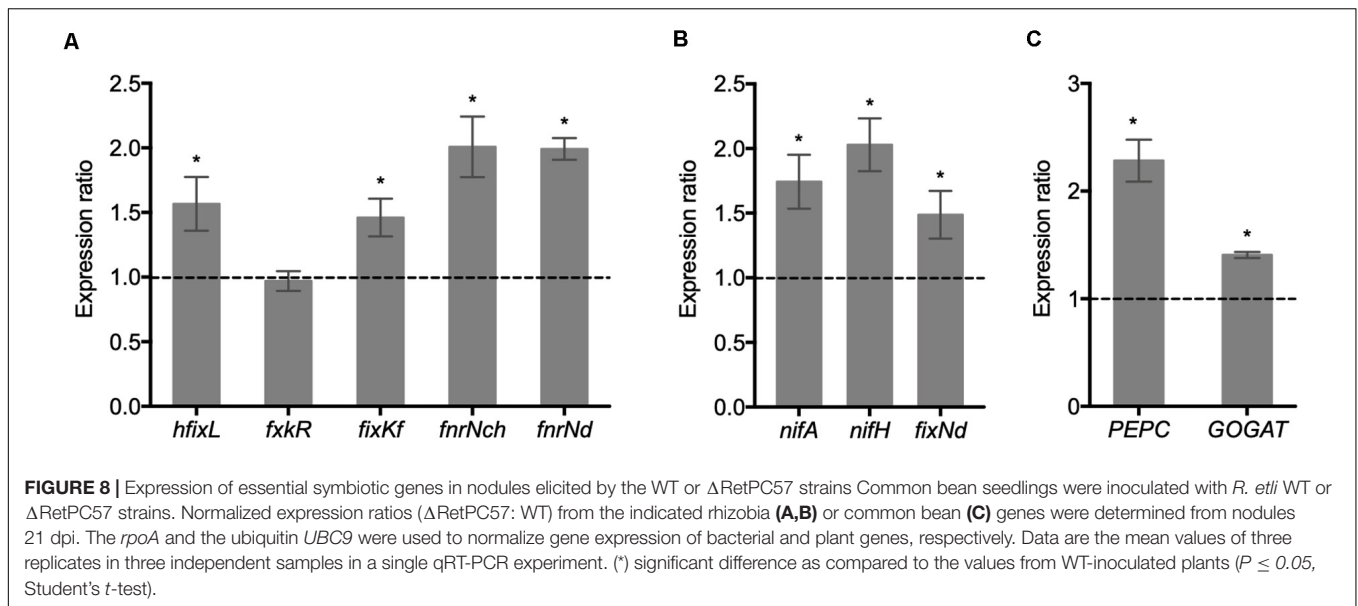
The regulatory mechanism controlling SNF involves the participation of transcriptional factors that control the expression of rhizobia *nif* and *fix* genes. Because the inoculation of common bean plants with the Δ RetPC57 mutant improves its nitrogen fixation capabilities (Figures 4B,C), we explored the expression of *hfixL*, *fxkR*, *fixKf*, *fmrNch* and *fmrNd* genes in bacteroids from nodules of plants inoculated with either the WT strain or the Δ RetPC57 mutant strain. Our analysis revealed that, except for *fxkR*, the expression of these genes was higher in plants inoculated with the Δ RetPC57 mutant compared with plants inoculated with the WT strain (Figure 8A). We also evaluated the expression of *nifA*, *nifH* and *fixNd*, which are indispensable for nitrogen fixation. The absence of RetPC57 resulted in an increase in the expression of these genes (Figure 8B). As shown in Figure 8C, the increased expression of bacterial *nif* and *fix* genes

in nodules from plants inoculated with the Δ RetPC57 mutant strain correlated with a higher expression of genes coding for relevant carbon and nitrogen metabolism enzymes in nodules, such as phosphoenolpyruvate carboxylase (*PEPC*) and glutamate synthase (*GOGAT*) genes, respectively. Altogether, these data suggest that the negative regulation of nitrogen fixation exerted by RetPC57, involves changes in the expression of both bacterial and nodule genes implicated in nitrogen fixation and in carbon and nitrogen metabolism inside the nodule.

DISCUSSION

This study provides new insights regarding the involvement of the OmpR-type response regulators of *R. etli* CE3 in different stages/processes of its symbiosis with common bean plants. Preceding work has shown the participation of a variety of OmpR-type regulators in the control of SNF (Lipa and Janczarek, 2020). For instance, in *S. meliloti* ChvI and FeuP are important for alfalfa root invasion through regulating the production of succinoglycan and cyclic glucans, respectively (Griffitts et al., 2008; Bélanger et al., 2009; Wang et al., 2010; Vanderlinde and Yost, 2012). PhoB regulates the response to phosphate limitation in *S. meliloti* and induces the expression of genes involved in phosphorus uptake, metabolism as well as exopolysaccharide production and cell protection genes (Bardin and Finan, 1998; Mendrygal and González, 2000; Krol and Becker, 2004; Yuan et al., 2006). In phosphate limitation, PhoB positively regulates the expression of genes involved in the production of galactoglucan EPSII required for elongation of the infection thread in the legume symbiosis and for protection against plant defense responses (Niehaus et al., 1993; Fraysse et al., 2003; Bahlawane et al., 2008). On the other hand, Rem regulates flagellar gene expression in *S. meliloti* and *R. leguminosarum* biovar *viciae*; its absence affects the ability of these bacteria to swim and perhaps its attachment to biotic surfaces such as legume roots (Rotter et al., 2006; Tambalo et al., 2010). The cell cycle regulator CtrA controls the expression of genes important for *S. meliloti* saprophytic and symbiotic life styles (Barnett et al., 2001; De Nisco et al., 2014; Xue and Biondi, 2019). FxkR regulators, from *R. etli* CE3 and *S. meliloti* SM11, regulate the expression of *nif* and *fix* genes required for the nitrogenase activity and for microaerobic respiration inside of nodules of common bean and alfalfa, respectively (Zamorano-Sánchez et al., 2012; Reyes-González et al., 2016).

In this work, we showed that RetPC57, a previously uncharacterized response regulator from the OmpR family, plays a major role in the symbiosis between *R. etli* and common bean. Genomic context analysis reveals that both, the *RetPC57* – *RetPC58* operon and the *RetPC55*, *RetPC56* and *nodTc* genes are highly conserved and maintain a similar genetic organization in nitrogen-fixing bacteria. Such conservation suggests that this group of genes co-evolved and possibly conserve a similar function. The structural organization of the efflux pumps of the RND family comprises a transporter protein located in the inner membrane, a membrane fusion protein located in



the periplasmic space and an outer membrane protein located in the outer membrane of the bacteria (Piddock, 2006). Our data indicate that *RetPC55*, *RetPC56* and *nodTc* encode for this type of proteins that may comprise the structural components of an efflux pump, whose expression is under the control of RetPC57 in response to plant exudates and that contributes to the successful interaction of *R. etli* with common bean. This proposed efflux pump may participate, together with other components such as NodI and NodJ, in the secretion of the NFs and additional rhizobial-derived signal molecules such as succinoglycans which play a crucial role in the progression of the rhizobial infection beyond the root epidermal cells (Kawaharada et al., 2015; Maillet et al., 2020). In *R. etli* and in *R. leguminosarum* bv. *trifolii* mutations in *nodI* and *nodJ* genes affect the amounts of NFs secreted (McKay and Djordjevic, 1993; Cárdenas et al., 1996). The *R. etli* NodI and NodJ mutants presented a delayed nodulation phenotype and a reduction in the number of nodules formed suggesting that additional transport systems are involved in the secretion of NF in *R. etli* (Cárdenas et al., 1996). Functional characterization of *RetPC55* and *RetPC56*, i.e., through phenotypical analysis of mutants deleted in these genes is needed to vulnerate this hypothesis.

Multidrug resistance efflux systems have shown to contribute to a successful symbiotic interaction between nitrogen-fixing bacteria and their host plants as they prevent accumulation of plant-derived toxic compounds (González-Pasayo and Martínez-Romero, 2000; Karunakaran et al., 2009; Lindemann et al., 2010; Eda et al., 2011; Santos et al., 2014; Tett et al., 2014). The genome of *R. etli* CFN42 possesses 44 genes encoding putative antimicrobial efflux pumps (Ormeño-Orrillo et al., 2012). In this study, we have demonstrated that the functionality of the RetPC57 regulator affects the symbiotic transcriptional response of *R. etli* genes that are part of the MDR efflux systems. Previously it has been shown that *R. etli* RmrAB

mutants are affected in nodulation with bean plants and are more sensitive to phytoalexins, flavonoids and salicylic acid (González-Pasayo and Martínez-Romero, 2000). Interestingly, in *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 a mutation in *rmrA* does not affect the antimicrobials susceptibility of the strain. Not only the expression of *rmrA* gene had been found to be different between these two closely related bacteria, contrary to what is observed in *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 (Tett et al., 2014), we found that in *R. etli* the *RHE_CH1192* gene (the putative ortholog of the *Rlv3841salaA* gene) was expressed inside the nodules in the presence of a functional RetPC57. We also observed that *mexE1* and *mexF1* genes are induced in the RetPC57 mutant. In *R. etli* the role of these genes is unknown, however, in *A. tumefaciens* mutants defective in these genes are less virulent in response to acetosyringone and more sensitive to the toxic effects of chloramphenicol (Binns and Zhao, 2020). Previously, the expression of the *R. etli nodTc* gene was reported as constitutive and its mutation does not affect nodulation with common beans nor sensitivity to toxic compounds (Hernández-Mendoza et al., 2007). However, in this work we have shown that the expression of the *nodTc* gene was induced in symbiosis. The discrepancy between Hernández-Mendoza et al. (2007) and this work could be due to the presence of multiple efflux pumps with redundant functions. In addition, the host-specificity of efflux pumps functions has been demonstrated (Lindemann et al., 2010). For example, our results clearly shown that *RetPC55*, *RetPC56* and *nodTc* genes were induced in symbiosis with common bean plants. Conversely transcriptomic analysis of *R. leguminosarum*, bacteroids reported that pRL100286-87 and pRL100291 genes (the putative orthologs of these genes) were down-regulated in bacteroids of common bean and pea nodules (Green et al., 2019). Even more, mutants in pRL100286-87 genes improved bacterial colonization in pea roots (Wheatley et al., 2020). In *R. leguminosarum* bv. *viciae* mutants in the *nodT* gene led to

a delay in nodulation on *Trifolium subterraneum* but not on *V. sativa* plants (Canter Cremers et al., 1989). However, in *R. leguminosarum* bv. *trifolii* nodulation is not affected in a NodT mutant (Spaink et al., 1995).

The specific mechanism of action of the RetPC57 regulator is yet unclear. One possibility is that the RetPC57-RetPC58 TCS promotes, directly or indirectly, the adequate expression of the *nod* genes required for the optimal synthesis and secretion of the NFs indispensable for the infection and nodule initiation. The participation of some TCS had been reported as regulators of the expression of the MDR systems, thus another possibility is that this TCS may contribute to prevent the accumulation of toxic plant compounds to protect the bacteroid in the nodules from toxic levels of flavonoids and toxic plant compounds through modifying the expression of the MDR systems. Future experimental evidence is needed to explore these possibilities.

In this work we showed that a Δ RetPC57 mutant strain used as common bean inoculant presented a delayed attachment to roots and formed less nodules, but it showed higher nitrogenase activity in comparison to the WT-inoculated common bean plants. The optimal communication between rhizobia and its host plant ensures the activation of two plant genetic programs that independently control the rhizobial infection and the nodule developmental (Tsyganov et al., 2002; Suzaki et al., 2015; Liu et al., 2019; Roy et al., 2020). The reduced number of nodules elicited by the Δ RetPC57 mutant could be, at least partially, explained by the reduced expression of genes involved in the production of the NF (i.e., *nodA* and *nodB*). Furthermore, plants inoculated with the Δ RetPC57 strain showed reduced expression of genes participating in the plant genetic programs controlling the rhizobial infection process (i.e., *CYCLOPS*, *NSP2*, *NIN* and *NF-YA*) and nodule development (i.e., *ENOD40*), compared with plants inoculated with the WT strain. Different studies in several legumes indicate that a delay in the activation of the rhizobial infection process results in a delay in the activation of the nodule developmental program (Oldroyd and Downie, 2008; Murray, 2011; Oldroyd et al., 2011; Roy et al., 2020). In agreement, the delay observed during initial infection by the Δ RetPC57 strain appears to be translated into a decreased ability to promote nodulation.

Nitrogen fixation activity was higher in nodules occupied by the strain lacking RetPC57; this is in line with an increased expression of bacterial genes involved in microaerobic respiration (*hfixL*, *fixKf*, *fmrNch*, *fmrNd* and *fixN*) and in nitrogenase biosynthesis (*nifA* and *nifH*). It is still unclear if RetPC57 exerts a direct or an indirect regulation on these genes. *fixKf* is the only gene known to be regulated by an OmpR-like protein (FxxR) (Zamorano-Sánchez et al., 2012) and it is not known if RetPC57 could recognize the same *cis*-regulatory site as that recognized by FxxR. It is possible that RetPC57 activates additional transcriptional regulators that, in turn, promote the expression of symbiotic genes. In this direction, experiments to understand the global gene expression exerted by the RetPC57 regulator are underway in our laboratory.

Not only bacteroid genes are affected by the absence of RetPC57, but plant nodule genes that encode the phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) and the glutamate synthase (GOGAT), crucial for an efficient carbon and nitrogen metabolism in the nodule (Udvardi and Poole, 2013) also showed increased expression in Δ RetPC57-elicited nodules. This altered common bean genes expression likely responds to changes in the requirement of carbon by the bacteroids and/or to the excess of ammonia from enhanced nitrogen fixation. It is largely known that nitrogen fixation in the root nodules is an energetically expensive process, thus legume plants control the number of nodules formed mainly through the regulatory mechanism called autoregulation of nodulation (AON) (Reid et al., 2011). Here we show that nodules elicited by the Δ RetPC57 mutant are effective, these are even bigger and with an increased capacity to fix nitrogen than those elicited by WT. The later indicates that the functionality of the Δ RetPC57 bacteroids compensate the less number of nodules elicited.

CONCLUSION

In conclusion, our results unveiled a previously uncharacterized OmpR-like regulator, RetPC57, that adds a new element to the sophisticated transcriptional regulatory circuits that govern symbiosis between *R. etli* and common bean plants.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains, Plasmids, and Growth Conditions

The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in **Supplementary Table 3**. *E. coli* strains were grown at 37°C in Luria-Bertani (LB) medium supplemented with the appropriate antibiotics. *Rhizobium* strains were grown at 30°C in peptone-yeast (PY) medium supplemented with CaCl₂ (7 mM) (Noel et al., 1984) or in Y minimal medium (MMY) with succinate (10 mM) and ammonium chloride (10 mM) as carbon and nitrogen sources, respectively (Bravo and Mora, 1988). Antibiotics were used at the following concentrations: carbenicillin (Cb), 100 μ g ml⁻¹ (*E. coli*); fosfomicin (Fm), 100 μ g ml⁻¹ (*Rhizobium*); gentamicin (Gm), 15 μ g ml⁻¹ (*E. coli* and *Rhizobium*); kanamycin (Km), 30 μ g ml⁻¹ (*E. coli* and *Rhizobium*); nalidixic acid (Nal), 20 μ g ml⁻¹ (*Rhizobium*); streptomycin (Sm), 200 μ g ml⁻¹ (*Rhizobium*); tetracycline (Tc), 10 μ g ml⁻¹ (*E. coli* and *Rhizobium*). β -galactosidase activity was routinely used for selection of recombinant plasmids. 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal) was used in plates at 20 μ g ml⁻¹. When required, sucrose was added at 12% (W/V). For growth conditions, cultures were grown to mid-exponential phase in PY medium. Cells were collected by centrifugation, washed with sterile MMY, and concentrated 100-fold. MMY were inoculated with these suspensions at an initial optical density at 540 nm (O.D.₅₄₀) of 0.05. Cultures were grown with shaking (200 rpm) for 6 h

at 30°C. For stationary growth phase, cultures were grown for 12 h at 30°C with shaking (200 rpm). For microaerobic growth conditions, cultures were prepared as described in Girard et al. (1996). For cumate (Q) induction experiments cells were cultivated with cumate at a final concentration of 5 µg/ml.

Microbiological and Recombinant DNA Methods

Genomic and plasmid DNA isolation, digestion with restriction enzymes, ligations, agarose gel electrophoresis and *E. coli* transformation were performed using standard protocols (Sambrook et al., 1989). Enzymes used for DNA restriction and modification were purchased from Thermo Scientific™ and used according to the manufacturer's instructions. Conjugative transfer of plasmids from *E. coli* to *R. etli* was done by triparental crosses using pRK2013 as conjugation helper. For determination of plasmid profiles, a modified Eckhardt procedure was used (Hynes and McGregor, 1990).

PCR Amplification

Specific PCR primers were designed using the Oligo 7 software and were synthesized at the Unidad de Síntesis Química IBt-UNAM. PCR amplifications were done in a Veriti 96 well Thermal Cycler (Applied Biosystems). High Fidelity Pol DNA Polymerase (Jena Bioscience) was used in PCR reactions following the manufacturer's instructions. Cycling regime was determined according the primers melting temperature and the length of the DNA fragment to be amplified. **Supplementary Table 4** shows the primer sequences used in this work.

Plasmid Construction

To construct a plasmid useful for homogenization lacking the *RetPC57* gene, the two regions flanking the gene were amplified with specific primers (**Supplementary Table 4**). The two resulting PCR products were then fused using the overlapping extension PCR methodology (Shevchuk et al., 2004). The assembled product was then recovered using the proper primers and cloned into the pJET1.2/blunt cloning vector (Thermo Scientific™) and sequenced to confirm that the fused product was correctly obtained with no nucleotide changes. The appropriate restriction fragments were subcloned into the suicide plasmid pK**mobsacB* (Schäfer et al., 1994) yielding plasmid pK:Δpc57.

To generate plasmids for expression analysis, regulatory regions of the desired genes were cloned in the broad-host plasmid (Girard et al., 2000) carrying a promoterless *uidA* gene. The intergenic region *RetPC57* and *RetPC56* was obtained by PCR using primers Up-PC57gus and Lw-PC57gus. The 928 bp *EcoRI* fragment was cloned in both directions in pBBMCS53 to obtain plasmids pPC57-gus and pPC56-gus. The correct orientation of the fragments in plasmids was verified with primer gusLw and the corresponding upper primer of each gene. The transcriptional fusion *RetPC58:uidA* was constructed using primers Up-PC57gus and Lw-PC58gus. The 1393 bp PCR product was cloned into the pCR2.1 TOPO (Invitrogen) vector. Then, a 528 bp *EcoRI-XhoI* fragment was clone in pBBMCS53

plasmid to obtain plasmid pPC58-gus. Plasmid pnodTc-gus carrying *nodTc:uidA* transcriptional fusion was constructed by cloning the 1210 bp *SacI-SalI* fragment synthesized by PCR using primers Up-nodTcgus and Lw-nodTcgus.

A plasmid carrying the *R. etli RetPC57* gene expressed from the cumate-inducible promoter ($P_{R/cmtO}$) was obtained by cloning the *RetPC57* coding region in the broad-host range vector pLC290 (Chubiz et al., 2013). To that end, primers Up-QPC57 and Lw-QPC57 were used to amplify a product of 711 bp by PCR. The amplification product was cloned into the pJET1.2/blunt (Thermo Scientific™) vector and subsequently sequenced. The insert was then subcloned into the pLC290 plasmid with the *XbaI-SpeI* sites introduced by the primers, to obtain pQPC57 plasmid.

To construct plasmids carrying the *RetPC57* gene expressed from its native promoter, a 1,095 bp product was obtained by PCR, using total DNA from strain CE3 and the specific primers Up-PC57-Cpl and Lw-PC57-Cpl. The amplification product was cloned into the pJET1.2/blunt (Thermo Scientific™) vector and subsequently sequenced. Then, the *NsiI-XhoI* fragment was subcloned into the conjugative plasmids pFAJ1700 (Dombrecht et al., 2001) and pGUS (pFAJ1700/*placZ:uidA*, Isidra-Arellano et al., 2018) to generate the plasmids pPC57 and pGUS-pc57, respectively.

Rhizobium etli Mutant Derivatives

Replacement of the *R. etli RetPC57* wild-type allele by the respective deleted mutant allele in the plasmid pK:Δpc57, was carried out by homogenization using the *sacB* marker present in the donor plasmid. Double recombinants were selected as Sac^R , Sm^R , Km^S transconjugants. Eckhardt type gels were used to verify the absence of genomic rearrangements (Hynes and McGregor, 1990). To confirm the lack of the gene, PCR reactions using genomic DNA from both WT and candidates were done using the specific internal primers Up-RetPC57 and Lw-RetPC57.

Rhizobium etli WT/pLC290, WT/pQPC57, WT/pPC57-gus, WT/pPC56-gus, WT/pPC58-gus, WT/pnodTc-gus, WT/pPC57-gus/pLC290, WT/pPC57-gus/pQPC57, WT/pPC56-gus/pQPC57, WT/pnodTc-gus/pQPC57, WT/pFAJ1700, WT/pGUS, ΔRetPC57/pGUS ΔRetPC57/pPC57, and ΔRetPC57/pGUS-pc57 strains were obtained by triparental mating using *E. coli* DH5a strain carrying either plasmids pLC290, pQPC57, pPC57-gus, pPC56-gus, pPC58-gus, pnodTc-gus, pFAJ1700, pGUS, pPC57 or pGUS-pc57 and selected with the appropriate antibiotics (See **Supplementary Table 3**). Plasmid profiles were analyzed by Eckhardt.

Measurement of GUS Activity

Aerobic cultures of *R. etli* strains harboring transcriptional fusions were grown as described previously (Girard et al., 2000). Quantitative GUS activity was determined on 3.0 ml cultures samples using 4-nitrophenyl β-D-glucuronide as substrate, as described previously (Girard et al., 2000). Data were normalized to total cell protein concentration using Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) over a second set of 3.0 ml samples. Specific activities are reported in nanomoles of product per minute per milligram of protein.

Plant Material and Growth Conditions

Common bean *Phaseolus vulgaris* cv. Negro Jamapa seeds were surface-sterilized by soaking in 96% (v/v) ethanol for 30 sec followed for 7 min with 6% sodium hypochlorite solution with shaking. Seeds were subsequently washed several times with sterilized water and placed on plates containing 1% water-agar to germinate at 30°C for 48 h in the dark.

For plants grown in hydroponic conditions, seedlings of similar size were transferred to plastic trays containing 8 L of nitrogen-free Fahræus nutrient solution (Fahræus, 1957). After transplanting, each seedling was inoculated with 1 ml of bacterial suspension (10^8 cells ml^{-1}) of the desired bacterial strain. Nutrient solution was totally renovated 48 h later and started to be aerated with aquarium air pumps. The volume and pH (6.5) of the trays were controlled throughout the experiment. Plants were grown in a glasshouse under controlled environment conditions (25°C–27°C, 70% humidity, and natural illumination).

For nodulation kinetic, selected 2-day-old uniform seedling were transferred to growth pouches (CYGTM) containing 10 ml of nitrogen-free Fahræus nutrient solution (Fahræus, 1957) under controlled environmental conditions (14/10 h light/dark cycle, 22°C/16°C and relative humidity 60 to 70%) and were incubated 30 days. Each seedling was inoculated with 1 ml of bacterial solution (10^8 cells ml^{-1}) of the desired bacterial strain. For each bacterial strain, six growth pouches containing one seedling each were analyzed daily for nodule appearance and the number of nodules was scored each day for 30 days.

The expression analysis of selected plant and bacterial genes which participate in the rhizobial infection process, was analyzed as described by Nova-Franco et al. (2015). Briefly, 2-day-old selected uniform common bean seedlings were placed in plastic square bioassay dishes with solid nitrogen-free Fahræus nutrient solution and were incubated in a growth chamber at 25°C, 16/8 h light/dark cycle and relative humidity 70%. Each seedling was inoculated with 1 ml of bacterial solution (10^8 cells ml^{-1}) of the desired strain. After 1 dpi, the zone of the root susceptible to rhizobium infection (hereafter referred as susceptible zone) was detached, frozen in liquid nitrogen, and stored at –80°C until used.

To evaluate the expression of the bacterial selected genes, 2-day-old selected uniform common bean seedlings were transferred into a hydroponic system and inoculated as described before. After 9 dpi, roots were detached, while at 21 dpi nodules and roots (roots from which nodules were harvested) were collected separately and frozen in liquid nitrogen, and stored at –80°C until used.

Evaluation of Nitrogen Fixation Capacity

Nitrogenase-specific activity was determined by acetylene-reduction assay (ARA) in nodules as described by Hardy et al. (1968) using a gas chromatograph (Varian 3300). Leghaemoglobin content (Lb) was determined in plants harvested after 21, 25 and 30 dpi as previously described by LaRue and Child (1979). Fluorescence in samples was measured in a microplate reader (SynergyTM H1, BioTek Instruments, Inc.) with an excitation wavelength set at 405 nm and an emission set

at 650 nm. The difference in fluorescence between heated and unheated samples was proportional to heme protein content. The Lb content was determined from three biological replicates in three independent experiments.

Nodule Histology

Collected nodules were prepared as described in Reyero-Saavedra et al. (2017). For pictures, safranin-stained semi-thin sections (25 μm) from twenty nodules of each strain detached 21 dpi were prepared using a hand-microtome and stained for 5 min with safranin in 50% ethanol before embedded in LR-White Resin were examined with a Zeiss AX10 microscope coupled to a Zeiss Axiocam 503 color digital camera (Carl Zeiss). Images were processed using ImageJ 1.52v.

Root Hair Deformation and Rhizobia Attachment Assay

Two-day-old common bean seedling were transferred into modified nitrogen-free Fahræus medium plates (Catoira et al., 2000) and inoculated with 1 ml suspension (O.D.₆₀₀ = 0.3) of rhizobia WT (WT/pGUS), mutant ($\Delta\text{RetPC57/pGUS}$), or the complement ($\Delta\text{RetPC57/pGUS-pc57}$) strains. After four and six dpi, the zone of the root susceptible to rhizobial infection (hereafter referred as susceptible zone) were collected and immersed in GUS staining solution [0.05% 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl- β -D-glucuronic acid (X-gluc), 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7), 0.5 mM potassium ferrocyanide, 0.5 mM potassium ferricyanide, 10 mM Na₂EDTA and 0.1% Triton X-100] and incubated for 3 h at 37°C. To evaluate the rhizobia adhesion to the common bean roots, pictures of susceptible zones showing blue color were captured using a bright field SZX10 stereomicroscope (Olympus) equipped with an Olympus UC50 camera (Olympus). To quantify the number of rhizobia-induced root hair deformation events, susceptible zones were examined under bright-field microscopy (Velaquin) equipped with an 18 Mega-Pixels Digital Camera with Aptina CMOS Sensor (Velaquin). For these experiments, four biological replicates, each one with six roots from different seedlings, were included.

RNA Purification and Quantitative RT-PCR Analysis

Total RNA of WT and $\Delta\text{RetPC57}$ were purified from a culture of 60 ml (as described in Bacterial strains, plasmids, and growth conditions section). After 6 h of growing, the samples were centrifuged at 10,000 rpm for 5 min at 4°C, the pellet was stored at –80°C until used. The pellet was resuspended with 100 μl of 1% TE buffer (10 mM Tris – 1 mM EDTA in 1% DEPC H₂O), then enzymatic lysis was done with lysozyme (20 mg/ml) and proteinase K (Thermo Scientific). Total RNA was isolated using an RNeasy^R Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Total RNAs of frozen roots or nodules were purified from 250 or 100 mg, respectively, using TRIzolTM Reagent (Thermo Fischer Scientific, Inc.) following manufacturer's instructions.

RNA was quantified using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific, Inc) and electrophoresed under denaturing conditions in agarose-formaldehyde gels. Genomic DNA was removed from RNA using DNaseI RNase-free (Thermo Fischer Scientific, Inc) in the presence of a ribonuclease inhibitor (RiboLock™ RNase inhibitor, Thermo Fischer Scientific, Inc) according to the manufacturer's instructions. Absence of genomic DNA contamination was confirmed by PCR amplification, using primers designed for the *rpoA* reference gene. To analyze the expression of selected genes, first-stranded cDNA was synthesized 2.0 mg of DNA-free total RNA by the oligo-dT (for plant genes) or the random priming (for bacterial genes) methods using Thermo Scientific RevertAid™H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc) according to manufacturer's instructions (Hernández et al., 2007; Ramírez et al., 2013).

The expression level of the desired genes was quantified by qRT-PCR in a CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad). The Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fischer Scientific, Inc.) was used in PCR reactions using two-step cycling protocol according to the manufacturer's instructions. The expression level of different genes was calculated with the $\Delta\Delta C_t$ method, as reported (Hernández et al., 2007). The housekeeping genes ubiquitin *UBC9* and *rpoA* were used to normalize gene expression of plant and bacterial genes, respectively (Hernández et al., 2007; Ramírez et al., 2013). The expression of each gene was determined from three replicates in three independent samples in a single qRT-PCR experiment. Primers used in these experiments were designed by using the Oligo 7 software and are provided in **Supplementary Table 4**.

Identification of *RetPC57-RetPC58* Operon

cDNA of WT strain was used as a template to obtain three PCR products. A 250 bp internal product of *RetPC57* gene was obtained using primers Up-*RetPC57* and Lw-*RetPC57*. For *RetPC58* gene, primers Up-*RetPC58* and Lw-*RetPC58* were used to obtain a 250 bp internal fragment. To amplify an intergenic fragment *RetPC57-RetPC58* primers Up-*RetPC57* and Lw-*PC58gus* were used to obtain a 945 bp product. The PCR reactions were carried as described in PCR amplification section. The amplification products were analyzed by agarose gel electrophoresis with ethidium bromide and capture using an image system (SmartView Pro UVC-1100 Major Science).

Orthologs, Phylogeny, and Genomic Context Analysis

Orthologs and identity of *RHE_PC00055*, *RHE_PC00056*, *RHE_PC00057*, *RHE_PC00058* and *RHE_PC00059* genes were obtained from Sequence Similarity Data Base (SSDB) of KEGG (**Supplementary Table 1**). Protein sequences of orthologs were collected from UniProt database. A multiple sequence alignment was performed using CLUSTALW with BLOSUM as weight matrix⁴.

⁴<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>

The Interactive Tree of Life (iTOL⁵; Letunic and Bork, 2019) was used for the display and manipulation of the phylogenetic tree. Comparative genomic context analysis was performed using the Integrated Microbial Genomes (IMG⁶; Chen et al., 2019).

Statistical Analysis

All statistical analyses were analyzed by Student's *t*-test using the GraphPad Prism 7.0a software. Differences were statistically significant if the *P*-value was lower than 0.05 ($P \leq 0.05$).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**, further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SR and LG conceived and designed the study. SR, DC-G, MR, MI-A, and MR-S performed the experiments. MS-P performed *in silico* analyses. SR, DZ-S, OV-L, GH, and LG analyzed the data and wrote the manuscript. All authors contributed to the critical revision of the manuscript, read and approved the submitted version.

FUNDING

Partial financial support for this work was provided by grants IN206017, IN204320, and IN201320 from DGAPA, UNAM, and grants A1-S-22570 and A1-S-9454 from CONACyT. SR is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM and received Fellowship 595292 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. DC-G received a Postdoctoral Fellowship from DGAPA.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Susana Brom for critically reviewing the manuscript; Dr. Jaime Mora for greenhouse facilities; Ma. de la Paz Elizabeth Salas, Marisa Rodríguez, and Sara I. Fuentes from Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) for technical assistance; Rubén Paul Gaytán, Eugenio López and Jorge Yáñez, from Unidad de Síntesis y Secuenciación, Instituto de Biotecnología – UNAM for oligonucleotide synthesis and sequencing.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.615775/full#supplementary-material>

⁵<https://itol.embl.de>

⁶<https://img.jgi.doe.gov/help.html>

REFERENCES

- Alvarez-Ortega, C., Olivares, J., and Martínez, J. L. (2013). RND multidrug efflux pumps: what are they good for? *Front. Microbiol.* 4:7. doi: 10.3389/fmicb.2013.00007
- Bahlawane, C., Baumgarth, B., Serrania, J., Rüberg, S., and Becker, A. (2008). Fine-tuning of galactoglucan biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti* by differential WggR (ExpG)-, PhoB-, and MucR-dependent regulation of two promoters. *J. Bacteriol.* 190, 3456–3466. doi: 10.1128/JB.00062-08
- Barakat, M., Ortet, P., and Whitworth, D. E. (2010). P2CS: a database of prokaryotic two-component systems. *Nucleic Acids Res.* 39, D771–D776. doi: 10.1093/nar/gkq1023
- Bardin, S. D., and Finan, T. M. (1998). Regulation of phosphate assimilation in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*. *Genetics* 148, 1689–1700.
- Barnett, M. J., Hung, D. Y., Reisenauer, A., Shapiro, L., and Long, S. R. (2001). A homolog of the CtrA cell cycle regulator is present and essential in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 183, 3204–3210. doi: 10.1128/JB.183.10.3204-3210.2001
- Bélanger, L., Dimmick, K. A., Fleming, J. S., and Charles, T. C. (2009). Null mutations in *Sinorhizobium meliloti* *exoS* and *chvI* demonstrate the importance of this two-component regulatory system for symbiosis. *Mol. Microbiol.* 74, 1223–1237. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06931.x
- Bhattacharya, A., Sood, P., and Citovsky, V. (2010). The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. *Mol. Plant Pathol.* 11, 705–719. doi: 10.1111/j.1364-3703.2010.00625.x
- Binns, A. N., and Zhao, J. (2020). The MexE/MexF/AmeC efflux pump of *Agrobacterium tumefaciens* and its role in Ti plasmid virulence gene expression. *J. Bacteriol.* 202, e609–e619. doi: 10.1128/JB.00609-19
- Blanco, P., Hernando-Amado, S., Reales-Calderon, J. A., Corona, F., Lira, F., Alcalde-Rico, M., et al. (2016). Bacterial multidrug efflux pumps: much more than antibiotic resistance determinants. *Microorganisms* 4:14. doi: 10.3390/microorganisms4010014
- Bravo, A., and Mora, J. (1988). Ammonium assimilation in *Rhizobium phaseoli* by the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway. *J. Bacteriol.* 170, 980–984. doi: 10.1128/jb.170.2.980-984.1988
- Canter Cremers, H. C. J., Spaink, H. P., Wijffjes, A. H. M., Pees, E., Wijffelman, C. A., Okker, R. J. H., et al. (1989). Additional nodulation genes on the Sym plasmid of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae. *Plant Mol. Biol.* 13, 163–174. doi: 10.1007/BF00016135
- Cárdenas, L., Dominguez, J., Santana, O., and Quinto, C. (1996). The role of the *nodI* and *nodJ* genes in the transport of Nod metabolites in *Rhizobium etli*. *Gene* 173, 183–187. doi: 10.1016/0378-1119(96)00166-7
- Casino, P., Rubio, V., and Marina, A. (2009). Structural insight into partner specificity and phosphoryl transfer in two-component signal transduction. *Cell* 139, 325–336. doi: 10.1016/j.cell.2009.08.032
- Catoira, R., Galera, C., de Billy, F., Penmetas, R. V., Journet, E. P., Maillet, F., et al. (2000). Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway. *Plant Cell* 12, 1647–1666. doi: 10.1105/tpc.12.9.1647
- Chakraborty, S., Winardhi, R. S., Morgan, L. K., Yan, J., and Kenney, L. J. (2017). Non-canonical activation of OmpR drives acid and osmotic stress responses in single bacterial cells. *Nat. Commun.* 8:1587. doi: 10.1038/s41467-017-02030-0
- Chen, I. A., Chu, K., Palaniappan, K., Pillay, M., Ratner, A., Huang, J., et al. (2019). IMG/M v.5.0: an integrated data management and comparative analysis system for microbial genomes and microbiomes. *Nucleic Acids Res.* 47, D666–D677. doi: 10.1093/nar/gky901
- Chubiz, L. M., Purswani, J., Carroll, S. M., and Marx, C. J. (2013). A novel pair of inducible expression vectors for use in *Methylobacterium extorquens*. *BMC Res. Notes* 6:183. doi: 10.1186/1756-0500-6-183
- Cosme, A. M., Becker, A., Santos, M. R., Sharypova, L. A., Santos, P. M., and Moreira, L. M. (2008). The outer membrane protein TolC from *Sinorhizobium meliloti* affects protein secretion, polysaccharide biosynthesis, antimicrobial resistance, and symbiosis. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21, 947–957. doi: 10.1094/MPMI-21-7-0947
- Danese, P. N., and Silhavy, T. J. (1998). CpxP, a stress-combative member of the Cpx regulon. *J. Bacteriol.* 180, 831–839. doi: 10.1128/JB.180.4.831-839.1998
- De Nisco, N. J., Abo, R. P., Wu, C. M., Penterman, J., and Walker, G. C. (2014). Global analysis of cell cycle gene expression of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 3217–3224. doi: 10.1073/pnas.1400421111
- Delauné, A., Dubrac, S., Blanchet, C., Poupel, O., Mäder, U., Hiron, A., et al. (2012). The WalKR system controls major *Staphylococcal* virulence genes and is involved in triggering the host inflammatory response. *Infect. Immun.* 80, 3438–3453. doi: 10.1128/IAI.00195-12
- Dixon, R., and Kahn, D. (2004). Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 621–631. doi: 10.1038/nrmicro954
- Dombrecht, B., Vanderleyden, J., and Michiels, J. (2001). Stable RK2-derived cloning vectors for the analysis of gene expression and gene function in gram-negative bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14, 426–430. doi: 10.1094/MPMI.2001.14.3.426
- Downie, J. A. (2014). Legume nodulation. *Curr. Biol.* 24, R184–R190. doi: 10.1016/j.cub.2014.01.028
- Eda, S., Mitsui, H., and Minamisawa, K. (2011). Involvement of the SmeAB multidrug efflux pump in resistance to plant antimicrobials and contribution to nodulation competitiveness in *Sinorhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2855–2862. doi: 10.1128/AEM.02858-10
- Fahraeus, G. (1957). The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J. Gen. Microbiol.* 16, 374–381. doi: 10.1099/00221287-16-2-374
- Figurski, D. H., and Helinski, D. R. (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 1648–1652. doi: 10.1073/pnas.76.4.1648
- Fischer, H. M. (1994). Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol. Rev.* 58, 352–386. doi: 10.1128/mmr.58.3.352-386.1994
- Fleischer, R., Heermann, R., Jung, K., and Hunke, S. (2007). Purification, reconstitution, and characterization of the CpxRAP envelope stress system of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 282, 8583–8593. doi: 10.1074/jbc.M605785200
- Fournier, J., Teillet, A., Chabaud, M., Ivanov, S., Genre, A., Limpens, E., et al. (2015). Remodeling of the infection chamber before infection thread formation reveals a two-step mechanism for rhizobial entry into the host legume root hair. *Plant Physiol.* 167, 1233–1242. doi: 10.1104/pp.114.253302
- Frayse, N., Couderc, F., and Poinot, V. (2003). Surface polysaccharide involvement in establishing the *rhizobium*-legume symbiosis. *Eur. J. Biochem.* 270, 1365–1380. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03492.x
- Gao, R., and Stock, A. M. (2009). Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* 63, 133–154. doi: 10.1146/annurev.micro.091208.073214
- Girard, L., Brom, S., Dávalos, A., López, O., Soberón, M., and Romero, D. (2000). Differential regulation of *fixN*-reiterated genes in *Rhizobium etli* by a novel *fixL*-*fixK* cascade. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13, 1283–1292. doi: 10.1094/MPMI.2000.13.12.1283
- Girard, L., Valderrama, B., Palacios, R., Romero, D., and Dávila, G. (1996). Transcriptional activity of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* is affected by different environmental conditions. *Microbiology* 142, 2847–2856. doi: 10.1099/13500872-142-10-2847
- González, V., Santamaría, R. I., Bustos, P., Hernández-González, I., Medrano-Soto, A., Moreno-Hagelsieb, G., et al. (2006). The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 3834–3839. doi: 10.1073/pnas.0508502103
- González-Pasayo, R., and Martínez-Romero, E. (2000). Multiresistance genes of *Rhizobium etli* CFN42. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13, 572–577. doi: 10.1094/MPMI.2000.13.5.572
- Green, R. T., East, A. K., Karunakaran, R., Downie, J. A., and Poole, P. S. (2019). Transcriptomic analysis of *Rhizobium leguminosarum* bacteroids in determinate and indeterminate nodules. *Microb. Genome* 5:e000254. doi: 10.1099/mgen.0.000254
- Griffitts, J. S., Carlyon, R. E., Erickson, J. H., Moulton, J. L., Barnett, M. J., Toman, C. J., et al. (2008). A *Sinorhizobium meliloti* osmosensory two-component system required for cyclic glucan export and symbiosis. *Mol. Microbiol.* 69, 479–490. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06304.x
- Gumerov, V. M., Ortega, D. R., Adebali, O., Ulrich, L. E., and Zhulin, I. B. (2020). MiST 3.0: an updated microbial signal transduction database with an emphasis on chemosensory systems. *Nucleic Acids Res.* 48, D459–D464. doi: 10.1093/nar/gkz988

- Hardy, R. W., Holsten, R. D., Jackson, E. K., and Burns, R. C. (1968). The acetylene-ethylene assay for n_2 fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 43, 1185–1207. doi: 10.1104/pp.43.8.1185
- Hernández, G., Ramírez, M., Valdés-López, O., Tesfaye, M., Graham, M. A., Czechowski, T., et al. (2007). Phosphorus stress in common bean: root transcript and metabolic responses. *Plant Physiol.* 144, 752–767. doi: 10.1104/pp.107.096958
- Hernández-Mendoza, A., Nava, N., Santana, O., Abreu-Goodger, C., Tovar, A., and Quinto, C. (2007). Diminished redundancy of outer membrane factor proteins in rhizobiales: a *nodT* homolog is essential for free-living *Rhizobium etli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13, 22–34. doi: 10.1159/000103594
- Howden, B. P., McEvoy, C. R., Allen, D. L., Chua, K., Gao, W., Harrison, P. F., et al. (2011). Evolution of multidrug resistance during *Staphylococcus aureus* infection involves mutation of the essential two component regulator WalKR. *PLoS Pathog.* 7:e1002359. doi: 10.1371/journal.ppat.1002359
- Huang, W. Z., Wang, J. J., Chen, H. J., Chen, J. T., and Shaw, G. C. (2013). The heat-inducible essential response regulator WalR positively regulates transcription of *sigI*, *mreBH* and *lytE* in *Bacillus subtilis* under heat stress. *Res. Microbiol.* 164, 998–1008. doi: 10.1016/j.resmic.2013.10.003
- Hynes, M. F., and McGregor, N. F. (1990). Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Microbiol.* 4, 567–574. doi: 10.1111/j.1365-2958.1990.tb00625.x
- Isidra-Arellano, M. C., Reyero-Saavedra, M. D. R., Sánchez-Correa, M. D. S., Pingault, L., Sen, S., Joshi, T., et al. (2018). Phosphate deficiency negatively affects early steps of the symbiosis between common bean and Rhizobia. *Genes* 9:498. doi: 10.3390/genes9100498
- Karunakaran, R., Ramachandran, V. K., Seaman, J. C., East, A. K., Mouhsine, B., Mauchline, T. H., et al. (2009). Transcriptomic analysis of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae in symbiosis with host plants *Pisum sativum* and *Vicia cracca*. *J. Bacteriol.* 191, 4002–4014. doi: 10.1128/JB.00165-09
- Kawaharada, Y., Kelly, S., Nielsen, M. W., Hjuler, C. T., Gysel, K., Muszynski, A., et al. (2015). Receptor-mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection. *Nature* 523, 308–312. doi: 10.1038/nature14611
- Krol, E., and Becker, A. (2004). Global transcriptional analysis of the phosphate starvation response in *Sinorhizobium meliloti* strains 1021 and 2011. *Mol. Genet. Genomics* 272, 1–17. doi: 10.1007/s00438-004-1030-8
- Kumagai, H., Kinoshita, E., Ridge, R. W., and Kouchi, H. (2006). RNAi knock-down of ENOD40s leads to significant suppression of nodule formation in *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol.* 47, 1102–1111. doi: 10.1093/pcp/pcj081
- LaRue, T. A., and Child, J. J. (1979). Sensitive fluorometric assay for leghemoglobin. *Anal. Biochem.* 92, 11–15. doi: 10.1016/0003-2697(79)90618-3
- Letunic, I., and Bork, P. (2019). Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res.* 47, W256–W259. doi: 10.1093/nar/gkz239
- Li, X. Z., and Nikaido, H. (2009). Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs* 69, 1555–1623. doi: 10.2165/11317030-000000000-00000
- Lindemann, A., Koch, M., Pessi, G., Müller, A. J., Balsiger, S., Hennecke, H., et al. (2010). Host-specific symbiotic requirement of BdeAB, a RegR-controlled RND-type efflux system in *Bradyrhizobium japonicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 312, 184–191. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02115.x
- Lipa, P., and Janczarek, M. (2020). Phosphorylation systems in symbiotic nitrogen-fixing bacteria and their role in bacterial adaptation to various environmental stresses. *PeerJ* 8:e8466. doi: 10.7717/peerj.8466
- Liu, C. W., Breakspear, A., Guan, D., Cerri, M. R., Jackson, K., Jiang, S., et al. (2019). NIN acts as a network hub controlling a growth module required for rhizobial infection. *Plant Physiol.* 179, 1704–1722. doi: 10.1104/pp.18.01572
- Maillet, F., Fournier, J., Mendis, H. C., Tadege, M., Wen, J., Ratet, P., et al. (2020). *Sinorhizobium meliloti* succinylated high-molecular-weight succinoglycan and the *Medicago truncatula* LysM receptor-like kinase MtLYK10 participate independently in symbiotic infection. *Plant J.* 102, 311–326. doi: 10.1111/tpj.14625
- Martínez, J. L., Sánchez, M. B., Martínez-Solano, L., Hernández, A., Garmendia, L., Fajardo, A., et al. (2009). Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 430–449. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00157.x
- Masson-Boivin, C., and Sachs, J. L. (2018). Symbiotic nitrogen fixation by rhizobia - the roots of a success story. *Curr. Opin. Plant Biol.* 44, 7–15. doi: 10.1016/j.pbi.2017.12.001
- McKay, I. A., and Djordjevic, M. A. (1993). Production and excretion of nod metabolites by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* are disrupted by the same environmental factors that reduce nodulation in the field. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3385–3392. doi: 10.1128/AEM.59.10.3385-3392.1993
- Mendrygal, K. E., and González, J. E. (2000). Environmental regulation of exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 182, 599–606. doi: 10.1128/jb.182.3.599-606.2000
- Murray, J. D. (2011). Invasion by invitation: rhizobial infection in legumes. *Mol. Plant Microbe Interact.* 24, 631–639. doi: 10.1094/MPMI-08-10-0181
- Mylona, P., Pawlowski, K., and Bisseling, T. (1995). Symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell* 7, 869–885. doi: 10.1105/tpc.7.7.869
- Niehaus, K., Kapp, D., and Pühler, A. (1993). Plant defence and delayed infection of alfalfa pseudonodules induced by an exopolysaccharide (EPS I)-deficient *Rhizobium meliloti* mutant. *Planta* 190, 415–425. doi: 10.1007/BF00196971
- Noel, K. D., Sanchez, A., Fernandez, L., Leemans, J., and Cevallos, M. A. (1984). *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. *J. Bacteriol.* 158, 148–155. doi: 10.1128/jb.158.1.148-155.1984
- Nova-Franco, B., Iñiguez, L. P., Valdés-López, O., Alvarado-Affantranger, X., Leija, A., Fuentes, S. I., et al. (2015). The micro-RNA72c-APETALA2-1 node as a key regulator of the common bean-*Rhizobium etli* nitrogen fixation symbiosis. *Plant Physiol.* 168, 273–291. doi: 10.1104/pp.114.255547
- Oldroyd, G. E. (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 252–263. doi: 10.1038/nrmicro2990
- Oldroyd, G. E., and Downie, J. A. (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 519–546. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839
- Oldroyd, G. E., Harrison, M. J., and Udvardi, M. (2005). Peace talks and trade deals. Keys to long-term harmony in legume-microbe symbioses. *Plant Physiol.* 137, 1205–1210. doi: 10.1104/pp.104.057661
- Oldroyd, G. E., Murray, J. D., Poole, P. S., and Downie, J. A. (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu. Rev. Genet.* 45, 119–144. doi: 10.1146/annurev-genet-110410-132549
- Ormeño-Orrillo, E., Menna, P., Almeida, L. G., Ollero, F. J., Nicolás, M. F., Pains Rodrigues, E., et al. (2012). Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp. PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC Genomics* 13:735. doi: 10.1186/1471-2164-13-735
- Ortet, P., Whitworth, D. E., Santaella, C., Achouak, W., and Barakat, M. (2015). P2CS: updates of the prokaryotic two-component systems database. *Nucleic Acids Res.* 43, D536–D541. doi: 10.1093/nar/gku968
- Piddock, L. J. (2006). Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 629–636. doi: 10.1038/nrmicro1464
- Podgoraia, A. I., and Laub, M. T. (2013). Determinants of specificity in two-component signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* 16, 156–162. doi: 10.1016/j.mib.2013.01.004
- Ramírez, M., Flores-Pacheco, G., Reyes, J. L., Álvarez, A. L., Drevon, J. J., Girard, L., et al. (2013). Two common bean genotypes with contrasting response to phosphorus deficiency show variations in the microRNA 399-mediated *PvPHO2* regulation within the *PvPHR1* signaling pathway. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 8328–8344. doi: 10.3390/ijms14048328
- Ramos, J. L., Martínez-Bueno, M., Molina-Henares, A. J., Teran, W., Watanabe, K., Zhang, X., et al. (2005). The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69, 326–356. doi: 10.1128/MMBR.69.2.326-356.2005
- Reid, D. E., Ferguson, B. J., Hayashi, S., Lin, Y. H., and Gresshoff, P. M. (2011). Molecular mechanisms controlling legume autoregulation of nodulation. *Ann. Bot.* 108, 789–795. doi: 10.1093/aob/mcr205
- Reyero-Saavedra, M. D. R., Qiao, Z., Sánchez-Correa, M. D. S., Díaz-Pineda, M. E., Reyes, J. L., Covarrubias, A. A., et al. (2017). Gene silencing of *Argonaute5* negatively affects the establishment of the legume-rhizobia symbiosis. *Genes* 8:352. doi: 10.3390/genes8120352
- Reyes-González, A., Talbi, C., Rodríguez, S., Rivera, P., Zamorano-Sánchez, D., and Girard, L. (2016). Expanding the regulatory network that controls nitrogen fixation in *Sinorhizobium meliloti*: elucidating the role of the two-component system hFixL-FxkR. *Microbiology* 162, 979–988. doi: 10.1099/mic.0.000284

- Rípodas, C., Castaingts, M., Clúa, J., Villafane, J., Blanco, F. A., and Zanetti, M. E. (2019). The PvNF-YA1 and PvNF-YB7 subunits of the heterotrimeric NF-Y transcription factor influence strain preference in the *Phaseolus vulgaris*-*Rhizobium etli* symbiosis. *Front. Plant Sci.* 10:221. doi: 10.3389/fpls.2019.00221
- Rotter, C., Mühlbacher, S., Salamon, D., Schmitt, R., and Scharf, B. (2006). Rem, a new transcriptional activator of motility and chemotaxis in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 188, 6932–6942. doi: 10.1128/JB.01902-05
- Roy, S., Liu, W., Nandety, R. S., Crook, A., Mysore, K. S., Pislariu, C. I., et al. (2020). Celebrating 20 years of genetic discoveries in legume nodulation and symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell* 32, 15–41. doi: 10.1105/tpc.19.00279
- Rutten, P. J., and Poole, P. S. (2019). Oxygen regulatory mechanisms of nitrogen fixation in rhizobia. *Adv. Microb. Physiol.* 75, 325–389. doi: 10.1016/bs.ampbs.2019.08.001
- Saier, M. H. Jr., and Paulsen, I. T. (2001). Phylogeny of multidrug transporters. *Semin. Cell Dev. Biol.* 12, 205–213. doi: 10.1006/scdb.2000.0246
- Salazar, M. E., and Laub, M. T. (2015). Temporal and evolutionary dynamics of two-component signaling pathways. *Curr. Opin. Microbiol.* 24, 7–14. doi: 10.1016/j.mib.2014.12.003
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santos, M. R., Marques, A. T., Becker, J. D., and Moreira, L. M. (2014). The *Sinorhizobium meliloti* EmrR regulator is required for efficient colonization of *Medicago sativa* root nodules. *Mol. Plant Microbe Interact.* 27, 388–399. doi: 10.1094/MPMI-09-13-0284-R
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., and Pühler, A. (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145, 69–73. doi: 10.1016/0378-1119(94)90324-7
- Schauser, L., Roussis, A., Stiller, J., and Stougaard, J. (1999). A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature* 402, 191–195. doi: 10.1038/46058
- Shevchuk, N. A., Bryksin, A. V., Nusinovich, Y. A., Cabello, F. C., Sutherland, M., and Ladisch, S. (2004). Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously. *Nucleic Acids Res.* 32:e19. doi: 10.1093/nar/gnh014
- Spaink, H. P. (2000). Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 257–288. doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.257
- Spaink, H. P., Wijffes, A. H., and Lugtenberg, B. J. (1995). *Rhizobium* NodI and NodJ proteins play a role in the efficiency of secretion of lipochitin oligosaccharides. *J. Bacteriol.* 177, 6276–6281. doi: 10.1128/jb.177.21.6276-6281.1995
- Stock, A. M., Robinson, V. L., and Goudreau, P. N. (2000). Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 183–215. doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.183
- Suzaki, T., Yoro, E., and Kawaguchi, M. (2015). Leguminous plants: inventors of root nodules to accommodate symbiotic bacteria. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 316, 111–158. doi: 10.1016/bs.ircmb.2015.01.004
- Tambalo, D. D., Del Bel, K. L., Bustard, D. E., Greenwood, P. R., Steedman, A. E., and Hynes, M. F. (2010). Regulation of flagellar, motility and chemotaxis genes in *Rhizobium leguminosarum* by the VisN/R-Rem cascade. *Microbiology* 156(Pt 6), 1673–1685. doi: 10.1099/mic.0.035386-0
- Tett, A. J., Karunakaran, R., and Poole, P. S. (2014). Characterisation of SalRAB a salicylic acid inducible positively regulated efflux system of *Rhizobium leguminosarum* bv viciae 3841. *PLoS One* 9:e103647. doi: 10.1371/journal.pone.0103647
- Tsyganov, V. E., Voroshilova, V. A., Priefer, U. B., Borisov, A. Y., and Tikhonovich, I. A. (2002). Genetic dissection of the initiation of the infection process and nodule tissue development in the *Rhizobium*-pea (*Pisum sativum* L.) symbiosis. *Ann. Bot.* 89, 357–366. doi: 10.1093/aob/mcf051
- Udvardi, M., and Poole, P. S. (2013). Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 781–805. doi: 10.1146/annurev-arplant-050312-120235
- Ulrich, L. E., and Zhulin, I. B. (2009). The MiST2 database: a comprehensive genomics resource on microbial signal transduction. *Nucleic Acids Res.* 38, D401–D407. doi: 10.1093/nar/gkp940
- Vanderlinde, E. M., and Yost, C. K. (2012). Mutation of the sensor kinase *chvG* in *Rhizobium leguminosarum* negatively impacts cellular metabolism, outer membrane stability, and symbiosis. *J. Bacteriol.* 194, 768–777. doi: 10.1128/JB.06357-11
- Venkateshwaran, M., Volkening, J. D., Sussman, M. R., and Ané, J. M. (2013). Symbiosis and the social network of higher plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16, 118–127. doi: 10.1016/j.pbi.2012.11.007
- Vogt, S. L., and Raivio, T. L. (2012). Just scratching the surface: an expanding view of the Cpx envelope stress response. *FEMS Microbiol. Lett.* 326, 2–11. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02406.x
- Wang, C., Kemp, J., Da Fonseca, I. O., Equi, R. C., Sheng, X., Charles, T. C., et al. (2010). *Sinorhizobium meliloti* 1021 loss-of-function deletion mutation in *chvI* and its phenotypic characteristics. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23, 153–160. doi: 10.1094/MPMI-23-2-0153
- Wang, L., Lacroix, B., Guo, J., and Citovsky, V. (2017). Transcriptional activation of virulence genes of *Rhizobium etli*. *J. Bacteriol.* 199, JB.841–JB.816. doi: 10.1128/JB.00841-16
- Wheatley, R. M., Ford, B. L., Li, L., Aroney, S. T. N., Knights, H. E., Ledermann, R., et al. (2020). Lifestyle adaptations of *Rhizobium* from rhizosphere to symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 117, 23823–23834. doi: 10.1073/pnas.2009094117
- Wheatley, R. M., and Poole, P. S. (2018). Mechanisms of bacterial attachment to roots. *FEMS Microbiol. Rev.* 42, 448–461. doi: 10.1093/fems/re/fuy014
- Xue, S., and Biondi, E. G. (2019). Coordination of symbiosis and cell cycle functions in *Sinorhizobium meliloti*. *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* 1862, 691–696. doi: 10.1016/j.bbagr.2018.05.003
- Yuan, Z. C., Zaheer, R., Morton, R., and Finan, T. M. (2006). Genome prediction of PhoB regulated promoters in *Sinorhizobium meliloti* and twelve *proteobacteria*. *Nucleic Acids Res.* 34, 2686–2697. doi: 10.1093/nar/gkl365
- Zamorano-Sánchez, D., Reyes-González, A., Gómez-Hernández, N., Rivera, P., Georgellis, D., and Girard, L. (2012). FxkR provides the missing link in the *fixL*-*fixK* signal transduction cascade in *Rhizobium etli* CFN42. *Mol. Plant Microbe Interact.* 25, 1506–1517. doi: 10.1094/MPMI-05-12-0136-R
- Zanetti, M. E., Blanco, F. A., Beker, M. P., Battaglia, M., and Aguilar, O. M. (2010). A C subunit of the plant nuclear factor NF-Y required for rhizobial infection and nodule development affects partner selection in the common bean-*Rhizobium etli* symbiosis. *Plant Cell* 22, 4142–4157. doi: 10.1105/tpc.110.079137

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Rodríguez, Correa-Galeote, Sánchez-Pérez, Ramírez, Isidra-Arellano, Reyero-Saavedra, Zamorano-Sánchez, Hernández, Valdés-López and Girard. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.