

03062

4
4

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE POSGRADO
DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION DE NITROGENO

OBTENCION Y CARACTERIZACION DE MUTANTES DE *Rhizobium etli*
CFN42 EN GENES INDUCIBLES POR EXUDADO DE FRIJOL

TESIS DE MAESTRIA (Investigacion
Biomedica Basica)

PRESENTA

RAMON ALEJANDRO GONZALEZ PASAYO

FEBRERO 1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO
EN EL DEPARTAMENTO DE GENETICA MOLECULAR
DEL CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION DE NITROGENO
DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
BAJO LA ASESORIA DE LA DRA. ESPERANZA MARTINEZ ROMERO.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Esperanza el apoyo y la confianza brindados sin los cuales no hubiese sido posible la realización de este trabajo.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y en especial al Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno por darme la oportunidad de conseguir mis objetivos profesionales.

Agradezco al Comité Tutorial, los Drs. Esperanza Martínez, Georgina Hernández y Mario Rocha, por sus valiosos consejos y sugerencias que contribuyeron al desarrollo de esta investigación.

Agradezco al Jurado de Exámen, los Drs. Esperanza Martínez, Mario Soberón, Georgina Hernández, David Romero y Juan Miranda, por sus críticas y opiniones sobre la escritura de la tesis.

Agradezco al Dr. Guillermo Dávila y a Q.I. Patricia Bustos (Lab. I, CIFN) por la obtención de la secuencia de nucleótidos, y a Q.I. Paul Gaytán y Q.I. Eugenio López (Instituto de Biotecnología) por la síntesis de oligonucleótidos.

Agradezco a Mónica, Brenda, Julio, Leticia y Gabriela por su ayuda y comentarios.

Agradezco a mis compañeros y personal del CIFN por su colaboración.

Agradezco a los Drs. Gabriel Favelukes, Mario Aguilar y Daniel Grasso por haberme iniciado en la investigación.

Agradezco a todos los que me dieron su compañía y amistad en México.

DEDICADO A MIS PADRES,
POR SU CONTINUO APOYO

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
OBJETIVOS	6
MATERIALES Y METODOS	7
RESULTADOS	13
DISCUSION	19
CONCLUSIONES	29
BIBLIOGRAFIA	30
FIGURAS Y TABLAS	38

RESUMEN

La interacción temprana entre rizobios y leguminosas comienza con el reconocimiento por parte de la bacteria de compuestos que son exudados por las raíces de las plantas huéspedes. Estos compuestos tienen diversos efectos sobre los rizobios, entre ellos quizá el de mayor importancia es el efecto sobre la expresión génica.

El objetivo de este trabajo fue obtener secuencias de *Rhizobium* inducidas por exudados de frijol. Con este fin, se mutagenizó la cepa *Rhizobium etli* CFN42 utilizando el transposón *Tn5B30* que contiene el gen *npt* (neomicina fosfotransferasa) como gene reportero. Se analizó un banco de 3000 mutantes y entre ellas se identificaron 4 cepas (CFNA3, CFNA31, CFNB3 y CFNB18) que poseen dicho transposón insertado en genes inducidos por los compuestos exudados por frijol. Estos genes también son inducidos por varios flavonoides (naringenina, genisteína, daidzeína, apigenina, crisina, quercitina y quercetagina). Tres de las cuatro inserciones (CFNA3, CFNB3 y CFNB18) son cromosomales y la restante (CFNA31) se localiza en el plásmido b. Las cepas CFNA3 y CFNA31 presentan reducción en el número de nódulos que forman en raíces de frijol respecto a la cepa silvestre.

El gene inducible del plásmido b fue secuenciado. La secuencia de aminoácidos deducida, presenta similitud significativa (33.9% de identidad y 52.0% de similitud) con el gene *emrA* de *Escherichia coli* que forma parte de un operón que otorga resistencia a compuestos tóxicos. Por esta razón se lo denominó *rmrA1*. La cepa mutante en este gen presenta deficiencia en el crecimiento en presencia del exudado de raíz y reducción en el número de nódulos formados en plantas de frijol respecto a la cepa silvestre. Se propone que el gene *rmrA1* está involucrado en un mecanismo de defensa contra toxinas presentes en la rizósfera de frijol.

INTRODUCCION

SIMBIOSIS ENTRE *Rhizobium* Y LEGUMINOSAS

Las interacciones que pueden establecerse entre plantas y bacterias del suelo son múltiples. Uno de los tipos de interacciones más estudiados es la relación simbiótica (mutualismo) que se establece entre bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Azorhizobium* y *Bradyrhizobium*, colectivamente denominados rizobios (Long, 1989). Dichas bacterias son capaces de vivir libremente en el suelo y en ciertas condiciones pueden invadir y formar nódulos en raíces o tallos de plantas leguminosas. Dentro de los nódulos, los rizobios fijan el nitrógeno atmosférico que es utilizado por la planta en intercambio por protección y compuestos derivados de la fotosíntesis.

La genética y biología molecular de esta simbiosis ha sido estudiada en los últimos 15 años, pero generalmente los trabajos fueron dedicados a comprender los procesos de nodulación y fijación de nitrógeno. Existen otros procesos involucrados en el establecimiento de la simbiosis de los cuales se posee poca información. Es probable que, al igual que la nodulación, estos procesos sean desencadenados por compuestos liberados por la raíz. La identificación de estos genes es esencial para la comprensión de la simbiosis como un proceso complejo que incluye diferentes etapas por medio de las cuales un rizobio de vida libre es transformado en un bacteroide fijador de nitrógeno en el nódulo.

INDUCCION DE GENES *nod* POR EXUDADO

Se han identificado compuestos fenólicos simples, flavonoides y betaínas que actúan como señales entre las plantas y las bacterias. Se ha demostrado que flavonoides y betaínas inducen la expresión de los genes de nodulación (*nod*) en rizobios (Redmond *et al.*, 1986; Phillips *et al.*, 1992). La inducción se produce mediante la interacción del flavonoide y NodD, un regulador transcripcional positivo, el cual se une a la caja *nod* de la región promotora de los genes de nodulación. Cuando un flavonoide se une a NodD, esta proteína sufre un cambio de conformación permitiendo que la ARN polimerasa inicie la transcripción de los genes *nod*. La mayoría de estos genes *nod* están involucrados en la síntesis de un lipo-oligosacárido (Lerouge *et al.*, 1990), denominado factor de nodulación que controla el crecimiento y diferenciación en la planta huésped y produce la formación de nódulos radiculares.

En el caso particular de frijol, se ha determinado que entre los compuestos exudados por raíces de frijol negro, los flavonoides eriodictiol, naringenina y genisteína poseen la capacidad de inducir a los genes *nod* en *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Hungria *et al.*, 1991b, Vázquez *et al.*, 1991). También se ha observado que el exudado de semilla de frijol negro libera diferentes compuestos con actividad inductora sobre genes *nod* como antocianidinas y flavonoles (Hungria *et al.*, 1991a). Se propone que ante la diversidad de flavonoides inductores encontrados en el exudado existiría cierta especificidad entre dichos compuestos y los tres productos de los genes *nodD* en *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Hungria *et al.*, 1992).

EFECTO DE EXUDADOS RADICULARES EN LAS DIFERENTES RIZOBIOS

En la rizósfera, los compuestos exudados tienen diferentes efectos sobre las bacterias. Pueden ser catabolizados como fuente de C y N (Murphy *et al.*, 1987; Johnston *et al.*, 1988; Tepfer *et al.*, 1988; Peters and Verma, 1990; Goldmann *et al.*, 1991) o degradados (Rao *et al.*, 1991), actuar como quimioattractantes (Currier *et al.*, 1977; Aguilar *et al.*, 1988; Caetano-Anollés *et al.*, 1988; Kape *et al.*, 1991; Dharmatilake *et al.*, 1992), afectar el crecimiento (Hartwig *et al.*, 1991), la porción antigénica de lipopolisacáridos (Noel *et al.*, 1992), la transferencia de plásmidos (Martínez, E., Comunicación personal), el desarrollo de apéndices fibrilares (que podrían anclar la bacteria a la superficie de la raíz), estimular la producción de ácido indolacético (Prinsen *et al.*, 1991), la aparición de receptores específicos (como en el caso de receptores bacterianos para las lectinas de soya) (Bhuvaneswari and Bauer, 1978), la competencia (Sadowsky *et al.*, 1988), la resistencia a gliceolina (Kape *et al.*, 1992) y la expresión génica de las bacterias en la rizósfera (Redmond *et al.*, 1986).

OTROS GENES INDUCIDOS POR EXUDADO EN RIZOBIOS

Existen casos de genes inducidos por compuestos exudados por raíz que no presentan homología con genes *nod* conocidos ni están involucrados en la síntesis de lipo-oligosacárido. Uno de los primeros en ser reportados fueron dos genes de *R. fredii* organizados en tandem y localizados en el *psim* (Sadowsky *et al.*, 1988). No presentan homología con la región estructural de genes *nod* conocidos ni con la región promotora de los genes *nod* o *nif*. Se identificó como uno de los compuestos inductores a la daidzeína (isoflavonoide). Este par de genes presenta arriba de la región 5' una secuencia común de 17 pares de bases que muestra un consenso de 82%. Las mutaciones en estos genes no causan pérdida de la capacidad de nodulación por lo que se deduce que estos genes no tienen un papel esencial en el proceso de nodulación aunque permanecen transcripcionalmente activos durante todo el proceso simbiótico. En cambio, mutaciones en estos genes provocan una reducción significativa en la ocupación de nódulos (alrededor de 1%) cuando se realizan experimentos de competencia entre la cepa mutada y la silvestre. Las proteínas codificadas por éstos genes no presentan homología con proteínas conocidas, por lo que se desconoce su su función biológica.

En el intento de identificar genes activados por exudado de raíz (ER) y por extracto de suelo (ES) que estuviesen involucrados en competitividad, Bhagwat and Keister (1992) utilizaron hibridación sustractiva con ARN de dos cepas de *B. japonicum* con claras diferencias en competitividad. El ADN de las cepas, previamente bloqueado con ARN de bacterias crecidas en medio sin ER o ES, fue hibridado con ARN de bacterias crecidas en presencia de ER o ES. De ésta forma detectaron seis cósmidos en una biblioteca genómica de 2000 clonas que se expresan selectivamente en las condiciones antes mencionadas. Tres de ellos mejoran la competitividad por la formación de nódulos de la cepa receptora con deficiencias en competencia. Ninguno de estos 6 genes presentan secuencias regulatorias del tipo caja *nod*. Por otro lado, una de las secuencias estudiadas está presente tanto en la cepa mejor competidora como en la

que presenta deficiencias en competición. En esta última cepa, dichas secuencias serían activadas por compuestos presentes en el extracto de otro tipo de suelo o extracto de suelo de otra planta o por algún otro tipo de estímulo.

En *R. leguminosarum* bv. *viciae* se han caracterizado cuatro genes *rhi*ABC, localizados en el psim entre los genes *nif* y *nod* (Cubo *et al.*, 1992). Estos genes se expresan en rizósfera y los flavonoides inductores de los genes *nod* reprimen esa expresión. Dicho efecto depende de NodD. Estos genes están involucrados en la interacción entre *R. leguminosarum* bv. *viciae* y veza aunque se desconoce la función que desempeñan las proteínas que codifican, éstas contribuyen de alguna forma a la eficiencia en nodulación quizá interviniendo en la utilización de algún sustrato específico secretado por veza.

En *Rhizobium fredii* NGR234 (Carlson, R.W. Comunicación personal) fueron identificados varios genes inducidos por daidzeína (isoflavonoide) tanto en el plásmido simbiótico como en el cromosoma (Perret *et al.*, 1994). Siete secuencias presentaron homologías con genes conocidos. Entre ellas, secuencias del psim y cromosomales son similares a genes que codifican a una proteína de membrana externa (OmpIII) de *R. leguminosarum* (cromosomal). Otra secuencia presenta similitud con las proteínas CadA de *Staphylococcus aureus* que otorgan resistencia a cadmio y FixI de *R. meliloti*. Estas proteínas poseen un dominio transportador de cationes altamente conservado con actividad ATPasa. En otro caso, encontraron una región en la que se transcriben dos genes en direcciones opuestas. Uno de ellos resultó homólogo al dominio carboxi-terminal aceptor de metilos en proteínas quimiotáticas de *E. coli* y *Caulobacter crescentus*. En la cadena complementaria, el marco de lectura abierto es altamente homólogo al dominio C-terminal de varias deshidrogenasas de semialdehído. También identificaron secuencias fuertemente homólogas a UgpC (una proteína con unión a ATP que forma parte de un sistema transportador de glicerol-3-fosfato) de *E. coli* y a proteínas con unión a ATP involucradas en el transporte activo de pequeñas moléculas hidrofílicas a través de la membrana citoplásmica. Finalmente, secuencias homólogas a una proteína reguladora Lrp (proteína reguladora de la respuesta a leucina) de *E. coli* y BkdR (una deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada) de *Pseudomonas putida* fueron encontradas. Una mutante conteniendo un transposón en esta región mostró retraso en la nodulación de *Vigna unguiculata* (4.5 días), y en *Leucaena leucocephala* y *Pachyrhizus tuberosus* el número de nódulos aumenta 65% en comparación con la cepa silvestre mientras que el mismo número descendió en un 25% en *Calopogonium caeruleum*. Estas modificaciones en la eficiencia en la nodulación junto con la inducción por flavonoides observada, así como su ubicación en un plásmido simbiótico (no esencial) sugiere que este gene probablemente no está involucrado en la regulación de operones similares a aquellos controlados por Lrp de *E. coli* y BkdR de *P. putida*. Mas aún la ausencia de genes homólogos en otros rizobios y en su pariente más cercano *R. fredii* USDA257 sugiere que *R. fredii* NGR234 ha desarrollado un sistema adicional para regular la nodulación. Otro sistema regulatorio de la simbiosis como *nodVW* ha sido descrito en *B. japonicum* debido a su similitud con proteínas de sistemas regulatorios de dos componentes (Göttfert *et al.*, 1990). NodV respondería al estímulo ambiental y NodW podría ser requerido para regular positivamente la transcripción de uno o varios genes aún desconocidos involucrados en el proceso de nodulación especialmente en los que intervienen en la interacción con leguminosas diferentes a soya. (*Vigna* sp,

Macropitium sp, etc).

Los transcritos inducibles con flavonoides del plásmido simbiótico de *R. fredii* NGR234 fueron objeto de especial atención (Fellay *et al.*, 1995). Este plásmido contiene 500 kb de las cuales, alrededor de 100 kb están constituidos por genes inducibles. En general, se encontró que el patrón de inducción fue independiente del inductor cuando usaron las flavonas crisina y apigenina, la flavonona naringenina o la isoflavona daidzeína. El período de inducción de los transcritos fue variable y sincronizado. Observaron además, que cuando *nodD1* está mutado genes como *nodABC* no se indujeron pero otros transcritos fueron aún activables mediante *nodD2* o *symM* o algún otro regulador desconocido. Los autores proponen que aunque un sistema como *nodVW*, determinante de la especificidad de huésped en *B. japonicum* (Göttfert *et al.*, 1990) no ha sido encontrado en *R. fredii* NGR234, es posible que miembros de esta familia de reguladores puedan tener un papel en la respuesta a flavonoides. Además de los genes cuya inducción por compuestos exudados por la planta huésped era conocida como *nodABC*, *nodSU* y varios relacionados con el rango de planta huésped, se detectaron nuevos genes. Entre ellos, genes cuya secuencia deducida de aminoácidos presenta homología a guanililtransferasa, manosa-6-fosfatisomerasa y fosfomanomutasas de diversas bacterias. Otros involucrados en el metabolismo de L-fucosa y su unión al factor de nodulación. También encontraron un marco de lectura abierto cuyo producto es homólogo a *rfb* (codifica una proteína que intervine en la biosíntesis del antígeno O de lipopolisacáridos) de *Vibrio cholerae*, así como a YefA y YefB (factores de elongación) de *E. coli*. Por su ubicación, este marco de lectura corresponde a *nod81*, un gen involucrado con el rango de planta hospedante.

Los casos descritos muestran la información de los genes inducidos por exudado en *Rhizobium* hasta el momento. El interés por este tipo de genes ha aumentado en los últimos tiempos debido a que su estudio aporta valiosa información sobre procesos desencadenados en la rizósfera.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

-Obtención y caracterización de secuencias genómicas de *Rhizobium* que se regulen positivamente por exudado de plantas leguminosas con el fin de contribuir al conocimiento de procesos que participan en etapas tempranas de la interacción planta-bacteria. Se eligió como modelo de estudio la relación simbiótica entre *Rhizobium etli* (Segovia *et al.*, 1993) y *Phaseolus vulgaris*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Identificación de genes de *R. etli* CFN42 inducidos por exudado radicular de frijol.
- Caracterización de las cepas mutantes obtenidas.
- Clonación y secuenciación de las secuencias inducibles por exudado.
- Análisis de la secuencia obtenida.

MATERIALES Y METODOS

A) CEPAS Y PLASMIDOS

Las cepas bacterianas y plásmidos utilizados se encuentran en la Tabla I.

B) MEDIOS DE CRECIMIENTO Y CONDICIONES DE CULTIVO

Las cepas de *Rhizobium* y sus derivadas se crecieron en medio PY (0.5% de peptona de caseína, 0.3% de extracto de levadura y 7mM CaCl₂) a 30°C. Las cepas de *Escherichia coli* se crecieron en medio Luria (Miller, 1972) a 37°C.

En los experimentos donde fue analizada la expresión de neomicina fosfotransferasa en presencia del exudado de frijol, la composición final del medio PY fue reducida a la mitad en 2 de sus componentes (0.25% de peptona de caseína y 0.15% de extracto de levadura) pues se añadió un volumen igual de exudado de raíz, poco antes que el medio llegara a la temperatura de gelificación. El exudado de raíz fue obtenido como se describe en el punto (N).

La composición del medio mínimo utilizado fue la siguiente: K₂HPO₄ 2%; MgSO₄ 2%; KNO₃ 5.5%; KH₂PO₄ 10%; NaCl 2%; CaCl₂ 1%; citrato de Fe 1.2%; y por cada 100 ml, trazas 100 µl (Fahraeus, 1957), biotina (10 mg/ml) 100 µl y sacarosa 20% 1 ml. En el caso de medio sólido se utilizó agarosa tipo I (Sigma) como gelificante. Este tipo de agarosa, altamente purificada, evita la aparición de contaminantes que enriquecerían el medio.

Los antibióticos se utilizaron en las siguientes concentraciones (µg/ml): ácido nalidíxico (Nal), 20; tetraciclina (Tc), 2 con *Rhizobium* sp; ampicilina (Ap), 80 y Tc, 10 con *E. coli*. Los ensayos de detección de la expresión de β-galactosidasa se realizaron en cajas con LB en presencia de Xgal (20 mg/ml) e IPTG (20 mg/ml).

C) MUTAGENESIS DE *R. etli* CFN42

Se realizó la mutagénesis (Simon, 1984) al azar de *R. etli* CFN42 utilizando el transposón *Tn5B30* (Simon *et al.*, 1989)(Fig. 1). Este transposón posee el gene *npt* (neomicina fosfotransferasa) como gen reportero y, luego de su inserción en el genoma se obtiene una fusión transcripcional. Como resultado, la expresión del gene *npt* queda controlada por las secuencias que regulan al gen mutado.

D) CONJUGACION

Se realizó una cruce triparental para complementar la mutante CFNA31. Se mezclaron 0.2 ml de la cepa donadora, *E. coli* HB101 (pCos126 que contiene 27.0 kb del pb de *R. etli* CFN42 clonado en pLAFR1, Cava *et al.*, 1989), 0.2 ml de la cepa *E. coli* HB101 (pRK2013, plásmido suicida que contiene las secuencias necesarias para la

movilización del pCos126) y 0.5 ml de la cepa receptora A31. La mezcla se extendió en cajas con PY y se incubaron a 30°C durante 48 hs. Luego, la cruce se suspendió en $MgSO_4$ 0.1M y una serie de diluciones fueron plateadas en cajas con PY y ácido nalidíxico para seleccionar a la cepa receptora y tetraciclina para seleccionar el pCos126. Se utilizó la misma metodología para obtener CFNA31 con el vector pLAFRI, CFN42 con pCos126 y CFN42 con pLAFRI. En la búsqueda de CFNA31 con el pLAFRI, apareció espontáneamente una cepa derivada de CFNA31 con el pLAFRI curada de los pa y pd. Esta cepa fue utilizada en experimentos de inducción para estudiar el efecto de la ausencia de estos plásmidos sobre la expresión del gen mutado en CFNA31.

E) PURIFICACION DE ADN

El ADN genómico de las bacterias fue preparado siguiendo el protocolo descrito por Ausubel *et al.*, 1995. En síntesis, las bacterias provenientes de un cultivo líquido saturado son lisadas y las proteínas removidas por digestión con proteinasa K. La pared celular, polisacáridos y las proteínas remanentes son removidas por precipitación selectiva con CTAB y el ADN de alto peso molecular es recuperado del sobrenadante resultante por precipitación con isopropanol.

El ADN plasmídico fue preparado como se describe en Maniatis *et al.*, 1982. En los casos en que el ADN fuese utilizado en clonación o secuenciación, se utilizó el sistema de purificación de ADN Wizard (Promega) o Qiagen (Qiagen Inc) siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

F) ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Las electroforesis se llevaron a cabo en geles de agarosa al 1% en TA 1X (Tris Acetatos 0.4M, 1.142 ml/l y EDTA 0.5M pH:8) a 80 V. Los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio (0.4 µg/ml), se observaron con luz ultravioleta (Fotodyne) y se fotografiaron con película Polaroid 55.

G) DETECCION DE PLASMIDOS

Se utilizó la técnica de Eckhardt (Eckhardt, 1978). Las células crecieron hasta fase exponencial, se tomó una alícuota de 1 ml, se centrifugó y se decantó el medio. La pastilla celular se resuspendió en 1 ml de 0.1% Sarcosyl (lauril-sarcosinato) en TE 50/20. Se centrifugó nuevamente y se lavó con 0.5 ml de TE 50/20. Se centrifugó una vez más y la pastilla se resuspendió en 40 µl de la solución A (lisozima 7500 u/ml, RNasa 0.3 u/ml, azul de bromofenol 0.05 %, xilenocianol 0.05% y ficoll PM 400.000 20% disueltos en una solución de TB 1X (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2.0 mM a pH 8.0). Se incubó 10 min. a temperatura ambiente. La suspensión generada se aplicó en los pozos de un gel de 0.7% agarosa en TB 1X. Luego se añadieron 40 µl de la solución B (dodecilsulfato de Na -SDS- 0.2% y Ficoll PM 400.000 10% en TB 1X) y se mezcló cuidadosamente. Finalmente, se añadieron 100 µl de la solución C (SDS 0.2% y

ficoll PM 400.000 al 5% en TB 1X) sin mezclar y se sellaron los pozos con la misma solución de agarosa con la que se hizo el gel.

La electroforesis se inició con una corrida de 1 hora a 8 mA (corriente constante) y luego 4 horas a 170 V (voltaje constante). Los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio (0.4 ug/ml), se observaron con luz ultravioleta (Fotodyne).

H) DIGESTION CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

La cantidad de ADN contenida en las purificaciones se estimó corriendo una alícuota en minigeles de agarosa al 1% en TA 1X a 80 V. Se tomó la cantidad necesaria según el caso y se digirió con la enzima de restricción pertinente en los amortiguadores que sugieren los proveedores.

I) TRANSFERENCIA DEL ADN A MEMBRANAS DE NYLON

Se utilizó membranas de nylon Hybond-N⁺, version 2.0 (Amersham) y la transferencia se realizó siguiendo las instrucciones de los fabricantes, basada en la técnica de Southern, (Southern, 1975), utilizando 6X SSPE como solución amortiguadora de transferencia. Se realizó una transferencia bidireccional para lo cual, sobre el gel se colocó la membrana de nylon, luego 3 hojas de papel Whattman 3MM y toallas de papel absorbente. Se invierte el conjunto antes descrito y se colocaron nuevamente, otra membrana de nylon, el papel Whattman 3MM y toallas de papel absorbente. Se dejó que el ADN se transfiriera por capilaridad a las membranas durante 12-16 hs. Luego, las membranas son lavadas con 6X SSPE y secadas a 80°C durante 2 hs.

J) HIBRIDACION

Marcaje radiactivo

Los detectores se marcaron radioactivamente utilizando el equipo de Nick Translation de Amersham N5000 siguiendo el protocolo de los fabricantes. Se marcaron 200 ng de ADN durante 2 hs. a 14°C. Los nucleótidos no incorporados fueron separados de la siguiente forma. Luego de realizada la reacción de Nick Translation, se agregaron 300 µl de una solución que contiene 2.5 M acetato de NH₄, 0.6 mg/ml de ADN de salmón y 20 mM EDTA. Luego, se agregaron 200 µl de isopropanol y se centrifugó 10 min. a 14000 rpm. Se desechó el sobrenadante y la pastilla formada se resuspendió en 150 µl de 0.1 M NaOH. Finalmente, se agregaron 850 µl de agua y se adicionó a la solución de prehibridación.

Hibridación

Las hibridaciones fueron realizadas en un horno Hybaid usando la solución de prehibridación sugerida por los fabricantes de las membranas Hybond-N⁺, version 2.0 (Amersham). La composición es la siguiente 5X SSPE, 5X solución Denhardt y 0.5% (p/v) SDS. Se agregó ADN de salmón (previamente desnaturalizado por calor -100°C-

durante 5 min). Se incubó al menos 12 hs. a 65°C. El lavado de los filtros incubados se realizó con 2X SSPE, 0.1% (p/v) SDS a temperatura ambiente durante 10 min. Luego se utilizó 0.1X SSPE, 0.1% (p/v) SDS a 65°C durante 15 min. Finalmente, se hicieron varios lavados con 0.1X SSPE. De esta forma se realizaron las hibridaciones entre secuencias homólogas. Cuando se utilizaron secuencias no homólogas, no se realizó el segundo lavado en el tratamiento antes descrito (65°C) y en el último lavado se utilizó 2X SSPE.

Autorradiografía

Se utilizaron placas de radiografía Kodak (X-Omat K) que se colocaron sobre las membranas hibridadas. Ambas se colocaron en cassettes para autorradiografía con pantallas intensificadoras. Se dejó en exposición durante 12 hs. o más, dependiendo del nivel del marcado radioactivo.

K) PRODUCCION DE LIPOPOLISACARIDOS (LPS)

Las cepas de *R. etli* se incubaron durante una noche en medio mínimo (punto B) en presencia de genisteína 1.2µM como inductor y ¹⁴C-glucosamina para marcar radioactivamente los azúcares que sintetizan las bacterias. Luego, las células se lavaron con H₂O, se lisaron y se analizaron por electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida (tipo Laemmli). Luego de la exposición del gel con una placa radiográfica, se obtuvo una autorradiografía de los compuestos que contienen azúcares marcados.

L) ENSAYO DE NODULACION DE *R. etli* en *P. vulgaris*

Las semillas de *Phaseolus vulgaris* cv Negro Jamaica y N-8-116 se esterilizaron por lavados con etanol 70% durante 2 min. y luego con 50% hipoclorito de Na durante 15 min. Finalmente, se realizaron 6 lavados con H₂O estéril. Las semillas se germinaron en cajas con agar/H₂O 0.78% p/v durante 2 días a 30°C. Las plántulas fueron colocadas en matraces con agar/solución nutritiva Fahraeus (0.78 % p/v) (Fahraeus, 1957) o con vermiculita con solución Fahraeus. Las plántulas se inocularon con 100 µl de un cultivo de 0.6 DO₆₀₀ y se colocan en oscuridad hasta que la parte aérea pueda salir por la boca del matraz. Luego, los matraces se incuban a 26°C con períodos de oscuridad de 12 hs. En todos los experimentos se incluyeron plantas sin inocular como control de contaminación. Se realizó el aislamiento de las bacterias en una muestra de los nódulos obtenidos tomados al azar y se identificó la cepa por su resistencia a antibióticos. Los nódulos fueron esterilizados con 20% de hipoclorito de Na durante 2 min. seguido de 6 lavados con agua estéril.

M) ANALISIS DEL FACTOR DE NODULACION

Las bacterias fueron incubadas durante una noche en medio mínimo (punto B) en presencia de genisteína como inductor y ¹⁴C-glucosamina. Posteriormente, los

cultivos fueron centrifugados y el sobrenadante fue fraccionado por columnas de SepPack C-18. La fracción no polar fue eluida con metanol y analizada mediante cromatografía de capa fina en fase directa (Spaink *et al.*, 1992).

N) OBTENCION DEL EXUDADO DE FRIJOL

Las semillas de frijol se esterilizaron y germinaron de la forma descrita en el punto J. Entre 30-35 plántulas fueron colocadas dentro de un vaso de precipitado estéril de un litro sobre una malla que sostiene a las plántulas. Las raíces fueron cubiertas por solución Fahraeus (aproximadamente 200 ml) (Fahraeus, 1957). La parte superior del vaso fue tapada con algodón y gasa, y la región del vaso que contiene las raíces fue cubierta para evitar la exposición a la luz. Las plántulas fueron incubadas durante 5 días a 28°C. El cuarto día se inoculó con *R. etli* CFN42 con el fin de obtener 100 bacterias por planta. De ésta forma, se obtuvieron los compuestos exudados por las raíces de frijol que fueron centrifugados 10 min. a 6000 rpm con el objeto de separar los fragmentos desprendidos de la raíz y luego después de probada su esterilidad fueron utilizados inmediatamente en la preparación de cajas.

Ñ) ANALISIS DEL BANCO DE MUTANTES CON INSERCIÓN DEL *Tn5B30*

Las mutantes derivadas de *R. etli* CFN42 con la inserción del *Tn5B30* en el genoma ($\text{NaI}^{10} \text{Tc}^2$) fueron analizadas en su capacidad de expresar la resistencia del gene reportero (*npf*) en presencia y ausencia del exudado de raíz. Se utilizaron cajas de PY con la mitad de peptona y extracto de levadura respecto a la concentración normal como se describe en el punto B adicionado con NaI^{10} y Km a diferentes concentraciones (30, 60, 80, 100, 120 y 150 $\mu\text{g/ml}$).

O) ENSAYO DE MOVILIDAD *R. etli*

Las cepas de rizobio provenientes de un cultivo de caja fueron resuspendidas en agua y una alícuota fue colocada en cajas con PY con 0.3 % de agar e incubadas a 30°C durante 48 hs. Luego, se observa la formación de un halo de difusión cuando la cepa es móvil. Si no se observa dicho halo de difusión, la cepa presenta alguna alteración en su movilidad.

P) CLONADO Y SECUENCIACION

Se digirió el ADN genómico de las mutantes con la enzima HindIII y luego se llevó a cabo la clonación de los fragmentos obtenidos que contienen la inserción del *Tn5B30* en el vector pUC18 (Messing, 1983). Estos plásmidos con los fragmentos clonados fueron utilizados para transformar a la cepa *E. coli* DH5 α . El *Tn5B30* (Simon *et al.*, 1989) tiene un sitio HindIII próximo al extremo 3' por lo que dicho fragmento HindIII queda contenido en otro fragmento HindIII diferente al que contiene la secuencia

inducible (Fig. 1).

La secuencia de ADN fue obtenida en el secuenciador automático del Laboratorio I del CIFN. Se utilizó el método de Sanger *et al.* (1977) con el sistema de secuenciación de ADN Applied Biosystems Modelo 373A y el equipo Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing que utiliza dideoxinucleótidos fluoreceinados. El ciclo de reacciones fue el siguiente: 96°C 30 seg, 50°C 15 seg, 60°C 4 min. Se realizaron 25 ciclos en total. Los productos de reacción fueron purificados por columnas (Spin Column Purification of Extension Products) y separados en un gel de 6% de acrilamida.

En el análisis de la secuencia se utilizaron los programas de computación contenidos en el paquete GCG (FASTA, BLAST, MAP, GAP, etc.).

Q) EFECTO DEL EXUDADO SOBRE EL CRECIMIENTO DE *R. etli* EN MEDIO LIQUIDO

Se hicieron cultivos en medio mínimo en presencia de exudado radicular, para lo cual las semillas de frijol se esterilizaron y germinaron como se describe en el punto (K). Las cepas a estudiar fueron crecidas en PY durante 16 hs y utilizadas para inocular solución Fahraeus (Fahraeus, 1957) adicionado con K₂HPO₄ 2%; MgSO₄ 2%; KNO₃ 5.5%; KH₂PO₄ 10%; NaCl 2%; y por cada 100 ml, trazas 100 µl, biotina (10 mg/ml) 100 µl y sacarosa 20% 1 ml, hasta obtener una DO₆₀₀ entre 0.05 y 0.1. Con el fin de facilitar la comparación de las mediciones realizadas todas las cepas fueron diluídas hasta obtener la misma DO₆₀₀. Luego, el medio inoculado fue distribuído en tubos de ensayo estériles (15 ml). Se colocaron 6 ml en cada tubo. Un frijol germinado se colocó en cada tubo sobre una punta de micropipeta (200 µl) para impedir su hundimiento. Se cubrió la parte inferior de los tubos para proteger de la luz a los compuestos exudados. Finalmente, los tubos fueron colocados a 26°C con períodos de oscuridad de 12 hs. Las mediciones de DO del medio en que están colocadas las plantas fueron realizadas a intervalos de 8 hs en un espectrofotómetro. Se tomaron tres mediciones en cada tiempo, cada una de tubos diferentes. Después de la medición los tubos fueron descartados.

R) EFECTO DEL EXUDADO SOBRE EL CRECIMIENTO DE *R. etli* EN MEDIO SOLIDO

Se preparó medio mínimo sólido con 1.5% agarosa y se colocaron 25 ml del medio en cada caja. En forma separada, se mezcló 5 ml de medio mínimo sólido con 0.7% de agar y 1 ml de medio mínimo con una determinada dilución de bacterias. Esta mezcla se agregó sobre el medio mínimo sólido con 1.5% agar. Inmediatamente después que gelificara el medio, se colocó una gota de exudado (obtenido como se describió en el punto N, sin inocular) sobre el agar con las bacterias. Las cajas fueron incubadas durante 48 hs. a 30°C. Se observó la diferencia de turbidez en las zonas con o sin exudado en las cajas con las cepas bajo estudio. La turbidez es ocasionada por el crecimiento de las bacterias y su ausencia por un efecto inhibitorio del exudado sobre el crecimiento de las mismas.

RESULTADOS

1) AISLAMIENTO DE MUTACIONES EN GENES INDUCIDOS POR EXUDADOS

Con el fin de identificar genes inducidos por compuestos exudados de frijol, se realizó la mutagénesis al azar de la cepa de *R. etli* CFN42 (Sm^r) utilizando el transposón *Tn5B30* (Simon *et al.* 1989). Este transposón posee el gene *npt* (neomicina fosfotransferasa) como gene reportero y luego de su inserción en el genoma se obtiene una fusión transcripcional. Debido a esto, la expresión del gene *npt* queda controlada por las secuencias que regulan al gene mutado. Utilizando exudado de raíces de frijol como inductor en el análisis del banco de 3000 mutantes, se identificaron 4 cepas (CFNA3, CFNA31, CFNB3 y CFNB18) que son capaces de crecer en PY con Km sólo en presencia del exudado (Mat. y Mét., punto B). Diversos flavonoides fueron utilizados en el mismo tipo de experimento con el fin de evaluar su posible capacidad inductora. Todos los compuestos ensayados mostraron ser buenos inductores de las secuencias mutadas en las concentraciones utilizadas (Tabla II y Fig. 2).

El análisis descrito con exudado fue realizado también con la cepa CFNA31 curada de plásmido a (pa) y plásmido simbiótico (pd) (Mat. y Mét., punto D). Esta cepa expresa resistencia a Km sólo en las cajas conteniendo exudado, lo cual sugiere que el gene que tiene la inserción del *Tn5B30* con el gen reportero sigue siendo inducible a pesar de la ausencia de los genes *nodD* del plásmido simbiótico.

2) LOCALIZACION DEL *Tn5B30* EN EL GENOMA DE *R. etli* CFN42

Para localizar el *Tn5B30* en las distintas cepas mutantes, se realizó mediante un ensayo de hibridación entre ADN de los mutantes proveniente de geles de agarosa del tipo Eckhardt (Eckhardt, 1978) y usando el *Tn5* como sonda. Se determinó que 3 de las cepas CFNA3, CFNB3 y CFNB18 poseen una inserción cromosomal (Fig. 3). En el caso de la cepa CFNA31, en principio se observó una inserción plasmídica pero no fue posible discriminar con claridad mediante la hibridación antes citada si la inserción estaba localizada en el pa ó pb.

Por esta razón, se realizó otro experimento utilizando ADN genómico de la cepa CFN42 curada del pa (CFNX182) y otra curada del pb (CFNX183) (Brom *et al.*, 1992) digeridas con HindIII y utilizando como sonda un fragmento HindIII que contiene la secuencia bajo estudio. De ésta forma sólo se observó señal positiva en el caso de la cepa curada del pa por lo que se deduce que la inserción está ubicada en el pb (Fig. 4).

Posteriormente, la detección de los fragmentos contenidos en la secuencia silvestre del gene inducido en la mutante CFNA31 confirmó esta ubicación ya que estas secuencias provienen de fragmentos clonados del pb como se describe en Cava *et al.*, 1989 (ver adelante).

De esta forma se identificaron tres inserciones cromosomales, de las cuales no se tiene antecedentes en *R. etli*, y una inserción plasmídica, en el pb.

3) ANALISIS DEL PERFIL DE LIPOPOLISACARIDOS

Se han reportado mutantes en *R. etli* CFN42 con alteraciones en la producción de lipopolisacáridos que presentan deficiencias en el proceso de infección (Cava *et al.*, 1989). También se ha reportado que los flavonoides afectan la porción antigénica de los lipopolisacáridos (Noel *et al.*, 1992). Con estos antecedentes, se decidió investigar una posible diferencia en la producción de lipopolisacáridos entre la cepa silvestre y las mutantes.

Las cepas mutantes fueron crecidas en presencia de genisteína (Mat. y Mét., punto K) como inductor. Los perfiles de los lipopolisacáridos observados en gel de acrilamida no difieren respecto a los de la cepa silvestre (Fig. 5), por lo cual, según la técnica utilizada, los lipopolisacáridos no están afectados por ninguna de las mutaciones.

4) CAPACIDAD DE CRECIMIENTO EN MEDIO MINIMO

Con la idea de detectar la presencia de alguna auxotrofia que interfiriera en el crecimiento de las cepas mutantes, se analizó el crecimiento de las mismas en medio mínimo (Mat. y Mét., punto B). Auxotrofías ocasionadas por la inserción del *Tn5* con efecto sobre la simbiosis de *R. etli* y frijol ya han sido reportadas (Noel *et al.*, 1988).

Las cepas mutantes no presentan diferencia en su crecimiento en medio mínimo ni en PY, ya sea líquido o sólido cuando son comparadas con la cepa silvestre (Fig. 6). Este resultado indica que ninguna de las inserciones del *Tn5B30* ocasiona mutaciones que estén involucradas en la síntesis de metabolitos esenciales para el crecimiento en medio mínimo.

5) MOVILIDAD

Esta característica fue analizada debido que se ha reportado que una cepa mutante de *R. etli* TAL182 obtenida por inserción de *Tn5* en el cromosoma (George *et al.*, 1992) mostró formación de pequeños nódulos no fijadores en frijol y reducción de la movilidad comparada con la cepa silvestre (Pooyan *et al.*, 1994). Entre las mutantes de *R. etli* CFN42 obtenidas se encuentran 3 con inserciones cromosomales por lo cual se decidió investigar esta posibilidad. Se realizaron experimentos en medio PY sólido con 0.3 % de agar. Como resultado del movimiento de las bacterias sobre el agar, se forma un halo de difusión. Las cepas que perdieron la capacidad de moverse no producen dicho halo. Tanto en la cepa silvestre como las mutantes pueden observarse la formación del halo (Tabla III) lo cual implica que no existe ninguna alteración en la movilidad de las cepas con inserción del transposón.

6) ANALISIS DEL FACTOR DE NODULACION

La mayoría de los genes *nod* se expresan en presencia de compuestos originados por la planta. Dichos genes intervienen en la biosíntesis del factor de nodulación

(Lerouge et al., 1990). Es posible entonces, que alguno de los genes mutados con el *Tn5B30* afectara de alguna forma al factor de nodulación. Se realizó una cromatografía en capa fina del sobrenadante de cultivos de las diferentes cepas inducidas con genistina. No se observaron diferencias en la producción del factor de nodulación (Fig. 7) respecto a la cepa silvestre.

7) CLONACION DE LOS FRAGMENTOS MUTADOS E IDENTIFICACION DEL GEN SILVESTRE EN LA CEPA CFNA31

Con el objeto de analizar con más detalle las secuencias inducibles en las cepas se decidió clonar el fragmento HindIII de cada una de las cepas mutantes en pUC18. Se estimó que el tamaño de cada uno de dichos fragmentos es de 4.2 en CFNA3, 1.7 en CFNA31, 5.7 en CFNB3 y 3.1 kb en CFNB18 (Tabla III).

En la búsqueda de las secuencias silvestres del gen mutado en A31, se utilizaron fragmentos clonados del pb de *R. etli* CFN42 por otros laboratorios en experimentos de hibridación con el fragmento HindIII que contiene el gen inducible por exudado como sonda. Se encontró que el pCos126 (Cava et al., 1989) contiene dos fragmentos, uno de 1.3 kb y otro de 5.6 kb que mostraron señal positiva (fig. 8 y 13). Cada uno de estos fragmentos fueron clonados en el vector pUC18 y utilizados en la obtención de la secuencia completa del gen.

8) FENOTIPO SIMBIOTICO

Los genes *nod* son inducidos por flavonoides (Redmond et al., 1966). Debido a esta razón, existe la posibilidad que la disrupción de las secuencias identificadas altere alguna etapa del proceso de nodulación, por lo cual se decidió analizar la capacidad de nodulación de las cepas mutantes.

En los ensayos de nodulación realizados (Mat. y Mét., punto L) con las cepas mutadas se obtuvieron nódulos fijadores en todos los casos. En tres experimentos en los que se analizó el número de nódulos formados por las mutantes respecto a la cepa silvestre a los 15 días de inoculación se observó que la mutante CFNB3 no presenta diferencias. Estos experimentos fueron realizados con la variedad de frijol Negro Jamapa. Las tres mutantes restantes fueron analizadas en experimentos de cinética de nodulación en los que se utilizó la variedad N-8-116 (se decidió utilizar dicha variedad porque mostró menor variación en el número de nódulos obtenidos en ensayos previos realizados en nuestro laboratorio). En este tipo de experimento, se determinó el número de nódulos a los 10, 15 y 20 días posteriores a la inoculación. La mutante B18 no mostró diferencias significativas (Fig. 9). En cambio, en las mutantes CFNA3 y CFNA31 se observaron diferencias significativas respecto a la cepa silvestre (la desviación estándar de CFN42 y de las cepas mutantes -CFNA3 y CFNA31- representadas por barras en la gráfica, no se superponen, por lo que los valores pertenecen a diferentes poblaciones) como puede verse en la Fig 10.

Se realizó otro experimento de cinética de nodulación para comparar el número de nódulos formados por la mutante CFNA31, una derivada de CFNA31 conteniendo el

pCos126, denominada CFNA31a (pCos126 contiene los genes silvestres que están mutados en CFNA31) y otra derivada de CFNA31 con el pLAFR1, denominada CFNA31b (pLAFR1 es el vector del que deriva pCos126) entre sí y con la cepa silvestre. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 11. La reducción en el número de nódulos en la cepa CFNA31 estaría ocasionado por la interrupción de la secuencia del gene inducible que de alguna forma afectaría, directa o indirectamente el proceso de nodulación. Por el contrario, la mutante complementada con el pCos126 (CFNA31a) estaría beneficiada en su interacción con frijol por copias extra del gene mutado y/o secuencias adicionales con efecto positivo sobre la simbiosis presentes en el fragmento de 27 kb contenido en el pCos126.

9) SECUENCIACION DEL GEN INDUCIDO POR EXUDADO EN LA MUTANTE A31

Se obtuvo la secuencia de las dos hebras del fragmento 1.3 kb completo y 1.4 kb del extremo 5' del fragmento de 5.6 kb y además, la secuencia 735 pb que siguen a las 1.4 kb mencionadas y 522 pb del extremo 3' del fragmento de 5.6 kb de una sola hebra. La estrategia utilizada para secuenciar esta región se muestra en la Fig. 12. Se identificaron dos marcos de lectura abiertos en la región próxima a la inserción del transposón y probables secuencias promotoras arriba del sitio de inserción. La secuencia completa del gene mutado es de 1191 pb y codificaría a una proteína de 396 aa (Fig. 13). La búsqueda de la similitud de la secuencia deducida de aminoácidos en proteínas conocidas utilizando el programa BLAST (GCG), reveló similitud significativa con el genes *emrA* de *E. coli* (*emr*, *e*, *E. coli*; *m*, multidrogas; *r*, resistencia) que confiere resistencia a una gama de compuestos tóxicos. La probabilidad que la similitud del alineamiento entre las dos secuencias debida al azar es de $2.4e^{-34}$. Este alineamiento se extiende en casi toda la proteína. Luego de identificada *EmrA*, se realizó un alineamiento entre su secuencia y la del gene identificado en el pb. Se encontró que entre ellas presentan 33.9% de identidad y 52.0% de similitud (Fig. 14). Debido a su homología, este gene se denominó *lmrA1* (*r*, *Rhizobium*). Arriba del codón de iniciación de *lmrA1* se identificaron probables secuencias promotoras semejantes a los motivos -10 y -35 de promotores σ^{70} de *E. coli* que constituirían parte de la región reguladora de este gene. Arriba del codón de iniciación no se encontraron secuencias similares al consenso de caja *nod* descrito por Spaink *et al.* (1987) ni secuencias consenso de promotores -24/-12 (Barrios *et al.*, 1995). Utilizando la secuencia de aminoácidos, se obtuvo el diagrama de hidrofobicidad de *RmrA1* y fue comparado con el de *EmrA1* (Fig. 15). En los dos diagramas mencionados puede observarse un pico hidrofóbico próximo al extremo N-terminal que comprendería una hélice transmembranal característica de las proteínas de este tipo.

Detrás del codón de terminación de *lmrA1* existe una corta región intergénica de 24 pb seguida de otro marco de lectura abierto con su propia secuencia de pegado a ribosomas. Utilizando nuevamente el programa BLAST en la búsqueda de secuencias conocidas similares, se encontró que es similar a *emrB* de *E. coli*. La probabilidad que dicha similitud se deba al azar es de $4.6e^{-31}$. De la secuencia de bases de este marco de lectura abierto se dedujo la secuencia de aminoácidos y se comparó con la secuencia de *EmrB*. Se encontró un 28.2% de identidad y un 51.0% de

similitud (Fig. 16). También se encontró una secuencia consenso de la familia de principales facilitadores (Fig. 13). Arriba de este marco de lectura, no se identificaron secuencias promotoras, lo cual sugiere que los genes están organizados en un operón.

La secuencia de bases del gen *rmrA1* presenta una similitud del 46.9% con el gene *emrA* en casi toda su extensión (Fig. 17). En la región próxima al extremo 3', la similitud es más alta, particularmente en 2 zonas. En una de ellas, la identidad es del 64% en 117 pb y en otra es de 68% en 83 pb. La probabilidad de que esta parecido sea por azar es de $7.2e^{-15}$.

También se analizó el resto de la secuencia obtenida de los fragmentos de 1.3 y 5.6 kb. En la búsqueda de similitud de otras regiones de la secuencia se obtuvieron los siguientes resultados. En todos los casos, se trata de similitud en la secuencia de aminoácidos.

En la secuencia del extremo 5' del fragmento de 1.3 kb se encontró un marco de lectura abierto (*m1a1*) con alta similitud al gen *uxuA* de *E. coli* y *H. influenzae*. La probabilidad que la semejanza sea debido al azar es de $3.6 e^{-58}$ y $5.9 e^{-53}$, respectivamente. Este gen codifica a la manonato hidratasa (o hidrolasa) y forma parte del metabolismo de los glucurónidos. Dicha similitud corresponde a la última parte del gen por lo que se supone que el extremo 5' de este gen se encuentra en el fragmento EcoRI de 7.5 kb vecino al de 1.3 kb (Fig. 18).

Al analizar la secuencia del extremo 3' del fragmento de 5.6 kb se encontró otro marco de lectura abierto (*m1a2*) con similitud a hipotéticas proteínas transportadoras del tipo ABC de *E. coli* y *H. influenzae*. La probabilidad de que el parecido se deba al azar es de $2.0 e^{-31}$ y $2.5 e^{-30}$ (Fig. 18).

10) SECUENCIACION DE LA REGION PROXIMA AL *Tn5B30* EN LAS CEPAS CFNA3, CFNB3 Y CFNB18

En la búsqueda de homología de la secuencia próxima a la inserción del *Tn5B30* con secuencias conocidas, se encontró semejanza significativa sólo en el caso de la mutante CFNB18. Su secuencia presenta homología con el producto de un gene similar a *htrA* de *Brucella abortus*, un gene de respuesta a estrés térmico y a el producto del gene *degP* (cromosomal) de *R. meliloti*. La secuencia deducida de este gen de *R. meliloti* es similar a una proteasa periplásmica inducible por estrés térmico en *E. coli*.

11) EFECTO DEL EXUDADO DE RAIZ DE FRIJOL SOBRE LA MUTANTE A31

Debido a la similitud encontrada entre *RmrA1* y *EmrA* (un gene que otorga resistencia a compuestos tóxicos) se decidió investigar si existe algún efecto tóxico del exudado que influye sobre el crecimiento de *R. etli* CFN42. Por este motivo se realizaron dos tipos de experimentos.

En uno de ellos se midió el crecimiento de CFNA31, CFNA31a (pCos126), CFNA31b (pLAFR1) y la cepa silvestre en presencia y ausencia de los compuestos exudados de frijol (Mat. y Mét., punto Q). Se observó que en ausencia del exudado,

las tres cepas tienen un crecimiento semejante. El exudado estimula el crecimiento en la cepa CFN42 y esta estimulación es más notoria en la cepa complementada con el pCos126 (A31a). La cepa mutante A31 crece menos en presencia de la planta que la cepa silvestre (Fig. 19).

En experimentos realizados con medio mínimo sólido (Mat. y Mét., punto R), las cajas conteniendo a la mutante CFNA31 presentaron una zona de inhibición del crecimiento en el lugar donde fue colocado el exudado. Esta zona de inhibición carece de la turbidez ocasionada por el crecimiento bacteriano. Las bacterias de esta zona fueron capaces de crecer después de 24 hs. Las cepas silvestre y complementada no presentaron dicha zona de inhibición.

Estos dos resultados muestran que algún(os) compuesto(s) del exudado posee efecto nocivo sobre *R. etli* CFNA31.

12) REITERACIONES DE LOS GENES INDUCIBLES

Una de las características del genoma de *R. etli* es la presencia de reiteraciones de secuencias en el ADN, la cual puede originar inestabilidad genómica (Flores et al., 1987). Por esta razón, se investigó si los genes mutados se encuentran reiterados.

En ensayos de hibridación entre el ADN genómico de *R. etli* CFN42 digerido completamente con HindIII y el fragmento HindIII que contiene secuencias de los genes inducibles de cada una de las mutantes como sonda, se observó una sola banda en la autoradiografía en los casos de las mutantes CFNA3, CFNA31 y CFNB18. Cuando se usó el mismo fragmento de la mutante CFNB3 se detectaron 2 bandas que presentan homología (una de 10.8 kb y otra de 3.3 kb) (Fig. 20). Existe una diferencia marcada en la intensidad de dichas bandas por lo que puede interpretarse que la homología es muy baja en la banda de 3.3 y que ese fragmento no codifique la misma proteína que la banda 10.8 kb, por lo cual, no podría considerarse como una reiteración del gene con la inserción del *Tn5B30*.

13) ANALISIS DE LA PRESENCIA DE LOS GENES INDUCIBLES DE *R. etli* CFN42 EN *R. tropici* CFN299

Las plantas de frijol pueden ser noduladas por diversos grupos de rizobios además de *R. etli*, entre ellos *R. tropici*. Con el fin de conocer si las secuencias identificadas en *R. etli* se encuentran también en el genoma de *R. tropici* CFN299, se realizaron experimentos de hibridación entre el ADN genómico de CFN299 y los diferentes fragmentos HindIII de las cepas mutantes. Se encontró que *R. tropici* CFN299 posee secuencias con homología significativa con los fragmentos HindIII de las mutantes CFNA3 y CFNB3. En cuanto a las otras 2 mutantes, CFNA31 y CFNB18 se observa baja homología representada por una tenue banda en la autoradiografía que aparece a tiempos de exposición largos (Fig. 21). De este resultado se deduce que un par de las secuencias encontradas están compartidas entre *R. etli* CFN42 y *R. tropici* CFN299.

DISCUSION

En este trabajo se identificaron y analizaron cuatro secuencias genómicas de *R. etli* CFN42 que se expresan en presencia de exudado de raíz de frijol y de diversos flavonoides. Una de estas secuencias está ubicada en el pb y las tres restantes en el cromosoma. Se conoce poco acerca de genes cromosomales de *Rhizobium* inducidos por la planta. Algunos de ellos han sido detectados recientemente en el cromosoma de *R. fredii* NGR234 (Perret *et al.*, 1994), pero no existen antecedentes en *R. etli*. Estas cepas mutantes fueron objeto de una caracterización parcial. Se encontró que el crecimiento en medio mínimo no está afectado por ninguna de las inserciones por lo que se deduce que las mutaciones no provocan ninguna auxotrofia. No se observaron alteraciones en la producción de LPS, del factor de nodulación y en la movilidad de las cepas mutantes mediante los ensayos utilizados. El número de nódulos obtenidos en ensayos de nodulación en plantas de frijol se redujo en dos de las mutantes (CFNA3 y CFNA31) respecto a la cepa silvestre. No se observaron diferencias en el caso de las dos cepas restantes (CFNB3 y CFNB18). En la búsqueda de homología de las secuencias cromosomales próximas a la inserción del *Tn5B30* con secuencias conocidas, se encontró semejanza significativa sólo en el caso de la mutante CFNB18. Su secuencia presenta homología con el producto de un gen similar a *htrA* de *Brucella abortus*, un gene de respuesta a estrés térmico y al producto del gene *degP* (cromosomal) de *R. meliloti*.

La reducción en el número de nódulos en CFNA31 junto con la obtención de la clona que porta al gene silvestre condujeron a intensificar el estudio del gene mutado en dicha cepa, por lo cual a continuación, la discusión se dedicará al análisis de los resultados obtenidos con la cepa CFNA31.

En este trabajo se identificó y analizó un gene de 1191 pb (396 aa.) de *R. etli* CFN42 inducido por compuestos presentes en el exudado de raíz de frijol y en particular por flavonoides. La secuencia ubicada en el extremo 5' de este gen presenta un promotor potencial con secuencias semejantes a los motivos -10 y -35 de los promotores σ^{70} de *E. coli* que regularían la expresión del gene. También se encontró un sitio de pegado a ribosomas (Shine and Delgarno, 1975). Inmediatamente detrás de este gen se encuentran secuencias homólogas a *emrB* con su propia secuencia de unión a ribosomas. Secuencias de reconocimiento para un sistema inducible como caja *nod* no han sido identificados. Es posible que la inducción por flavonoides está bajo el control de algún sistema aún desconocido.

La secuencia de aminoácidos del gene identificado presenta similitud significativa con *emrA* de *E. coli* (33.9% de identidad y 52.0% de similitud) y por esta razón se lo denominó *rmrA1*. En *E. coli* los genes *emrAB* otorgan resistencia a desacopladores de la fosforilación oxidativa y a un número de compuestos hidrofóbicos no relacionados. Este hecho constituye un caso diferente al de los genes de resistencia a un antibiótico específico ya que un mismo mecanismo protege de varias sustancias nocivas. *emrA* forma parte de un operón de tres genes junto con *emrB* y *mprA*. La región que antecede a *emrA* no presenta secuencias promotoras pero sí presenta similitud con un gene conocido *mprA* que tiene secuencias promotoras típicas. Se sugiere que se transcribiría un mRNA conteniendo los tres genes que sería objeto de un procesamiento

posterior. EmrA es una proteína unida a membrana de 390 aa y un PM de 42.7 Kda. Presenta un extremo N-terminal ubicado en el citoplasma al que le sigue un dominio hidrofóbico formado por una α -hélice que atraviesa la membrana y un largo dominio periplásmico C-terminal. Esta disposición no fue deducida de la secuencia del péptido sino que requirió un análisis posterior en el que con fusiones con el gene *phoA* (fosfatasa alcalina) se determinó que gran parte de la proteína es periplásmica. *emrB* está formada por 513 aa con un PM de 55.6 Kda. Es una proteína integral de membrana, altamente hidrofóbica con 14 α -hélices que atraviesan la membrana. Este gen pertenece a una familia de translocasas de membrana, denominada principales facilitadores, que incluye proteínas de resistencia a multidrogas en bacterias Gram-positivas. *emrB* fue el primer gen de este tipo reportado en Gram-negativas. Presenta una secuencia consenso (G-X-h-h-G-P-X-I-G-G, h: residuo hidrofóbico; X, cualquier residuo) encontrada en la mayoría de los miembros de esta familia (QacA, Bmr, NorA); dichos miembros no son cercanos entre sí por lo que se supone que estos sistemas han aparecido varias veces en diferentes grupos de bacterias en forma independiente en el curso de la evolución. Por ejemplo, EmrB es mucho más cercano a Mmr que codifica para una bomba de extrusión de metilnomicina de *Streptomyces* que a la bomba de resistencia a multidrogas de *Bacillus subtilis* (Bmr) o a EmrD de *E. coli*. La característica de otorgar resistencia a compuestos claramente hidrofóbicos separa a *emr* de otros miembros de la familia génica. Hasta el momento, existe sólo un reporte de un mecanismo de resistencia a multidrogas con función natural. Es el caso de las proteínas MexAB, implicadas en el eflujo de ploverdin, un quelante de hierro sintetizado por *Pseudomonas aeruginosa* (Poole *et al.*, 1993).

En un estudio en el que analizan proteínas transportadoras (Saier *et al.*, 1994) que hasta ese momento quedaban fuera de las familias caracterizadas, establecieron que EmrA junto con NolF de *R. meliloti*, EnvC y HlyD de *E. coli* por su homología forman parte de una familia. Se propone que estas proteínas pueden causar fusión localizada de las membranas interna y externa para que los transportadores puedan exportar grandes cantidades de sustancias del citoplasma al medio externo sin pasar a través del periplasma y la denominaron familia de proteínas de fusión de membrana. Las proteínas de este grupo están poco conservadas y debido a su rol estructural y no catalítico su homología es baja. Además, los residuos conservados son hidrofóbicos por lo cual se propone que están asociadas por su origen transportador.

Los criterios para incluir en una misma familia a la proteínas mencionadas fueron:

- Homología de la secuencia primaria de bases;
- Similitud de la secuencia de aminoácidos en gran parte de la secuencia de aminoácidos;
- Similitud en el tamaño de la proteína;
- Similitud en el diagrama de hidrofobicidad;
- Organización del operón.

Teniendo en cuenta estos criterios, es probable que RmrA1 pueda incluirse dentro de la familia de proteínas de fusión de membranas porque:

- Su homología con EmrA es significativa. Al comparar la secuencia de aminoácidos de RmrA1 con EmrA se obtiene 33.9% de identidad y 52.0% de similitud (Fig. 14).

Además, utilizando el programa BLAST, la probabilidad que su parecido sea debido al azar es de $2.4e^{-34}$. La homología en la secuencia de bases apoya esta semejanza;

-La similitud se mantiene en toda la extensión de la secuencia de aminoácidos (Fig. 14);

-El tamaño de las proteínas es semejante (396 aa. en RmrA1 vs. 390 aa. en EmrA);

-En el diagrama de hidrofobicidad, ambas proteínas presentan un pico hidrofóbico próximo al extremo N-terminal que comprendería una hélice transmembranal (Fig. 15);

-El gene *rmrA1* está seguido por secuencias homólogas a *emrB1* (Fig. 13) que podría denominarse *rmrB1* y cuya secuencia deducida de aminoácidos presenta la secuencia consenso más importante de la familia de principales facilitadores a la que pertenece EmrB (Fig. 13).

En vista de la similitud entre RmrA1 de *R. etli* con proteínas de fusión de membrana (en particular con EmrA) es posible desarrollar la siguiente interpretación.

La rizósfera es un medio variado y dinámico. En este espacio, diferentes tipos de interacciones entre los organismos del suelo son posibles. En gran medida, dichas interacciones están influenciadas por compuestos liberados por la planta.

Entre estas interacciones, la relación simbiótica (mutualismo) entre rizobios y leguminosas ha sido objeto de considerable atención. Uno de los aspectos más estudiados es el hallazgo de ciertas analogías con relaciones de tipo patógenas entre microorganismos y plantas. Esto se basa en que la presencia del rizobio o de alguno de sus derivados desencadena, al igual que un patógeno, el desarrollo de un mecanismo de defensa (Djordjevic *et al.*, 1987a) conocido como respuesta de defensa de la planta. Algunas de las evidencias presentadas son: la degradación de la pared celular (considerada como la evidencia de mayor peso en la transición de *Rhizobium* de comensal a parásito), la síntesis de nuevo material en la pared celular como parte de la respuesta de defensa y el desencadenar en la planta la producción de sustancias antimicrobianas como fitoalexinas (Parniske *et al.*, 1991) y la inducción de quitinasas provocada por rizobios (Vasse *et al.*, 1993; Staehelin *et al.*, 1994) como parte de la reacción hipersensible. Es así que los rizobios se comportan como parásitos en el hilo de infección y sólo si el rizobio se transforma en bacteroide y fija nitrógeno la relación pasa a ser simbiótica. De no alcanzarse esta etapa, la planta generalmente es debilitada por la presencia del rizobio. El desarrollo de cierta adaptación a la respuesta del huésped ha llevado a que los rizobios puedan ser considerados como parásitos refinados (Djordjevic *et al.*, 1987a).

Las plantas exudan una amplia gama de sustancias, entre ellas se encuentran las fitoalexinas (Swain, 1977). Estas sustancias son metabolitos secundarios y forman parte esencial de la resistencia del huésped (sobretudo en Dicotiledóneas) frente a estímulos biológicos, físicos o químicos. Presentan actividad antimicrobiana evitando el crecimiento de ciertos microorganismos en la rizósfera donde se acumulan hasta alcanzar niveles tóxicos. Cada planta produce un rango de fitoalexinas relacionadas biosintéticamente. Forman parte de la defensa activa y, a diferencia de las inhibinas que se encuentran en los tejidos del huésped antes de la infección y aumentan en los tejidos invadidos, la formación de fitoalexinas requiere la represión o activación de un sistema enzimático (Fraser, 1985).

Se han reportado diversas fitoalexinas de leguminosas en rizósfera y en nódulo con efecto tóxico sobre diferentes cepas de *Rhizobium*. Faseolina, medicarpina, macklaina

y keivitona mostraron actividad inhibitoria hacia algunas cepas de rizobios capaces de nodular *Lotus* sp de crecimiento rápido o lento (Pankhurst and Biggs, 1980). Compuestos provenientes de nódulo, los flavolanos (taninos condensados) afectan negativamente *in vitro* el crecimiento de ciertas cepas de *R. loti* (Pankhurst and Jones 1979). Cumestrol, genisteína y en menor medida daidzeína inhiben el crecimiento de mutantes *Exo⁻ Ops⁻* de *R. etli* (Eisenschenk *et al.*, 1994). Gliceolina inhibe el crecimiento de cepas capaces de nodular soya (Parniske *et al.*, 1991). De esta forma, el efecto antibacteriano de las fitoalexinas, controlaría al menos en parte, las poblaciones de ciertos microorganismos en las proximidades de la raíz. Sólo en el caso en que ciertos microorganismos puedan evadir esta barrera es que podría establecerse algún tipo de interacción posterior.

En ciertos casos, el rizobio puede contrarrestar o controlar la respuesta de la planta. Se determinó que la habilidad de ciertas cepas de *R. loti* para formar nódulos efectivos (Nod⁺ Fix⁺) en *Lotus* sp está correlacionada con la sensibilidad *in vitro* a cierto tipo de flavolanos presentes en las raíces de esta leguminosa (Jones *et al.*, 1987). La cepa NZP2037, que forma nódulos fijadores es 4 veces más tolerante a los flavolanos que la cepa NZP2213 la cual forma nódulos inefectivos sin rizobios intracelulares. La habilidad de la cepa NZP2037 para tolerar mayores concentraciones de flavolanos fue asociada a la capacidad de su membrana externa de unir mayor cantidad de moléculas de flavolanos que la membrana externa de NZP2213. Encontraron además, que los flavolanos se unen en gran cantidad (70%) a un polisacárido unido al peptidoglicano y en menor cantidad (10%) a una lipoproteína de la membrana externa. Estos componentes son específicos de la cepa resistente y no están presentes en el cepa sensible. Los autores sugieren que los componentes de la superficie de ambas cepas son diferentes y que la cepa resistente posee moléculas (polisacáridos y proteínas) a las que se unen los flavolanos y no son esenciales para la viabilidad de la célula y de esta forma su entrada en la planta quedaría bloqueada. En cambio, en la cepa sensible que carece de estas moléculas, los flavolanos se unirían a compuestos esenciales para su viabilidad.

Se ha observado que deficiencias en ciertos polisacáridos evitan el desarrollo normal de la simbiosis. Entre ellos, los exopolisacáridos (EPS) los cuales se secretan fuera de la membrana externa y son requeridos para la infección del huésped que posee nódulos de desarrollo indeterminado (alfalfa, *Lupinus* sp) pero no son necesarios en los de desarrollo determinado (frijol, soya, *Lotus* sp). Los EPS actúan como un factor de protección (Djordjevic *et al.*, 1987b) ya que la adición de EPS exógeno a plantas, junto con mutantes *Eps⁻* resulta en la corrección de la incapacidad de estos mutantes para inducir nódulos fijadores de nitrógeno. Este efecto es considerado como evidencia del rol activo de los EPS con los que se suprime el sistema de defensa de la planta.

Los lipopolisacáridos (LPS), que forman parte de la membrana externa, también han sido involucrados en el proceso normal de infección. Mutantes en LPS son incapaces de completar dicho proceso (Dazzo *et al.*, 1991; de Maagd *et al.* 1989; Noel, 1992; Priefer, 1989; Puvanesarajah *et al.*, 1987) y se ha propuesto que junto con EPS, los LPS formarían parte de una barrera que evita la entrada a la bacteria de compuestos tóxicos de la planta (Eisenschenk *et al.*, 1994). Eisenschenk y colaboradores han reportado datos que apoyan esta hipótesis. Compuestos extraídos de raíz de *P.*

vulgaris inhiben el crecimiento de mutantes Lps y Eps y mata a mutantes Ops' Eps' a concentraciones que son bioestáticas para la cepa silvestre. Identificaron a cumestrol y a un compuesto no identificado extraído en petróleo-éter como los compuestos inhibidores más importantes presentes en el extracto de raíz. A diferencia de lo encontrado en el exudado de soya y frijol, donde las fitoalexinas son inducidas por la presencia de rizobios (Dakora *et al.*, 1993; Karr *et al.* 1992; Schmidt *et al.*, 1992) no se observó tal inducción en el extracto de raíz de plantas inoculadas con mutantes Ops' de *R. etli* (Eisenschenk *et al.*, 1994).

Otra forma de evadir los compuestos tóxicos de la planta es catabolizar dichos compuestos. Rao and Cooper (1994) han encontrado que diversos grupos de *Rhizobium* son capaces de degradar compuestos flavonoides mediante un mecanismo común que se basa en la ruptura del anillo C del heterociclo. Los mismos autores observaron que nuevos flavonoides con actividad inductora o inhibitoria pueden aparecer con la degradación.

Son escasas las evidencias sobre mecanismos de insensibilidad a fitoalexinas que no dependan de la degradación o de la formación de una barrera que impida su entrada.

Denny & Van Etten (1983a, 1983b) encontraron que en el hongo *Nectria haematococca* que el pretratamiento con pisatina inducía la tolerancia a otros isoflavonoides. Los autores sugieren que durante el pretratamiento con pisatina, la composición de la membrana plasmática se modifica (en particular, la estructura y orientación de los esteroides) y que esta modificación está asociada a la insensibilidad no degradativa a fitoalexinas. Otro posible mecanismo de resistencia fue reportado por De Waard and Van Nistelrooy (1981). Ellos encontraron que la tolerancia no-degradativa al fungicida fenarimol (un inhibidor de la síntesis de ergosterol) en cepas silvestres de *Aspergillus nidulans* está determinada genéticamente y que el transporte en la membrana celular es la base para la resistencia al fungicida en cepas silvestres de *A. nidulans*. La cantidad de este compuesto en el interior de la célula es el resultado de dos procesos, un influjo pasivo y un eflujo dependiente de la energía. Este último, en contraste con el primero es inducido por otros compuestos inhibidores de la biosíntesis de ergosterol, por antibióticos o por compuestos no relacionados como pisatina. Además, a diferencia de la cepa silvestre, cepas mutantes de *A. nidulans* poseen un mecanismo de eflujo constitutivo que no necesita activación.

En soja, la fitoalexina gliceolina provoca una inhibición transitoria del crecimiento de diferentes grupos de rizobios capaces de nodular dicha leguminosa (*Bradyrhizobium japonicum* 110, *B. japonicum* 61A101 y *Sinorhizobium fredii* HH103) (Parniske *et al.*, 1991). Los estudios mostraron que la gliceolina no es metabolizada ni detoxificada sino que la bacteria desarrolla resistencia a dicho compuesto. Observaron además, que la resistencia es inducida por flavonoides estructuralmente similares a la gliceolina como la genisteína o daidzeína (isoflavonoides) y más fuertemente por isoliquiritigenina (chalcona)(Kape *et al.*, 1992). De esta forma, estos rizobios, aunque susceptibles a la gliceolina producida por soja, son capaces de adaptarse y resistir su efecto inhibitorio en la rizósfera. Como resultado, esta resistencia inducible le confiere al rizobio un aumento de su supervivencia en las proximidades de la raíz. Al mismo tiempo, los flavonoides son inductores de genes *nod*. Se sabe que se acumulan en la membrana citoplásmica (Recourt *et al.*, 1989) donde la proteína NodD está localizada (Schlaman

et al., 1989). Este hecho representa un dilema. Por un lado, ciertos flavonoides presentes en baja concentración son tomados como señal inductora de genes *nod*. Por otro lado, no debe alcanzarse una concentración intracelular inhibitoria de isoflavonoides. En el caso de la gliceolina, estos niveles internos de dichos compuestos podrían ser regulados por cambios en la permeabilidad de la membrana externa según estos autores, aunque hasta el momento no han reportado datos que apoyen esta hipótesis.

Si bien la resistencia inducible a gliceolina también por isoflavonoides sin degradación ya había sido reportada en hongos (Denny and VanEtten, 1983a, b; Kurosaki *et al.*, 1984; Stossel, 1983), el anterior constituye el primer y único reporte de este tipo en bacterias.

Hubac *et al.* (1993) demostraron que la tasa de absorción de flavonoides al citoplasma de la bacteria es mayor cuando se trata de un flavonoide inductor de genes *nod*. Es así que en el caso de luteolina, se encontró que el nivel de absorción alto es específico para *R. meliloti* (no se observó en otros rizobios ni en otras bacterias gram-negativas). La incorporación de luteolina presenta una primera etapa donde la absorción es rápida y reversible (probablemente por simple disolución en la matriz lipídica de la membrana externa) después de la cual se llega a un equilibrio entre los flavonoides del medio y los de la superficie bacteriana. En una segunda etapa, la luteolina se acumula en las dos membranas. Esta última etapa podría requerir un gasto de energía. Se detectó que la acumulación ocurre principalmente en la membrana externa y en cantidades menores (pero significativas) en la membrana interna (Hubac *et al.*, 1994). Según los autores de este reporte, la mayor especificidad de la membrana externa por luteolina proporcionaría protección contra el efecto tóxico que los flavonoides producen al inhibir enzimas de la cadena respiratoria ubicada en la membrana interna (Hubac *et al.*, 1993). Finalmente, se aportan evidencias de un proceso de extrusión activo de luteolina. Un mecanismo similar estaría presente en *R. leguminosarum* (Recourt *et al.*, 1989) por lo que no estaría restringido a *R. meliloti*. La membrana externa es una barrera efectiva contra compuestos anfipáticos conteniendo grupos cargados. Pero en el caso de los compuestos lipofílicos no cargados quienes pueden atravesar la membrana citoplásmica, las únicas formas de defensa serían la inactivación o la extrusión activa.

Con estos antecedentes y los resultados obtenidos, se propone que el gene mutado forma parte de un operón el cual está involucrado en la resistencia de *R. etli* CFN42 a compuestos tóxicos del exudado. De esta forma, *R. etli* es capaz de traspasar la barrera de defensa de la planta, representada por ciertos compuestos con efecto tóxico, luego iniciar el proceso de infección y finalmente, poder establecer una simbiosis efectiva. Las semejanzas con el operón *emrAB*, el efecto inhibitorio de algún(os) compuesto(s) del exudado en la cepa que posee inactivado el gen *rmrA1* (con efecto polar sobre *emrB1*) y la inducibilidad por flavonoides, carácter que comparten todos los sistemas de resistencia a fitoalexinas conocidos (Parniske *et al.*, 1991) constituyen las bases en que se fundamenta esta hipótesis. Es probable que la resistencia a compuestos tóxicos mediante la inducción de una bomba de extrusión no sea la única forma de resistencia. Como se mencionó anteriormente, existen otras formas como la degradación (Rao and Cooper, 1994) o la protección con polisacáridos (Eisenschenk *et al.*, 1994) con la misma finalidad. El desarrollo de diferentes estrategias

de tolerancia dentro de una misma especie e incluso de una misma cepa podría estar asociado a la diversidad de las sustancias con efecto nocivo producidos por la planta.

En la cepa mutante A31 no se observó ninguna alteración en su crecimiento en medio mínimo respecto a la cepa silvestre. Cuando se analizó su crecimiento en medio mínimo con exudado de raíz de frijol, se observó inhibición del crecimiento en presencia del exudado de raíz de frijol. Por el contrario, el crecimiento de la cepa complementada con un fragmento conteniendo esos genes, fue mayor respecto a la cepa silvestre. Este efecto, como se mencionó anteriormente, ya había sido observado en rizobios ocasionado por ciertas fitoalexinas por lo que es probable que algún compuesto del tipo de las fitoalexinas sea el responsable del efecto observado. Aún no se han realizado experimentos para probar esta suposición, por lo cual la naturaleza del o los compuesto(s) inhibitorios es desconocida.

La reducción en el número de nódulos producidos por la cepa mutante respecto a la silvestre podría ser interpretada de la siguiente forma. En las cercanías de la raíz o en el hilo de infección, los compuestos inhibitorios tendrían efecto sobre la población de la mutante en *rmrA1* afectando su crecimiento y reduciendo el número de rizobios capaces de infectar la raíz, resultando un menor número de nódulos.

Los casos estudiados de resistencia a fitoalexinas del tipo isoflavonoide, tanto en hongos (Denny and VanEtten, 1983b; Kurisaki *et al.*, 1984; Stossel, 1983) como en bacterias (Parniske *et al.*, 1991) son inducibles por isoflavonoides. En el caso de *rmrA1* los compuestos inductores son del tipo flavonoide, incluyendo a isoflavonoides. Este hecho es destacable ya que muestra una semejanza entre los sistemas de inducción. Por otro lado, el carácter inducible de este tipo de respuesta otorga al microorganismo cierta plasticidad con la cual se adapta a los cambios en el medio ambiente. La rizósfera constituye el medio ambiente en este proceso y los cambios son ocasionados por la posible variación de los compuestos producidos por la planta como parte de su defensa. La inducibilidad por un grupo de flavonoides y no por un compuesto específico, representaría una ventaja que permite responder a tales cambios.

La resistencia a tiolactomicina, una tiolactona con efecto antibiótico que bloquea el crecimiento de *E. coli* por inhibición de la síntesis de ácidos grasos al inhibir a la sintetasa de β -acetoacilos (Furukawa *et al.*, 1993) muestra un posible mecanismo de resistencia que también podría ocurrir en rizobios. Esta enzima es requerida para la elongación de los acilos no-saturados en bacterias. Se determinó que esta resistencia está asociada al operón *emrAB* y que se adquiere por la activación de una bomba de eflujo de tiolactomicina por la cual la concentración intracelular acumulada del antibiótico no inhibe a la sintetasa. Teniendo en cuenta este antecedente, es posible proponer un efecto semejante en el caso de la resistencia a compuestos del exudado mediado por *RmrA1*. Se sabe que la gliceolina y otras fitoalexinas ejercen su actividad antibiótica por su efecto sobre ciertas enzimas como ATPasa (Giannini *et al.*, 1988), NADH-ubiquinona-oxidoreductasa (Boydston *et al.*, 1983) o NADH-oxidasa (Hubac *et al.*, 1993). La reducción de la concentración interna del o los compuesto(s) tóxico(s) en la bacteria por la activación de un sistema de extrusión evitaría su efecto nocivo.

Hasta el momento, la habilidad de evadir la respuesta de la planta ha sido considerada como un paso previo para interacciones de tipo patógeno. La información que se presenta, amplía dicho concepto ya que da lugar a otro tipo de interacción

como lo es la asociación simbiótica. Además, este sería uno de los primeros casos conocidos en el que un mecanismo de resistencia a un grupo de compuestos tóxicos desempeña una función natural como la propuesta en esta tesis, ya que hasta el momento solo se ha descrito un caso en *Pseudomonas aeruginosa* (Poole *et al.*, 1993).

En rizobios, la mayoría de los genes inducibles por flavonoides contienen una secuencia conservada de aproximadamente 50 pares de bases ubicadas entre 100 y 250 pares de bases delante del sitio de inicio de la transcripción, denominada caja *nod* que forma parte de la región promotora y sirve como sitio de unión para la proteína regulatoria NodD (Rostas *et al.*, 1986). La región regulatoria del operón descrito no presenta secuencias que puedan ser consideradas como una caja *nod*, a pesar de estar regulado, al menos en parte por flavonoides y su expresión no depende de NodD. Existen varios genes reportados inducidos por flavonoides que tampoco presentan caja *nod* y algunos de ellos son independientes de NodD.

En *R. fredii* USDA257, el locus *noXWBTUV* regula la nodulación cultivar específica en soja y es transcrito por tres promotores diferentes (Kovács *et al.*, 1995). El promotor de *noW* es constitutivo mientras que los de *noB* y *noX* son inducibles por flavonoides (apigenina). Ninguna de estas regiones promotoras contiene cajas *nod*, a pesar de ello, tanto *noX* como *noBTUV* poseen una expresión dependiente de la presencia del gen *nodD₁* (pero no de *nodD₂*). *NoIT* y *NoIW* son homólogos a los productos del gen *hrp* que está involucrado en la secreción de proteínas de patogenicidad en un número de bacterias patógenas de plantas (Kovács *et al.*, 1995).

Si bien no se tiene información sobre la secuencia, estudios realizados con una cepa de *Rhizobium* con delección de los genes *nodD₁D₂YABC* mostraron que la resistencia a gliceolina es aún inducible por lo que se deduce que los dos genes *nodD* no son necesarios para la expresión de la resistencia. Estos autores postulan que un proceso de reconocimiento específicamente activado por isoflavonoides que no involucra genes *nodD* es posible en *B. japonicum* (Parniske *et al.*, 1991).

En una doble mutante *nodD₁/nodD₂* de *B. japonicum* (Göttfert *et al.*, 1992) los genes *nod* pueden ser pobremente inducidos por flavonoides y provocan un fenotipo *nod⁺*.

nodZ de *B. japonicum* carece de caja *nod* y es independiente de la regulación por *nodD*. Su inactivación provoca la falta de 2-O-metilfucosa en el factor de nodulación y la pérdida de la actividad mitógena del factor de nodulación (Stacey *et al.*, 1994).

El gen *noIA* de *B. japonicum* USDA110 es un regulador positivo de la especificidad. La expresión de este gen aumenta en pequeña medida por la presencia de flavonoides de la planta huésped aunque la secuencia del tipo caja *nod* está ausente (Sadowsky *et al.*, 1988). Por hibridación, la secuencia de este gen ha sido detectada en varios bradirizobios. La proteína deducida de la secuencia de *noIA* modula la expresión de genes involucrados en la resistencia a mercurio.

En *R. fredii*, *noJ* está involucrado en eficiencia de nodulación en soja pero no afecta la nodulación en otras leguminosas (Boundy-Mills *et al.*, 1994). Su expresión es inducible por flavonoides pero carece de caja *nod*. Recientemente, ha sido descrito otro gen *nod* de *R. fredii* que también carece de caja *nod* y es inducible por flavonoides en forma dependiente de *nodD₁*. Esto sugiere que *R. fredii* puede utilizar un mecanismo regulador, aún no caracterizado, controlado por *nodD* (Boundy-Mills *et al.*, 1994).

Con estos antecedentes, es posible que existan otros genes inducibles por flavonoides como *rmrA1* sin secuencias de caja *nod* y no dependientes de *nodD*. Este tipo de genes podrían estar regulados por algún otro sistema diferente al que utiliza secuencias de caja *nod* en la región promotora que aún no ha sido descrito pero cuya existencia ha sido propuesta por algunos autores (Fellay *et al.*, 1995; Parniske *et al.*, 1991; Pueppke, 1995; Kovács *et al.*, 1995). Por otro lado, como se mencionó antes, un mecanismo de resistencia a un grupo de compuestos (antibióticos y fitoalexinas) en *A. nidulans* presenta además de un eflujo inducible, otro constitutivo por el cual un tipo doble de regulación puede ser posible también en el caso de *rmrA1* debido a que secuencias para una expresión constitutiva fueron localizadas pero al mismo tiempo se observó expresión inducida por flavonoides. Cabe destacar además, que en *R. fredii* NGR234 se encontraron genes que codifican a proteínas de transporte inducibles cuya expresión es inducida por daidzeína. Una de ellas presenta homología con CadA que otorga resistencia a cadmio en *Staphylococcus aureus* y la otra tiene similitud con proteínas involucradas en el transporte activo de pequeñas moléculas hidrofílicas a través de la membrana plasmática. No se sabe si presentan o no caja *nod*. El hallazgo de estos sistemas de transporte de la membrana interna inducibles por flavonoides muestra que la inducibilidad de los mismos ya ha sido encontrada en otros casos en rizobios.

La diferencia encontrada en la regulación de *rmrA1* con respecto a otros genes *nod* podría interpretarse como más primitiva en términos evolutivos (por su relación con patogenicidad) que genes inducidos por flavonoides involucrados en simbiosis. Estos últimos presentan un mecanismo algo más sofisticado de regulación, al menos por el número de elementos que intervienen. Recientemente se encontró que *noT* y *noW* de *R. fredii* USDA257 cuyos productos son homólogos a proteínas de secreción involucradas en patogenicidad carecen de caja *nod* aunque dependen de *nodD1* para su inducción por daidzeína.

Respecto a la ubicación de *rmrA1* en el genoma, cabe hacer la siguiente consideración. El gen *rmrA1* se encuentra localizado en un plásmido no simbiótico de alrededor de 200kb, denominado pb en *R. etli* CFN42. Este plásmido es indispensable para que *R. etli* nodule frijol (Brom *et al.*, 1992). Se ha reportado que contiene secuencias involucradas en la producción de lipopolisacáridos (Cava *et al.*, 1989). La complementación de cepas curadas del pb con genes *lps* no restaura completamente las propiedades simbióticas puesto que la capacidad competitiva no se recupera respecto a la cepa silvestre, lo que se sugiere que existen otras secuencias simbióticas en el pb (Brom *et al.*, 1992). Recientemente, se han encontrado secuencias relacionadas con la síntesis de tiamina en el mismo plásmido (Miranda, J., Tesis Doctoral UNAM). Plásmidos equivalentes al pb se encuentran en la gran mayoría de las cepas de *R. etli* (González, V., Tesis de Maestría UNAM) y también en cepas de *R. leguminosarum* de los biovares *viciae* y *trifolii* (García de los Santos, A., Comunicación personal). Se puede especular que este plásmido existía antes de que se separaran los linajes *etli* y *leguminosarum*, tal vez es un plásmido con funciones básicas para la interacción con planta previas al surgimiento de la nodulación. Cabe agregar, que el fragmento HindIII conteniendo los genes *rmrA1B1* mutado se encuentra bien conservado en cepas de *R. leguminosarum* *bvs. vicia* y *trifolii*, y tal vez en *R. tropici* CFN299 por lo que se podría pensar que una función semejante a la codificada por *rmrA1* existe en

otras asociaciones simbióticas entre rizobios y leguminosas.

Finalmente, debido a que los genes identificados son inducidos por flavonoides, podría esperarse que alguna de estas secuencias presentara similitud con genes *nod* conocidos. Esta posible similitud no ha sido encontrada en ninguno de los casos analizados. La búsqueda de las secuencias inducibles se basó en la expresión del gen de la neomicina fosfotransferasa que da resistencia a kanamicina en presencia de exudado o flavonoides cuando dicho gen reportero queda bajo la regulación de las secuencias de un gen inducible por dichos compuestos. Para poder ver una diferencia clara en el crecimiento en medio sólido, el gen inducible debe tener una expresión fuerte y sostenida. Se sabe que la expresión de algunos de los genes *nod* es débil y ocurre en un período de tiempo limitado. Por ejemplo, según Fellay y colaboradores (1995) la expresión de los genes *nodABCIJ* es débil después de los 10 minutos de la inducción, fuerte a la primera hora y no es detectable a las 24 horas.

CONCLUSIONES

1- Se identificaron y analizaron parcialmente 3 secuencias cromosomales de *R. etli* CFN42 inducidas por flavonoides del exudado de raíz de frijol. Secuencias cromosomales controladas por la planta no habían sido detectadas anteriormente en *R. etli*. La inserción del *Tn5B30* en la secuencia correspondiente a la cepa CFNA3 reduce significativamente el número de nódulos por lo cual puede especularse que tiene un papel en simbiosis. La secuencia inducible por flavonoides de la cepa B18 muestra homología con el producto de un gen similar a *htrA* de *Brucella abortus*, un gen de respuesta a estrés térmico y al producto del gen *degP* (cromosomal) de *R. melloti*.

2- La secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de bases inducible por flavonoides en la cepa CFNA31 mostró homología con proteínas de fusión de membranas, en particular con *EmrA* de *E. coli* que interviene en la extrusión de una gama de compuestos tóxicos por lo que otorga resistencia a los mismos. Debido a la similitud mencionada y al efecto inhibitorio del crecimiento del exudado sobre la cepa mutante se propone que este gen está involucrado en la resistencia de *R. etli* CFN42 a compuestos tóxicos en la rizósfera de frijol mejorando su sobrevivencia. Finalmente, debido a la localización de este gen en el pb, se aporta información sobre la forma en la que dicho plásmido interviene en la interacción con la planta.

BIBLIOGRAFIA

Aguilar, J.M.M., A.M. Ashby, A.J.M. Richards, G.J. Loake, M.D. Watson, and C.H. Shaw. 1988. Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli towards flavonoid inducers of the symbiotic nodulation genes. J. Gen. Microbiol. 134:2741-2746.

Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl eds. 1995. Current Protocols in molecular biology. Vol. 1. John Wiley & Sons, Inc. USA.

Barrios, H., Fischer, H-M., Hennecke, H., and E. Morett. 1995. Overlapping promoters for two different RNA polymerase holoenzymes control *Bradyrhizobium japonicum nifA* expression. J. Bacteriol. 177:1760-1765.

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

Bhuvanewari, T.V., and W.D. Bauer. 1978. Role of lectins in plant-microorganism interactions. III. Influence of rhizosphere/rhizoplane culture conditions on the soybean lectin-binding properties of rhizobia. Plant Physiol. 62:71-74.

Boundy-Mills, K.L., R.M. Kosslak, R.E. Tully, S.G. Pueppke, S. Lohrke, and M.J. Sadowsky. 1994. Induction of the *Rhizobium fredii nod* box-independent nodulation gene *nodJ* requires a functional *nodD1* gene. Mol. Plant-Microbe Interact. 7:305-308.

Boydston, R., J. D. Paxton, and D.E. Koeppe. 1993. Glyceollin: a site-specific inhibitor of electron transport in isolated soybean mitochondria. Plant Physiol. 72: 151-155.

Brom, S, A. García de los Santos, T. Stepkowsky, M. Flores, G. Dávila, D. Romero, and R. Palacios. 1992. Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli are required for optimal symbiotic performance. J. Bacteriol. 174:5183-5189.

Caetano-Anollés, G., D.K. Crist-Estes, and W.D. Bauer. 1988. Chemotaxis of *Rhizobium melliloti* to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes. J. Bacteriol. 170:31-64-3169.

Cava, J.R., P.M. Elias, D.A. Turowski, and K.D. Noel. 1989. *Rhizobium leguminosarum* CFN42 genetic regions encoding lipopolysaccharide structures essential for complete nodule development on bean. J. Bacteriol. 171:8-15.

Cubo, M.T., A. Economou, G. Murphy, A.W.B. Johnston, and J.A. Downie. 1992. Molecular characterization and regulation of the rhizosphere-expressed genes *rhiABC* that can influence nodulation by *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae. J. Bacteriol. 174:4026-4035.

- Currier, W.M., and G.A. Strobel. 1977. Chemotaxis of *Rhizobium* spp. to a glycoprotein produced by birdsfoot trefoil roots. *Science* 196:434-435.
- Dakora, F.D., C.M. Joseph, and D.A. Phillips. 1993. Common bean root exudates contain elevated levels of daidzein and coumestrol in response to *Rhizobium* inoculation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6:665-668.
- Dazzo, F.B., G.L. Truchet, H.I. Hollingsworth, E.M. Hrabak, H.S. Pankratz, S. Phillip-Hollingsworth, J.L. Salzwedel, K. Chapman, L. Appenzeller, A. Squartini, D. Gerhold, and G. Orgambide. 1991. *Rhizobium* lipopolysaccharides modulates infection thread development in white clover root hairs. *J. Bacteriol.* 173:5371-5384.
- De waard, M.A., and J.G.M. Van Nistelrooy. 1981. Induction of fenarimol-efflux activity in *Aspergillus nidulans* by fungicides inhibiting sterol biosynthesis. *J. Gen. Microbiol.* 126:483-489.
- deMaagd, R.A., A.S. Rao, I.H.M. Mulders, L. Goosen-de Roo, M.C.M. van Loosdrecht, C.A. Wijffelman, and B.J.J. Lugtenberg. 1989. Isolation and characterization of mutants of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 248 with altered lipopolysaccharides: possible role of surface charge or hydrophobicity in bacterial release from the infection thread. *J. Bacteriol.* 171:1143-1150.
- Denny, T.P., and H.D. Van Etten. 1983a. Tolerance of *Nectria haematococca* MPVI to the phytoalexin pisatin in the absence of detoxification. *J. Gen. Microbiol.* 129:2893-2901.
- Denny, T.P., and H.D. Van Etten. 1983b. Characterization of an inducible, non-degradative tolerance of *Nectria haematococca* MPVI to phytoalexins. *J. Gen. Microbiol.* 129:2903-2913.
- Dharmatilake, A.J., and W.D. Bauer. 1992. Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* towards nodulation gene-inducing compounds from alfalfa roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1153-1158.
- Djordjevic, M.A., D.W. Gabriel, and B.G. Rolfe. 1987a. *Rhizobium*-the refined parasite of legumes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 25:145-168.
- Djordjevic, S.P., Chen, H., Batley, M. Redmond, J.W., B.G. Rolfe. 1987b. Nitrogen Fixation ability of exopolysaccharide synthesis mutants of *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *Rhizobium trifolii* is restored by the addition of homologous exopolysaccharides. *J. Bacteriol.* 169:53-60.
- Eckhardt, T. 1978. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* 1:584-588.
- Elsenschenk, L., R. Diebold, J. Perez-Lesher, A.C. Peterson, N. Peters, and K. D. Noel. 1994. Inhibition of *Rhizobium etli* polysaccharide mutants by *Phaseolus vulgaris* root

- compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:3315-3322.
- Fahraeus, G. 1957. The infection of clover root hair by nodule bacteria studied by a single glass slide technique. *J. Gen. Microbiol.* 16:374-381.
- Fellay, R., X. Perret, V. Viprey, W. J. Broughton, and S. Brenner. 1995. Organization of host-inducible transcripts on the symbiotic plasmid of *Rhizobium* sp. NGR234. *Mol. Microbiol.* 16: 657-667.
- Figurski, D.H., and D.R. Helinski. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided *in trans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:1648-1652.
- Flores, M., González, V., Brom, S., Martínez, E., Piñero, D., Romero, D., Dávila, G., and R. Palacios. 1987. Reiterated DNA sequences in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. *J. Bacteriol.* 169:5782-5788.
- Fraser, R.S.S. 1985. Mechanisms of resistance to plant diseases. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht.
- Friedman, A.N., S.R. Long, S.E. Brown, W.J. Buikema, and F.M. Ausubel. 1982. Construction of a broad host range cosmid vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium* mutants. *Gene* 18:289-296.
- Furukawa, H., Tsay, J-T., Jackowski, S., Takamura, Y., and C.O. Rock. 1993. Thiolactomycin resistance in *Escherichia coli* is associated with the multidrug resistance efflux pump encoded by *emrAB*. *J. Bacteriol.* 175:3723-3729.
- George, M.L.C., Robert, F.M., and D. Borthakur. 1992. Genetic analysis of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli mutants defective in nodulation and nodulation suppression. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1050-1053.
- Giannini, J. I., D. P. Briskin, J. S. Holt, and J. D. Paxton. 1988. Inhibition of plasma membrane and tonoplast H⁺-transporting ATPases by glyceollin. *Phytopathology* 78:1000-1003.
- Goldmann, A., C. Boivin, C., V. Fleury, B. Message, L. Lecoeur, M. Maille, and D. Tepfer. 1991. Betaine use by rhizosphere bacteria: genes essential for trigonelline, stachydrine, and carnitine catabolism in *Rhizobium meliloti* are located on pSym in the symbiotic region. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4:571-578.
- Göttfert, M., D. Holzäuser, D. Bani, and H. Hennecke, 1992. Structural and functional analysis of two different *nodD* genes in *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5:257-265.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol.*

Biol. 166:557.

Göttfert, M., P. Grob, and H. Hennecke. 1990. Proposed regulatory pathway encoded by the *nodV* and *nodW* genes, determinants of host specificity in *Bradyrhizobium japonicum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2680-2684.

Hartwig, U.A., C.M. Joseph, and D.A. Phillips. 1991. Flavonoids released naturally from alfalfa seeds enhance the growth rate of *Rhizobium meliloti*. Plant Physiol 95: 797-803.

Hubac, C.J., Ferran, D. Guerrier, A. Trémolières, and A. Kondorosi. 1993. Luteolin absorption in *Rhizobium meliloti* wild-type and mutant strains. J. Gen. Microbiol 139:1571-1578.

Hubac, C.J., Ferran, A. Trémolières, and A. Kondorosi. 1994. Luteolin uptake by *Rhizobium meliloti*: evidence for several steps including an active extrusion process. Microbiol. 140:2769-2774.

Hungria, M., Joseph, C.M., and D.A. Phillips. 1991a. Anthocyanidins and flavonols, major *nod* gene inducers from seeds of a black-seeded common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Physiol. 97:751-758.

Hungria, M., Joseph, C.M., and D.A. Phillips. 1991b. *Rhizobium nod* gene inducers exuded naturally from roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Physiol. 97:759-764.

Hungria, M., Johnston, A.W.B., and D.A. Phillips. 1992. Effects of flavonoids released naturally from bean (*Phaseolus vulgaris*) on *nodD* regulated gene transcription in *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli. Mol. Plant-Microbe Interact. 5:199-203.

Johnston, A.W.B., J.E. Burn, A. Economou, E.O. Davis, F.K.L. Hawkins, and M.J. Bibb. 1988. Genetic factors affecting host-range in *Rhizobium leguminosarum*. In Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, R. Palacios and D.P.S. Verma, eds (St Paul; APS Press), pp. 378-384.

Jones, T.W., E. P.E. Macdonald, S.D. Jones, and C.E. Pankhurst. 1987. Peptidoglycan-bound polysaccharide associated with resistance of *Rhizobium loti* strain NZP2037 to *Lotus pedunculatus* root flavolan. J. Gen. Microbiol. 133:2617-2629.

Kape, R., M. Parniske, and D. Wener. 1991. Chemotaxis and *nod* gene activity of *Bradyrhizobium japonicum* in response to hydroxycinnamic acids and isoflavonoids. Appl. Environ. Microbiol. 57:316-319.

Kape, R., M. Parniske, S. Brandt, and D. Wener. 1992. Isoliquiritigenin, a strong *nod* gene- and glyceollin resistance-inducing flavonoid from soybean root exudate. Appl. Environ. Microbiol. 58: 1705-1710.

- Karr, D.B., D. W. Emerich, and A.L. Karr. 1992. Accumulation of the phytoalexin, glyceolin, in root nodules of soybean formed by effective and ineffective strains of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Chem. Ecol.* 18:997-1008.
- Kovács, L.G., P. Balatti, H. B. Krishnan, and S.G. Pueppke. 1995. Transcriptional organization and expression of *noXWBTUV*, a locus that regulates cultivar-specific nodulation of soybean by *Rhizobium fredii* USDA257. *Mol. Microbiol.* 17:923-933.
- Kurosaki, F., I. Sakurai, and A. Nishi. 1984. Development of tolerance to the phytoalexin 6-methoxymellein in microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 30:43-52.
- Lerouge, P., P. Roche, C. Faucher, F. Maillat, G. Truchet, J.C. Promé, and J. Denarié. 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 344:781-784.
- Long, S.R. 1989. *Rhizobium*-Legume nodulation: Life together in the underground. *Cell* 56:203-214.
- Manlatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Messing, J. 1983. New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.* 101:20-23.
- Martínez, E., R. Palacios, and F. Sánchez. 1987. Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. *J. Bacteriol.* 169:2828-2834.
- Miller, J.H. 1972. *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Murphy, P.J., N. Heycke, Z. Banfalvi, M.E. Tate, F. de Bruijn, A. Kondorosí, J. Tempé, and J. Schell. 1987. Genes for catabolism and synthesis of an opine-like compound in *Rhizobium meliloti* are closely linked on the Sym plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:493-497.
- Noel, K.D. 1992. Rhizobial polysaccharides required in symbiosis with legumes, p. 341-357. In D.P.S. Verma (ed.), *Molecular signals in plant-microbe communications*. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Noel, K.D., R.J. Diebold, J.R. Cava, and B.A. Brink. 1988. Rhizobial purine and pyrimidine auxotrophs: nutrient supplementation, genetic analysis, and the symbiotic requirement for de-novo purine biosynthesis. *Arch. Microbiol.* 149:499-506.
- Noel, K.D. and H. Tao. 1992. Lipopolysaccharide antigenic change induced by bean exudate. 6th International Symposium on Molecular Plant-Microbe Interactions. Abstracts. Seattle, USA.

- Pankhurst, C.E., and D.R. Biggs. 1980. Sensivity of *Rhizobium* to selected isoflavonoids. *Can. J. Microbiol.* 26:542-545.
- Pankhurst, C.E., and W.T. Jones. 1979. Effectiveness of *Lotus* root nodules. II. Relationship between root nodule effectiveness and "in vitro" sensivity of fast-growing *Lotus* rhizobia to flavolans. *J. Exp. Bot.* 30:1095-1107.
- Parniske, M., Ahlborn, B., and D. Werner. 1991. Isoflavonoid-inducible resistance to the phytoalexin glyceollin in soybean rhizobia. *J. Bacteriol.* 173:3432-3439.
- Perret, X., R. Fellay, A.T. Bjourson, J.E. Copper, S. Brenner, and W.J. Broughton. 1994. Subtraction hybridization and shot-gun sequencing: a new approach to identify symbiotic loci. *Nucl. Acids Res.* 22: 1335-1341.
- Peters, N.K., and D.P.S. Verma. 1990. Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3: 4-8.
- Phillips, D.A., C.M. Joseph, and C.A. Maxwell. 1992. Trigonelline and stachydrine released from alfalfa seeds activate NodD₂ protein in *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* 99:1526-1531.
- Poole, K., K. Kresbes, C. McNally, and S. Neshat. 1993. Multiple antibiotic resistant in *Pseudomonas aeruginosa*: Evidence for involvement of an efflux operon. *J. Bacteriol.* 175:7363-7372.
- Pooyan, S., M.L.C. George, and D. Borthakur. 1994. Characterization of a *Rhizobium etli* chromosomal gene required for nodule development on *Phaseolus vulgaris* L. *World J. Microbiol.* 10:583-589.
- Priefer, U.B. 1989. Genes involved in lipopolysaccharide production and symbiosis are clustered on the chromosome of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae VF39. *J. Bacteriol.* 171:6161-6168.
- Prinsen, E., N. Chauvaux, J. Schmidt, M. John, U. Wieneke, J.D. Greef, J. Schell and, H. Van Onckelen. 1991. Stimulation of indole-3-acetic acid production in *Rhizobium* by flavonoids. *FEBS* 282:53-55.
- Pueppke, S.G. 1996. The genetic and biochemical basis for nodulation of legumes by rhizobia. *Critical Rev. Biotechnol.* En prensa.
- Puvanesarajah, V., F.M. Schell, D. Gerhold, and G. Stacey. 1987. Cell surface polisaccharides from *Bradyrhizobium japonicum* and a nonnodulating mutant. *J. Bacteriol.* 169:137-141.
- Quinto, C., H. de la Vega, M. Flores, Fernández, L., Ballado, T., Soberón, G. and R. Palacios. 1982. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli*. *Nature (London)* 299:724-728.

Rao, J.R., and J. E. Cooper. 1994. Rhizobia catabolize nod gene-inducing flavonoids via C-ring fission mechanisms. *J. Bacteriol.* 176:5409-5413.

Rao, J.R., N.D. Sharma, J.T.G. Hamilton, D.R. Boyd, and J.E. Cooper. 1991. Biotransformation of the pentahydroxyflavone quercetin by *Rhizobium loti* and *Bradyrhizobium* strains (*Lotus*). *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1563-1565.

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

Redmond, J.W., M. Battley, M.A. Djordjevic, R.W. Innes, P.L. Kuempel, and B.G. Rolfe. 1986. Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*. *Nature* 323: 632-635.

Rostas, K, E. Kondorosi, B. Horvath, A. simoncsits, and A. Kondorosi. 1986. Conservation of extended promoter regions of nodulation genes in *Rhizobium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:1757-1761.

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

Sanger, F., S. Nicklen, & A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.

Saier, M.H., R. Tam, A. Reizer, and J. Reizer. 1994. Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol. Microbiol.* 11:841-847.

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

Schmidt, P.E., M. Parniske, and D. Werner. 1992. Production of the phytoalexin glyceolin I by soybean roots in response to symbiotic and pathogenic infection. *Bot. Acta* 105:18-25.

Segovia, L., J.P.W. Young, and E. Martínez-Romero. 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium elli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:374-377.

Shine, J, and L. Delgarno. 1975. Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes. *Nature* 254:34.

- Simon, R. 1984. High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the *in vitro*, constructed *Tn5*-mob transposon. *Mol. Gen. Genet.* 196:413-420.
- Simon, R., J. Quandt, & W. Klipp. 1989. New derivatives of transposon *Tn5* suitable for mobilization of replicons, generation of operon fusions and induction of genes in Gram-negative bacteria. *Gene* 80:161-169.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503.
- Spaank, H.P., R.J.H. Okker, C.A. Wijffelman, E. Pees, and B.J.J. Lugtenberg. 1987. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* sym plasmid pRL1J1. *Plant Mol. Biol.* 9:29-37.
- Spaank, H.P., Aarts, A., Stacey, G., Bloemberg, G.V., Lugtemberg, B.J.J., and Kennedy, E.P. 1992. Detection and separation of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* nod metabolites using thin-layer chromatography. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5:72-80.
- Stacey, G., S. Luka, J. Sanjuan, Z. Banfalvi, A.J. Nieuwkoop, J.Y. Chun, L.S. Forsberg, and R. Carson. 1994. *nodZ*, a unique host-specific nodulation gene, is involved in the fucosylation of the lipopolysaccharide nodulation signal of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol* 176: 620-633.
- Staelin C, J. Granado, J. Muller, A. Wiemken, R.B. Meilor, G. Felix, M. Regenass, W.J. Broughton, and T. Boller. 1994. Perception of *Rhizobium* nodulation factors by tomato cells and inactivation by root chitinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:2196-2200.
- Stossel, P. 1983. In vitro effects of glyceollin on *Phytophthora megasperma* f. sp. glycinea. *Phytopathology* 73:1603-1607.
- Swain, T. 1977. Secondary compounds as protective agents. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28:479-501.
- Tepfer, D., A. Goldmann, N. Pamboukdjian, M. Maille, A. Lepin-gle, D. Chevalier, J. Denarié, and C. Rosemberg. 1988. A plasmid of *Rhizobium meliloti* 41 encodes catabolisme of two compounds from root exudate of *Calystegia sepium*. *J. Bacteriol.* 170:1153-1161.
- Vasse J. F. de Billy, and G. Truchet. 1993. Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction. *Plant J.* 4:555-566.
- Vázquez, M., Dávalos, A., de las Peñas, A., Sánchez, F., and C. Quinto. 1991. Novel organization of the common nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli strains. *J. Bacteriol.* 173:1250-1258.

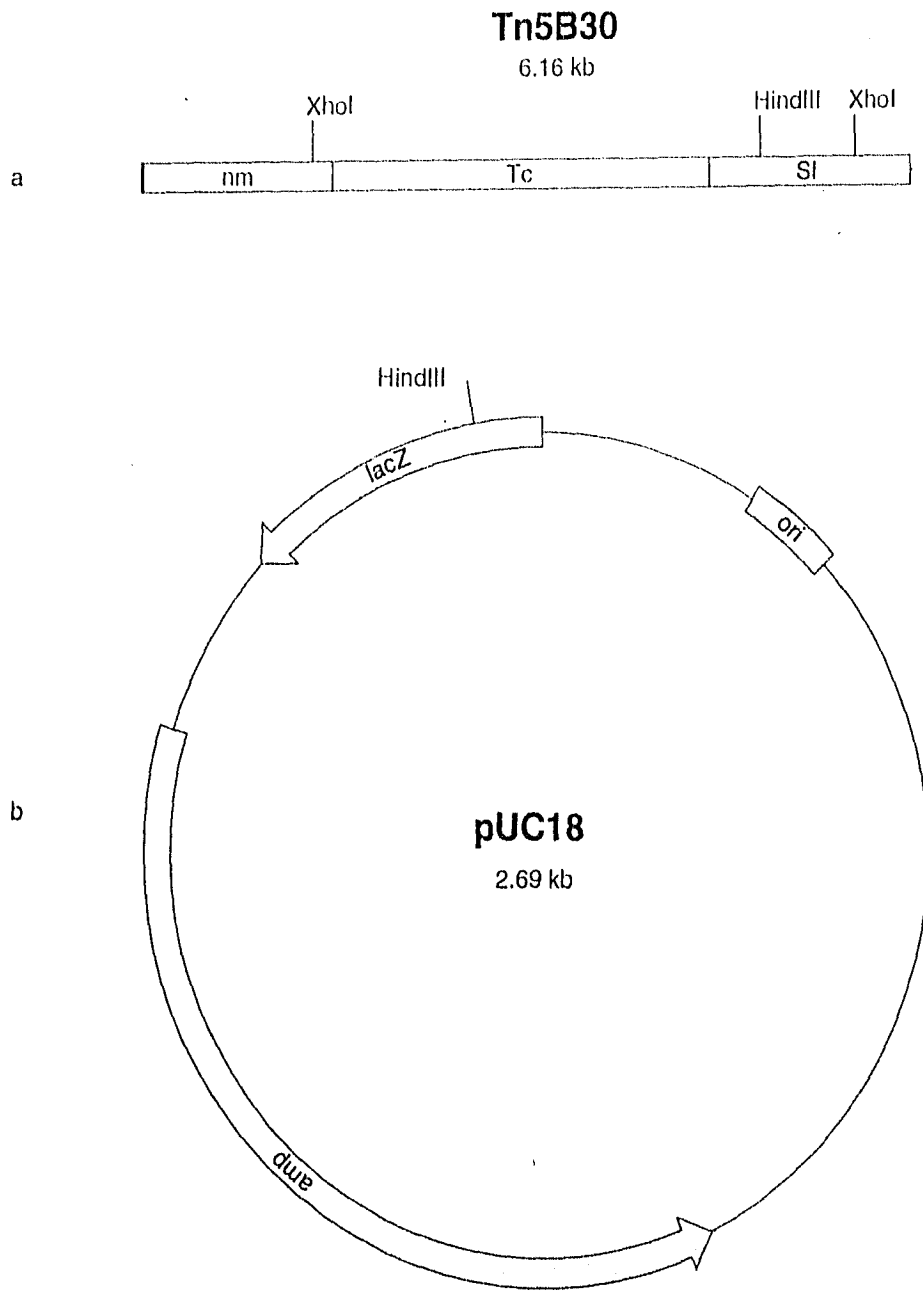


Fig. 1. Mapa estructural y físico de a) Transposón *Tn5B30* (Simon, *et al.*, 1989) y del vector de clonación pUC18 (Messing, 1983). Abreviaturas: amp, resistencia a ampicilina; kb, kilobase(s); lacZ, gen de β -galactosidasa; nm, resistencia a neomicina; ori, origen de replicación; SI, secuencia de inserción; Tc, resistencia a tetraciclina.

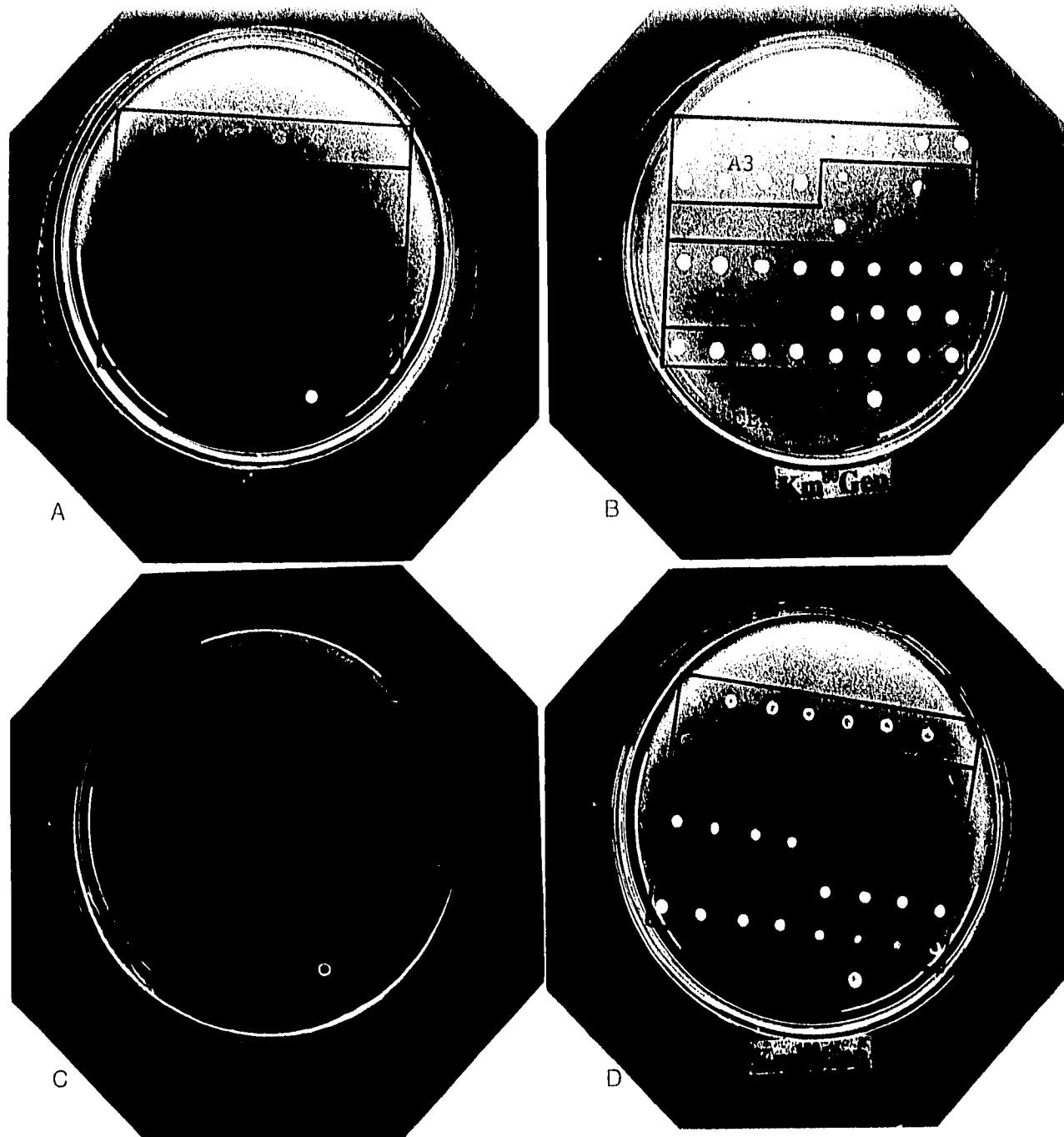


Fig. 2. Fotografías del crecimiento de las cepas con inserción del *Tn5B30* (CFNA3, CFNA31, CFNB3 y CFNB18) con secuencias inducibles por flavonoides. Las cajas contienen PY/2 con: A) Km^{R0} ; B) Km^{R0} y genisteína; C) Km^{100} y D) Km^{100} y genisteína. Se incluyeron como control: CE3, cepa silvestre: SP, CE3 Km^{R1} . Abrevialuras: Gen, genisteína; Km, kanamicina.

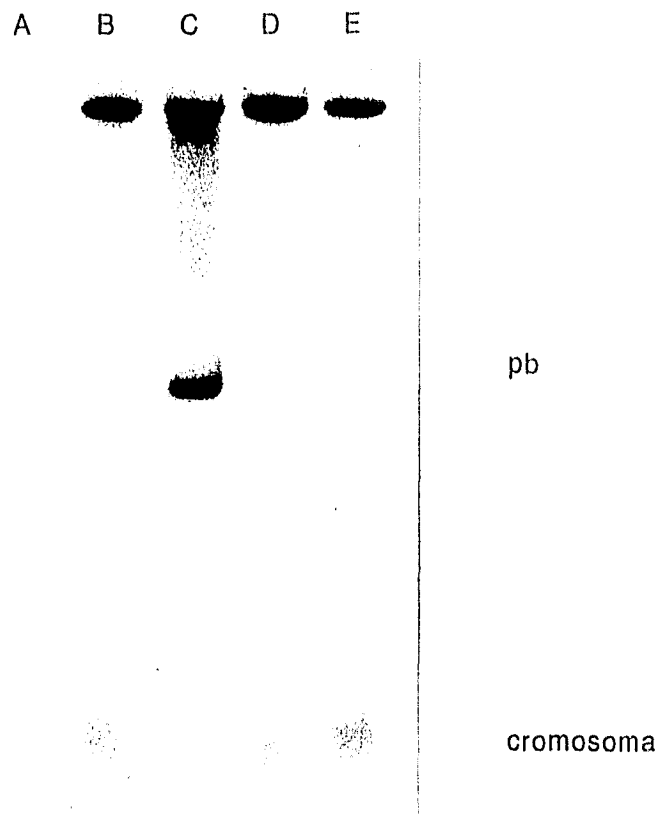


Fig. 3. Localización del transposón *Tn5B30* en el genoma de las cepas mutantes. Los plásmidos fueron separados en geles de agarosa según el procedimiento Eckhardt y fueron transferidos a membranas de nylon e hibridados por el método de Southern con ^{32}P -*Tn5*. Carriles: A, CFN42 (cepa silvestre); B, CFNA3; C, CFNA31; D, CFNB3 y E, CFNB18.

A B C



Fig. 4. Localización del transposón *Tn5B30* en la cepa mutante A31. El ADN genómico de CFN42 (cepa silvestre), CFNX182 (CFN42 pa⁻) y CFNX183 (CFN42 pb⁻) fue digerido con la enzima HindIII. Los fragmentos resultantes fueron separados en un gel agarosa. Luego el ADN fue transferido a una membrana de nylon e hibridado con el fragmento HindIII que contiene la secuencia inducible por exudado de la cepa A31 como sonda. Carriles: A, ADN genómico de CFN42/HindIII; B, ADN genómico de CFNX182/HindIII y C, ADN genómico de CFNX183/HindIII.

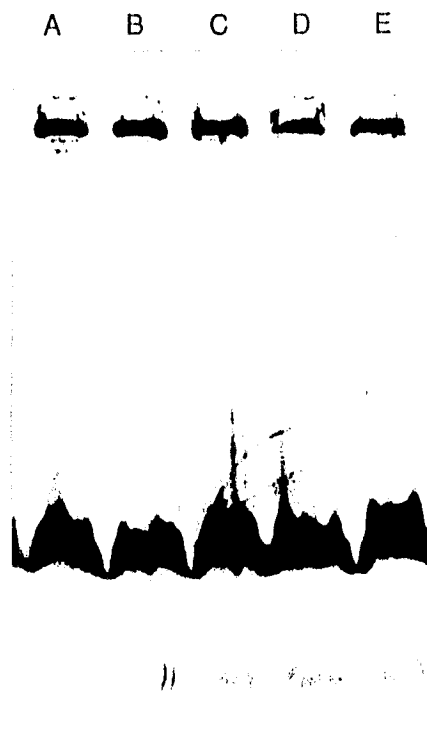


Fig. 5. Perfil de LPS en geles de SDS-poliacrilamida de las mutantes con *Tn5B30*. Carriles: A, CFNB18; B, CFNB3; C, CFNA31; D, CFNA3; E, CFN42.

Símbolo Cepa

- CFNA3
- ▽ CFNA31
- CFNB3
- △ CFNB18
- ◇ CFN42

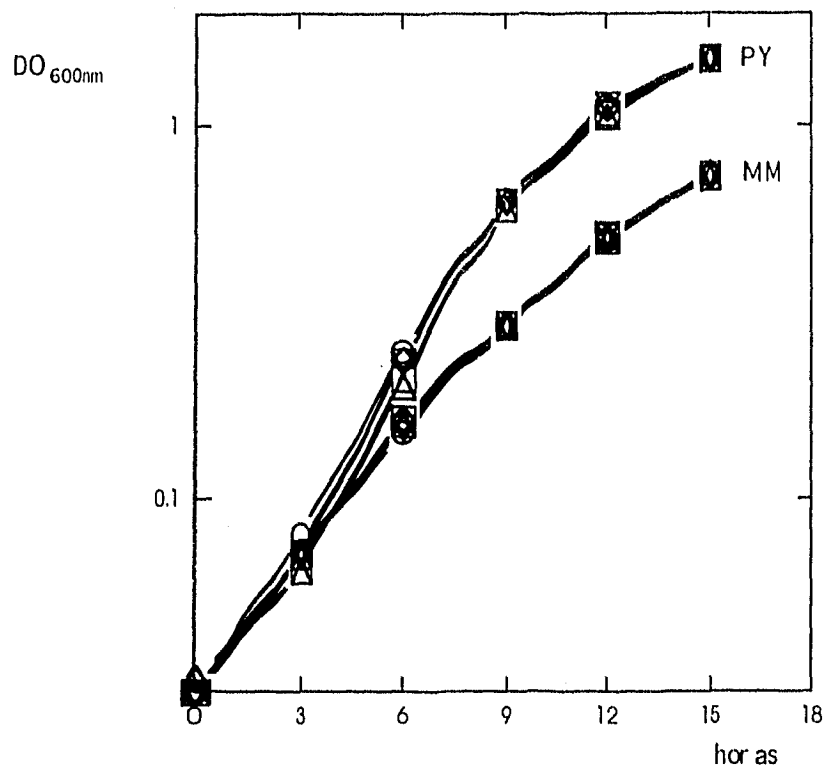


Fig. 6. Curvas de crecimiento en medio mínimo (MM) y PY. Cultivos saturados en PY se diluyeron 1000 veces en 25 ml de MM o PY. Se incubaron con agitación (200 rpm) a 30°C. Se extrajo una muestra de 1 ml y se midió su densidad óptica (DO) a 600 nm cada 3 hs. Los símbolos y sus correspondientes cepas se indican en la parte superior del gráfico.

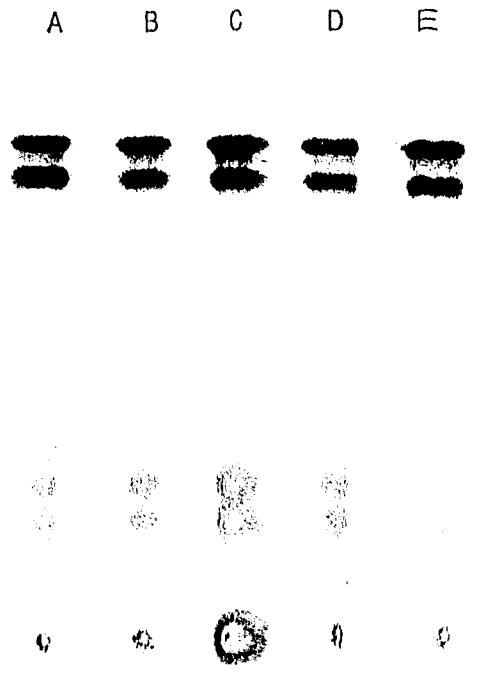


Fig. 7. Perfil del factor de nodulación producido por CFN42 y las mutantes con *Tn5B30*. Las bacterias fueron incubadas con genisteína como inductor y marcadas con ^{14}C -glucosamina. Carriles: A, CFN42; B, CFNA3; C, CFNA31; D, CFNB3; E, CFNB18.

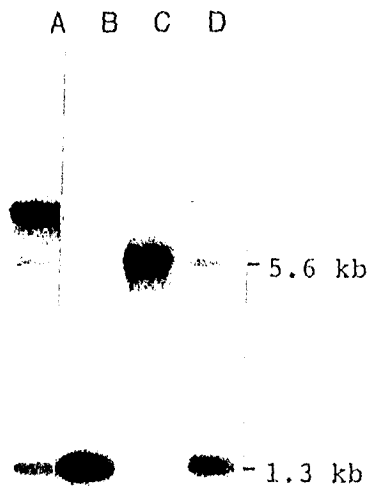


Fig. 8. Identificación de los fragmentos silvestres de la mutante CFNA31. El ADN plasmídico del pCos126 (Cava *et al.*, 1989) digerido con EcoRI, ADN de los fragmentos EcoRI de 1.3 y 5.6 kb aislados provenientes del pCos126 y el ADN genómico de CFN42 digerido con EcoRI fueron separados en un gel de 1% de agarosa. Luego, el ADN fue transferido a una membrana de nylon e hibridado con el fragmento HindIII que contiene secuencias inducibles por exudado de la mutante CFNA31 como sonda. Carriles: A, pCos126 EcoRI; B, fragmento 1.3 kb EcoRI; C, fragmento 5.6 kb EcoRI; D, ADN genómico de CFN42 EcoRI.

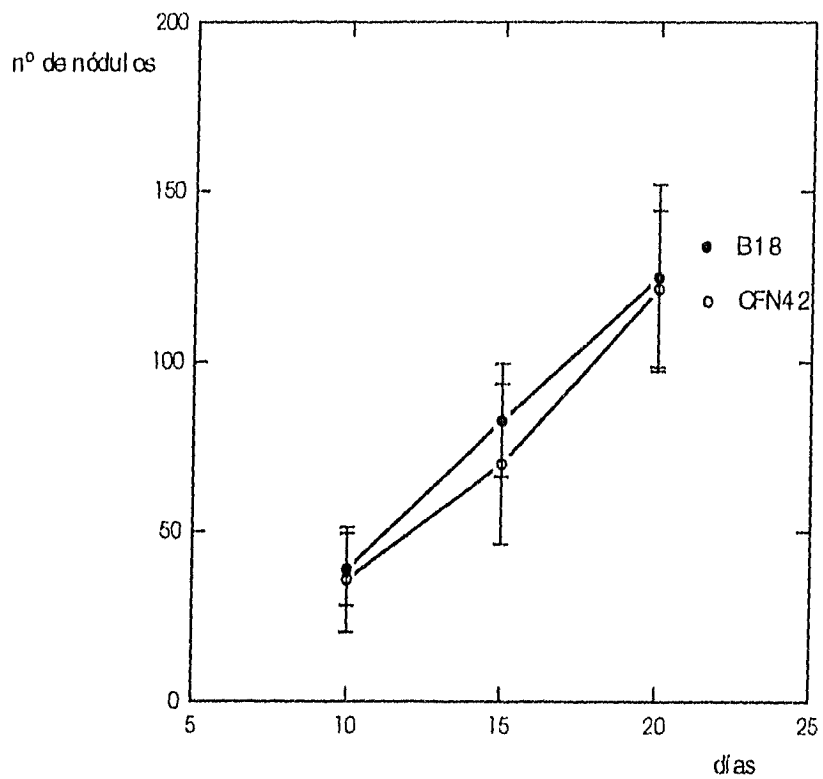


Fig. 8. Cinética de nodulación de CFN42 y la cepa mutante CFNB18. Las plantas de frijol (cv N-8-116) fueron crecidas en matraces con vermiculita y regados con solución Fahraeus. Se determinó el número de nódulos de 5 plantas a los 10, 15 y 20 días post-inoculación. Se calculó la desviación estándar que se indica con una barra. El símbolo y la correspondiente cepa se indica en la figura.

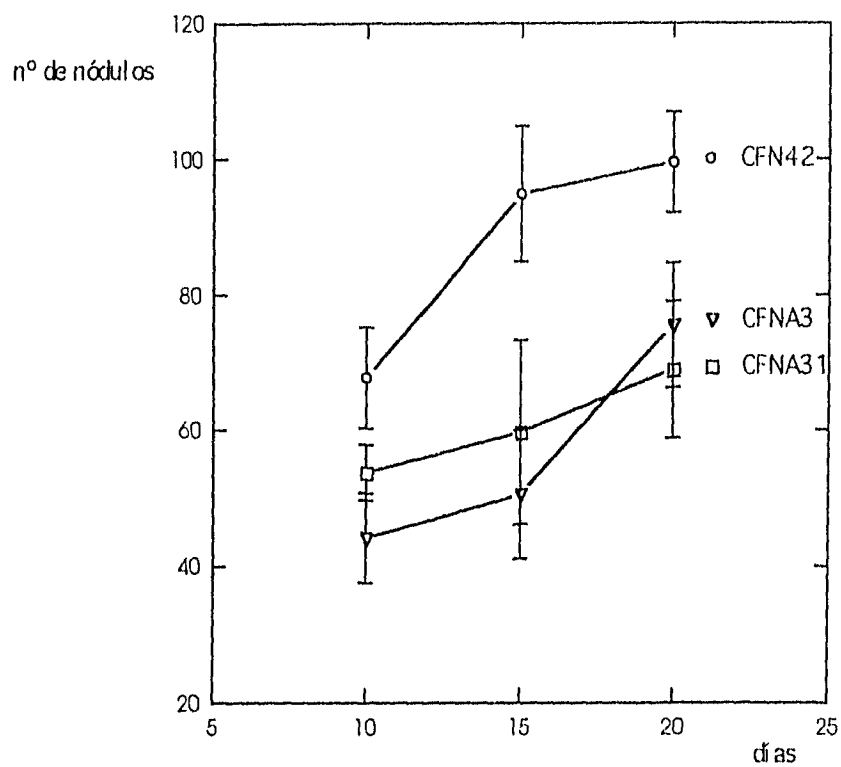


Fig. 10. Cinética de nodulación de CFN42 y las cepas mutantes CFNA3 y CFNA31. Las plantas de frijol (cv N-8-116) fueron crecidas en matraces con vermiculita y regados con solución Fahraeus. Se determinó el número de nódulos de 5 plantas a los 10, 15 y 20 días post-inoculación. Se calculó la desviación estándar que se indica con una barra. El símbolo y la correspondiente cepa se indica en la figura.

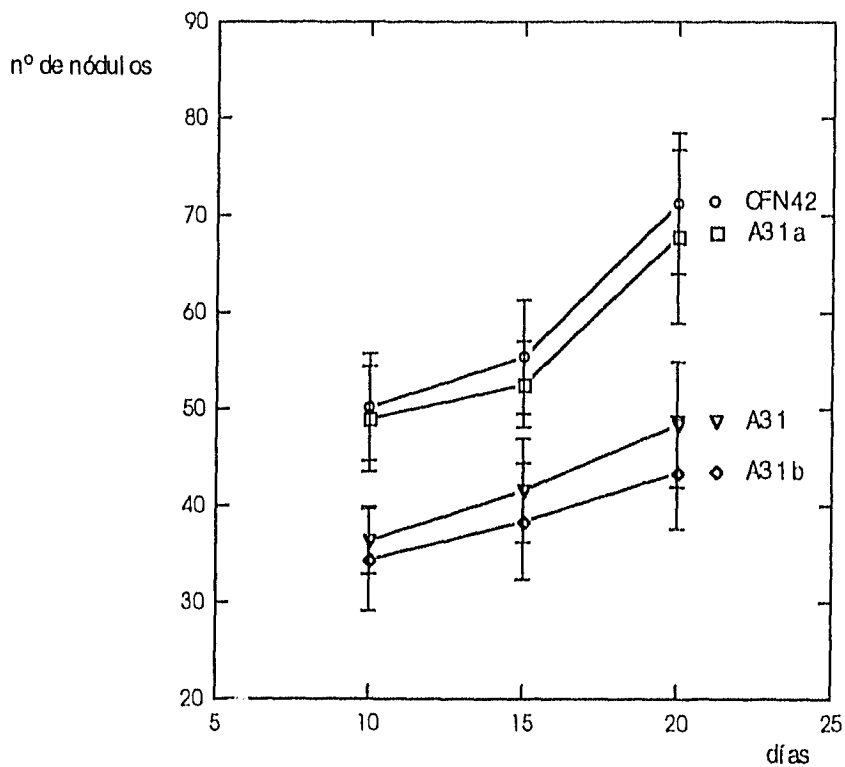


Fig. 11. Cinética de nodulación de CFN42, CFNA31, CFNA31a y CFNA31b. Las plantas de frijol (cv N-8-116) fueron crecidas en matraces con vermiculita y regados con solución Fahraeus. Se determinó el número de nódulos de 5 plantas a los 10, 15 y 20 días post-inoculación. Se calculó la desviación estándar que se indica con una barra. El símbolo y la correspondiente cepa se indica en la figura.

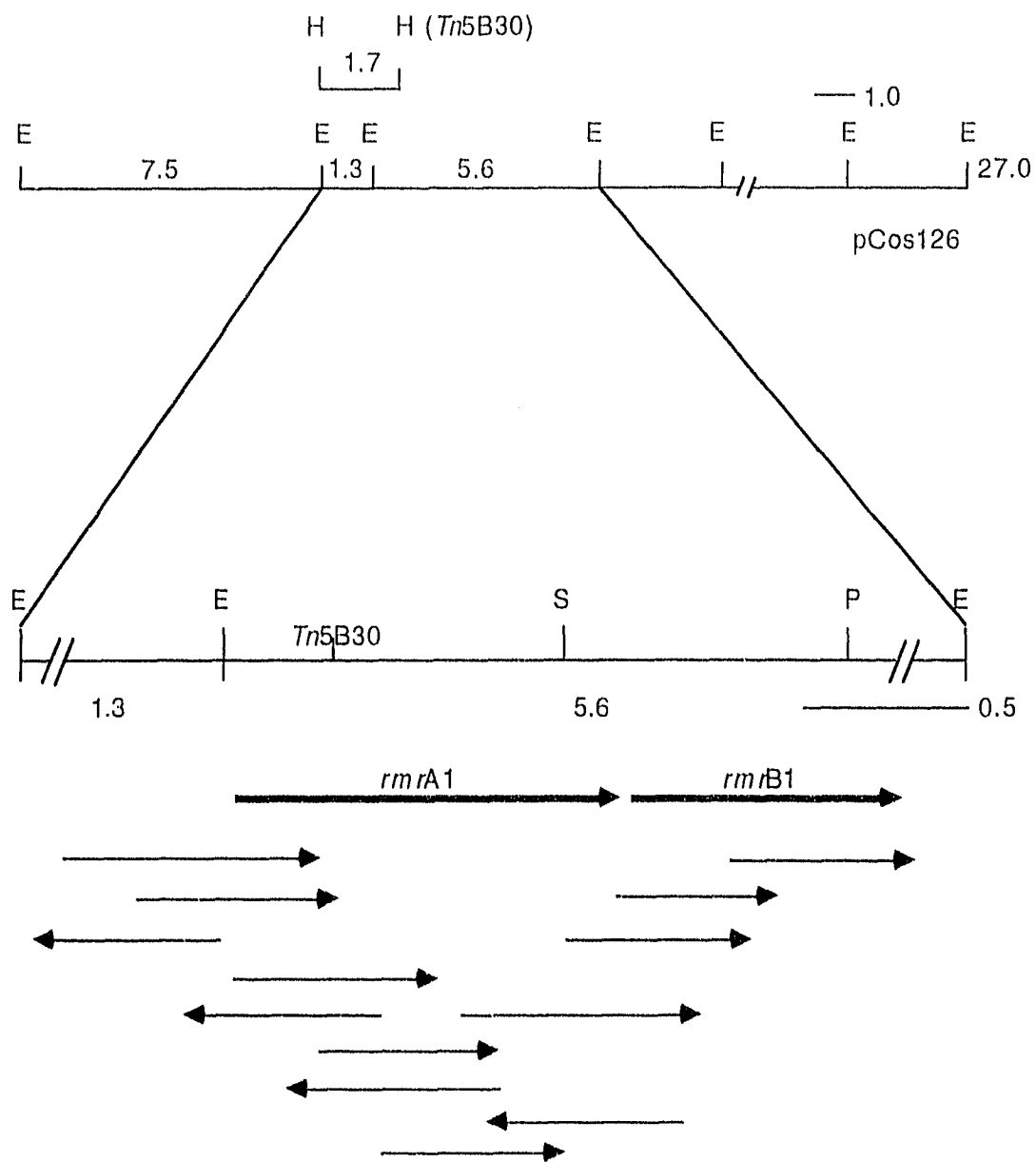


Fig. 12. Estrategia de secuenciación del gen *rmrA1*. Los fragmentos EcoRI de 1.3 y 5.6 kb provenientes de pCos126 (Cava *et al.*, 1989) fueron clonados en pUC18. La secuencia codificadora propuesta del gen *rmrA1* se representa con una flecha en negrita. Las flechas más pequeñas indican la extensión y orientación de las secuencias obtenidas.

secuencia -35 -10
 consenso TTGACA 17pb TATATT

1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
 CAAATTCTCGTTGACATCTTTTTTTAAAGCATATTTTGGAAAACATCAAGTTTCCTAAA
 GTGTATTCCACCTGAATTCAAAGGCCCGCCGGTGGCGACAGCGACCACTCCAAGGAGA

61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ SD +
 GAGACAAATGTCATCAAAACGTTGCAGGCTCTGAACAACAACGCACCTGCCCCGGAACC

121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
 M S I K T L Q A L N N N A P A P E T
 ACGGCTGAAGCCGCGCCGCAACCTCGATGCCGCGCCGCTCCGCGCATCGTCTGAAGCT

181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
 T A E A A P A T L D A G A A P R I V E A
 GCCCGGAGCCGGCGCTGTCGCTCGCAAGCGCGCGCCGCGCAGATTCTGCTTGTGCA

241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
 A A E P A P V A R K R G G R R F L L A A
 ACGGCCATCGTTTGATCGCCGGGGCTGCTTATTATGGGCACAACACTACGGACTATCGGC

301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
 T A I V L I A G A A Y Y G H N Y W T I G
 CGCTTCGAGATCTCTACCGACGATGCCTATGTGAAGGCTGACAACACCACCGTCCGACCC

361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
 R F E I S T D D A Y V K A D N T T V A P
 AAGGTTTCGGGTATATCGCGGAAGTGCTCGTCGGCGATAACCAGGTTGTCAAGGCCGGC

421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
 ----▲ Tn5B30-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 K V S G Y I A E V L V G D N Q V V K A G
 CAGCCGCTTGCCCGCATCGACGATCGTGATTTCGCGCCGCCCTCGATCAGGCCAAGGCC

481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
 Q P L A R I D D R D F R A A L D Q A K A
 GATGTCGACAGGCGGAGGCGACGCTCAACGCCAAGCAGGCCCTCGCTCGACATTCAGCAG

541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
 D V A E A E A T L N A K Q A S L D I Q Q
 TCGACGATTGCCCGCCGCGCGCCACGTTCTGAAGTCGACAAGGCCAATGAGACCTTTGCC

601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
 S T I A A A R A T F E V D K A N E T F A
 GAACAAAACAACAAGCGTATGCCAATCTCGCGACCAATGGCTATGCGCCGGTCCAGACT

661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
 E Q N N K R Y A N L A T N G Y A P V Q T
 GCGCAGCAGGCGGCTTCCGCCATCGCCGACGCCAGCCGACGATCGTTTCGCGACAATGCC

721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
 A Q Q A A S A I A A A Q A T I V R D N A
 GCCCTCGATGCCCGCGTCAAGCAAGTCGATCTCCTCAATGCCGAACTTGCCCGGCAAG

781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
 A L D A A V K Q V D L L N A E L A Q A K
 GCGACGCTTGCCCATGATCAGGCCGTCAGCGTCAAGCGGAACTGAACCTCTCTTTATG

841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
 A T L A H D Q A V Q R Q A E L N P L F M
 CGACCCATCACTGCGCCGGTTTCGACGGGACCCATCGGCAACAGGGCTCTGCGTGTCCGGC

901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
 R P I T A P V R T G P I G N R A L R V G
 CAGTATGTCCAAGCCGGCACCCAGCTGATGTCCGGTCTGCGACCAGCGCGGTTTACGTG

961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
 Q Y V Q A G T Q L N S V V P T S A V Y V
 ATCGCCAACATAAAGAGACGACGCTCACGGATGTTCGCGCCGGCCAGCCAGTGGATATC

1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
 I A N Y K E T Q L T D V R A G Q P V D I
 GAGCCGCTTAGCTTACCCGCGCTCGAACCCTATCTGTGCGCAATGTCGACAGGCTTGGCTCCCGCA

1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
 E V D T Y P G R T Y R G H V D S L A P A

continúa


```

AGTGGGCAGGAGTTCGCGCTGCTGCC'FCCCGATAATGCGACCCGGCAATTTTACCAAGGTC
1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
S G Q E F A L L P P D N A T G N F T K V
GTGCAGCGCA'ATCCCGTCAAGATCGTCTGGATGGCGAGGCCGCCAATGGCGATCTGCGT
1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260
V Q R I P V K I V L D G E A A N G D L R
CCCGGCATG'FCCGTCCAGCCGAGCATCGACACCAAGGCCGATGCCGACCGTAAGTAGAGG
1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320
P G M S V Q P S I D T K A D A D R K *
CGGGGATCAGGAGATCGTGTCATGTCCACTATCGCAGCAACAGCGGTGCCATTGCGCAA
1321 ----- SD -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380
M S T I A A T A V A I A Q
CCCGCGGCCAGCACAAAGGGATTGGATCGCCGTCTTGGCCGGCATGATCGGGCCCTTCATG
1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
P R A S T R D W I A V L A G M I G A F M
GCGATCCTCAACATCCAGAGCACCAATGCC'FCCCTTCTCGACATCGAGGGTGGAATCGGA
1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500
A I L N I Q S T N A S L L D I E G G I G
ACAGGCGTCGACAACGGCGCCTGGATCTCTACCTCCTACCTAATCGGCGAGATCGTCGTC
1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1560
T G V D N G A W I S T S Y L I G E I V V
ATTCCGCTGACGGCC'ATTTCAGCAGCGTCT'CTCGTTTCGCCGCTATATCCTCGTCAAC
1561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1620
I P L T A Y F S S V F S F R R Y I L V N
TCCATCCTCT'FCCCGCTCTTTTCGATGGCCTGGCCTTTGGGCAGGATCTCGGCACAATG
1621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1680
S I L F P L F S M A C A F G Q D L G T M
ATCCTGCTGCGCGGCTTCAGGGN'FTTTGGCGCGGTGTGCTGATCCCGATGGCT'FCACCA
1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1740
I L L R G F R X F G G G V L I P M A S P
TGGAGACTGACCAAGCTGCCGAAGAGCCAGCAGCCTCTCGGTCTTGGCATCTTTGCCCTT
1741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1800
W R L T K L P K S Q Q P L G L A I F A L
TCGGTCACCTTCGCCCCCGCGATCGGTCCGACGATCGGCGGGTATCTTACGGAGAACTAC
1801 ----- * G X h h G P X I G G -----+-----+-----+ 1860
S V T F A P A I G P T I G G Y L T E N Y
GGCTGGCAGACGATCTTNTCATCAATACGGNCCCAGCCTCATCATGGCGGACGCTCTC
1861 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1920
G W Q T I F X I N T X P S L I M A D A L
GCTCTGACGCTGGACAAACAGCCGATGCAGCTTCACCTTGAAGAAGGGGACTGGGCC
1921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1980
A L T L D K Q P M Q L H L L K E G D W A
GGCATCATCACCATGGCGATCGGTCTTTCGNGCTGCAGACCGTGTGGAAGAGGGTAAC
1981 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2040
G I I T M A I G L S X L Q T V L E E G N
AAGGACGACTGGTTCTCCTCGCCCTTCATTGTCAAGCTC
2041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2079
K D D W F S S P F I V K L

```

Fig. 13. Secuencia nucleotídica de los genes *rmrA1B1*. Debajo de la secuencia de bases se muestra la secuencia de aminoácidos deducida. Los codones de iniciación y terminación se muestran en negrita (**ATG** y **TAG** respectivamente). Las probables secuencias de unión a ribosomas (SD) se muestran subrayadas. Secuencias promotoras semejantes a los dominios -10 y -35 de α^{70} se señalan en el extremo 5'. La secuencia consenso de la familia de translocasas de membrana se señala con * (h, aminoácido hidrofóbico).

```

Gap Weight: 3.000      Average Match: 0.540
Length Weight: 0.100  Average Mismatch: -0.396

Quality: 215.1      Length: 439
Ratio: 0.552      Gaps: 9
Percent Similarity: 52.011  Percent Identity: 33.908

RmrA1 1 MSIKTLQALNNAPAPETTAEAAPATLDAGAAPRIVEAAAEPAPVARKRG 50
EmrA 1 .....MSANAETQ.....TPQQPVKKSQ 18
      51 GRRFLLAATAIVLIAGAAYYGHNYWTIGRFEISTDDAYVKADNTTVAPKV 100
      |: || .:::| |. .| :: : | .||| || :. : .|
      19 KRKRLLLLTLFLFIIAIVAIGIYWFLVLRHFEETDDAYVAGNQMQIMSQV 68
      101 SGYIAEVLVGDNQVVKAGQPLARIDDRDFRAALDQAKADVAEA.EATLNA 149
      || :. :| :. :. :| |. :| . | |. :. :| |. :. :| . . |
      69 SGSVTKVWADNTDFVKEGDVLTLDPTDARQAFKAKTALASSVRQTHQL 118
      150 KQASLDIQQS'TIAAARATFEVDKANETFAEQNNKRYANLATNGYAPVQTA 199
      . .| :| :| |. :| |. . . | : : . | . | :. :. : . :
      119 MINSKQLQ.....ANIEVQKIALAQAQSDYNRRVPLGNANLIGREEL 160
      200 QQAASAIAAAQATIIVRDNAALDAAVKQVDLLNAELAQAKATLAHDQAVQR 249
      |:| .| :. :| | .|||. :| : .| |. :. :| |.
      161 QHARDAVTSAQ.....AQLDVAIQQYNANQAMILGTK..LEDQPAVQQ 201
      250 QA.ELNPLFM...RPITAPVRTGPIGNRALRVGQYVQAGTQLMSVVPTSA 295
      .| |: . : : | . . . .| | :. :| |. : : . :| |. | | | . .
      202 AATEVRNAWLALERTRII SPMTGYVSRRAVQPGAQISPTTPLMAVVPATN 251
      296 VYVIANYKETQLTDVVRAGQPV DIEVD TYPGR. TYRGHVDSLAPASGQEFA 344
      ::| | | :| | | :. :| | | | . . | . : . | | . : . | . |
      252 MWVDANFKETQIANMRIGQPV'TITTDIYGDV KYTGKVVGLDMGTGSAFS 301
      345 LLPPDNATGNFTKVVQRI PVKIVLDGEEAANG. DLRPGMSVQPSIDTKADA 393
      | | : : | | | | :. :| | | | :| | | . . . . | | | : . :| :. :
      302 LLPAQNATGNWIKVVQRLPVRIELDQKQLEQYPLRIGLSTLVSVNTTNRD 351
      394 DRK*..... 397
      :.
      352 GQVLANKVRSTPVAVSTAREISLAPVNKLIDDIVKANAG 390

```

Fig. 14. Alineamiento entre la secuencia de EmrA de *E. coli* y RmrA1 de *R. etli*. Se realizó con el programa GAP (GCG) que utiliza el algoritmo de Needleman and Wunsch. Símbolos: "|", residuos idénticos; ":", comparación con valores ≥ 0.5 ; ".", comparación con valores ≥ 0.1 .

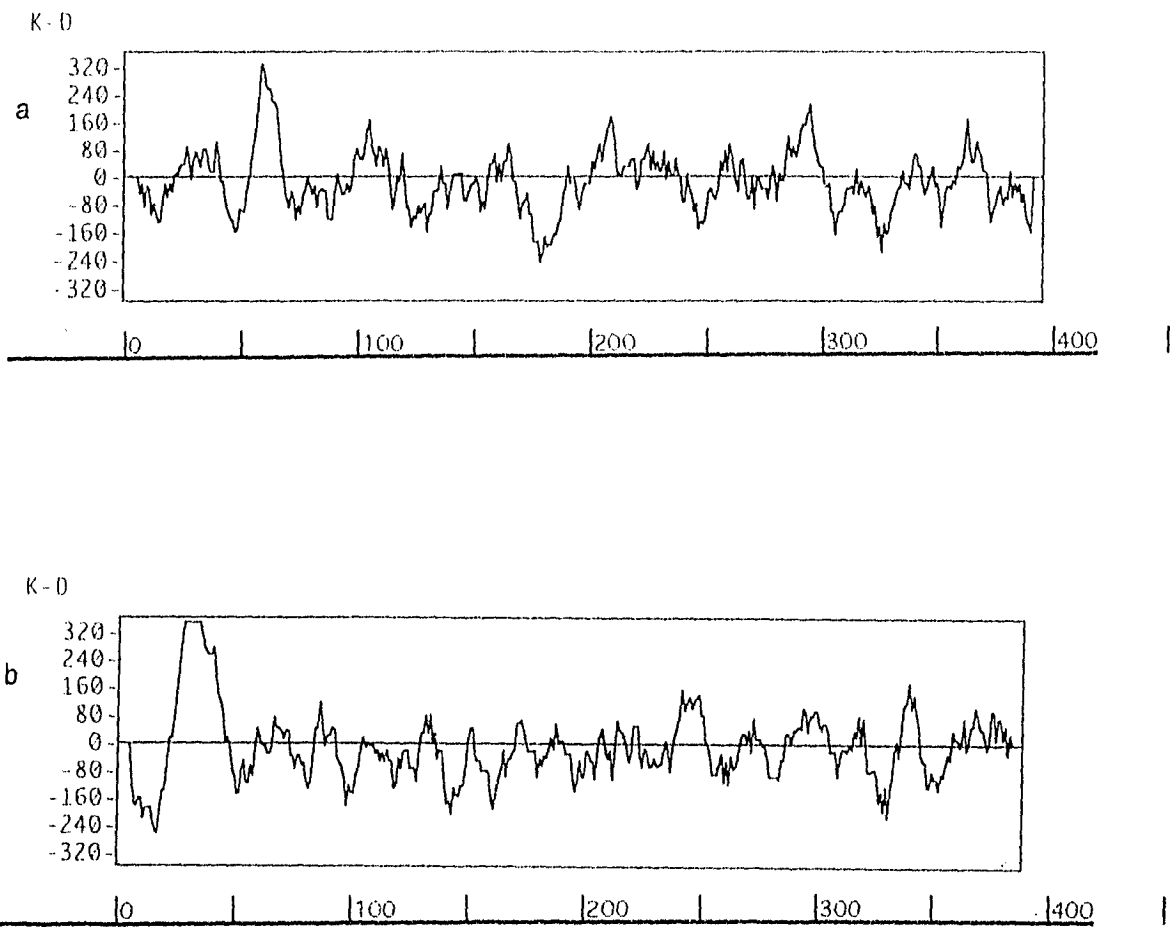


Fig. 15. Diagrama de hidrofobicidad (según Kyte y Doolittle, 1982) de a, RmrA1 y b, EmrA. Se observa un pico hidrofóbico próximo al extremo N-terminal que corresponde a una hélice membranal.

```

          Gap Weight: 3.000      Average Match: 0.540
    Length Weight: 0.100      Average Mismatch: -0.396

          Quality: 148.7          Length: 238
          Ratio: 0.627            Gaps: 1
    Percent Similarity: 51.055    Percent Identity: 28.270

RmrB1 9 V A I A Q P R A S T R D W I A V L A G M I G A F M A I L N I Q S T N A S L L D I E G G I G T G V D N 58
      . . . | . . . . | . : | : : . | | . : | : . | . . : . | . | . : | . : . .
EmrB 1 M Q Q Q K P L E G A Q L V I M T I A L S L A T F M Q V L D S T I A N V A I P T I A G N L G S S L S Q 50

      59 G A W I S T S Y L I G E I V V I P L T A Y F S S V F S F R R Y I L V N S I L F P L F S M A C A F G Q 108
      | . | : | | : : : : | | | | : : . . . . : : : : | . : | | : : | | : : :
      51 G T W V I T S F G V A N A I S I P L T G W L A K R V G E V K L F L W S T I A F A I A S W A C G V S S 100

109 D L G T M I L L R G F R X F G G V L I P M A S P W R L T K L P K S Q Q P L G L A I F A L S V T F A 158
      . | . : | : : | . : . : | . | | | : . : | . . . | . . . . : : | | : : . . | . . |
101 S L N M L I F F R V I Q G I V A G P L I P L S Q S L L L N N Y P P A K R S I A L A L W S M T V I V A 150

      159 P A I G P T I G G Y L T E N Y G W Q T I F X I N T X P S L I M A D A L A L T L D K Q P M Q L H L L K 208
      | . | | . : | | | : : | | | . | | | . : : : . | | . . . . :
      151 P I C G P I L G G Y I S D N Y H W G W I F F I N V P I G V A V V L M T L Q T L R G R E T R P E . R R 199

      209 E G D W A G I I T M A I G L S X L Q T V L E E G N K D D W F S S P F I V K L 246
      | . | : . : | | : : | | . : | : | . . | | | | . | : |
      200 R I D A V G L A L L V I G I G S L Q I M L D R G K E L D W F S S Q E I I I L 237

```

Fig. 16. Alineamiento entre la secuencia de EmrB de *E. coli* y RmrB1 de *R. etli*. Se realizó con el programa BESTFIT (GCG) que utiliza el algoritmo de Smith y Waterman. Símbolos: "|", residuos idénticos; ":", comparación con valores ≥ 0.5 ; ".", comparación con valores ≥ 0.1 .

Gap Weight: 5.000 Average Match: 1.000
Length Weight: 0.300 Average Mismatch: 0.000

Quality: 443.8 Length: 1305
Ratio: 0.378 Gaps: 8
Percent Similarity: 46.931 Percent Identity: 46.931

```
rmrA1 51 AACACGGCTGAAGCCGCGCCGCAACCCTCGATGCCGGCGCCGCTCCGC 100
                                             |  ||
emrA   1 .....atgagc 6
101 GCATCGTCGAAGCTGCCGCCGAGCCGGCGCCTGTCGCTCGCAAGCGCGGC 150
    |||  ||  ||  |  |  |||  ||  |  |||  |||  |||
7   gcaaatgcgagactcaaac..cccgcagcaaccggtaagaagagcggc 54
151 GGCCGCAGATTCCTGCTTGC'TGCAACGGCCATCGTTTTGATCGCCGGGGC 200
    ||  |  ||||  ||  |  ||  ||  ||  ||
55  aaacgtaagcgtctgctcctcctctcaccttgctctttataattat.tgc 104
201 TGCTTATTATGGGCACAACACTACTGGACTATCGGCCGCTTCGAGATCTCTA 250
    |  |||  ||  |  |  |  ||  |  |  |
105 cgtagcgatagggatttattggtttttggtaactgcgctcacttcgaagaaa 154
251 CCGACGATGCCTATGTGAAGGCTGACAACACCACCGTCGCACCCAAGGTT 300
    ||||  ||  ||  ||  ||  |  |  |  |  |  ||||
155 ccgatgacgcatacgtggcagggaaatcaaatgcaaat.tatgtctcaggtg 204
301 TCGGGCTATATCGCGGAAGTGC'TCGTCGGCGATAACCAGGTTGTCAAGGC 350
    ||  |||  |  ||  ||||  |  ||  |  |  |  ||||  ||  |
205 tctggcagcgtgacgaaagtctgggcccgataaacaccgattttgtaaaaga 254
351 CGGCCAGCCGCTTGCCCGCATCGACGATCGTGATTTCGCGCCGCCCTCG 400
    |||  |  |||  |  |  ||||  |||  |||  ||  |  |
255 aggcgacgtgctggctcactctcgacccgacagatgctcgccagcgcttg 304
401 ATCAGGCCAAGGCCGATGT'CGCAGAGGCCGAGGCGACGCTCAACGCCAAG 450
    |  |  ||||  |  ||  |||  |  |  |  |  |  ||  |
305 aaaaagccaaaac.....tgcactggcttcagcgttcgccaaccac 348
451 CAGGCCTCGCTCGACATT'GACAGT'CGACGAT'GCGCCCGCGCGCCAC 500
    |||  |  ||  |||  ||||  ||  ||  ||  |
349 cagctgatgattaacagcaagcagt.....tgcagcgcaa 383
501 GTTCGAAGTCGACAAGGCCAATGAGACCT'TGCGCAACAAAACAACAAGC 550
    |  |||  ||  |  |  |  |  ||  ||  ||  |||  |||
384 tattgaggtgcagaaaatcgccctcgcgcaagcacaagcgactacaacc 433
551 GCTATGCCAATCTCGCGACCAATGGCTATGCGCCGGTCCAGACTGCGCAG 600
    ||  ||  ||  |  |  |  |  |  |  ||  ||  |||
434 gccgtgtgcccgtgggcaatgccaacctgattggctcggaagagctgcaa 483
601 CAGGCGGCTTCGCCCATCGCCGAGCCCAGGCGACGATCGTTTCGCGACAA 650
    |||  ||  ||||  ||  ||  ||||  |||  ||  ||  |
484 cagcccgcgagcgcgctcaccagtgccagggcgaactggacgtcgcgat 533
```

continúa

```

651 TGCCGCCCTCGATGCCGCCGTCAAGCAAGTCGATCTCCTCAATGCCGAAC 700
    |      | ||||      ||| | |      | | |      | |||
534 tcaacaatacaaatgc.....caatcaggcgatgatctctggggactaaac 577

701 TTGCCCAGGCGAAGGCGACGCTTGCCCATGATCAGGCCGTCCAGCGTCAA 750
    | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
578 tgg...aagatcagccagccgtgcaacaggtgccaccgaagtacgtaac 624

751 GCGGAAC TGAACCTCTCTTTATGCGACCCATCACTGCGCCGGTTCCGGAC 800
    || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
625 gcctggctggcgctggagcgtactcgtattatcagtcg.....atgac 668

801 GGGACCCATCGGCAACAGGGCTCTGCGTGTGCGCCAGTATGTCCAAGCCG 850
    ||      || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
669 cggttatgtctcccgcgcggtacagcctggggcgcaaatagcccaa 718

851 GCACCCAGCTGATGTCGGTCGTGCCGACCAGCGCGTTTACGTGATCGCC 900
    || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
719 cgacgcgctgatggcggtcgttcagccaccaatgatggtgggtggatgcc 768

901 AACTATAAAGAGACGCAGCTCACGGATGTTGCGCCGGCCAGCCAGTGA 950
    |||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
769 aactttaagagacgcagattgccaatatgcgtatcggtcagccggtcac 818

951 TATCGAGGTCGATACCTA...CCCGGTCGAACCTATCGTGGCCATGTCTG 997
    |||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
819 taccaccggatatttacggcgatgatgtgaaatacaccggtaaagtgg 868

998 ACAGCCTTGCTCCGGCAAGTGGGCAGGAGTTCGCGCTGCTGCCTCCCGAT 1047
    | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
869 ttggtctggatattggcacaggtagcgcgttctcactgcttcagcgcaa 918

1048 AATGCGACCGCAATTTTACCAAGGTCGTGCAGCGCATTCCTCCgTCAAGAT 1097
    |||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
919 aatgacaccggaactggatcaaagtcggttcagcgtctgcctgtgcgtat 968

1098 CGTCTGG...ATGGCGAGGCCGCAATGGCGATCTGCGTCCCGgCATGT 1144
    || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
969 cgaactggaccagaaacagctggagcaatatccgctgcgtatcggtttgt 1018

1145 CCGTCCAGCCGAGCATCGACACCAAGGCCGATGCCGACCGTAAGTAG... 1191
    || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1019 ccacgctggtgagcgtcaataaccctaaccgtgacggtcaggtactggca 1068

```

Fig. 17. Alineamiento de la secuencia de bases de *rmrA1* con *emrA* utilizando el programa GAP incluido en GCG. Símbolo: |, base idéntica.

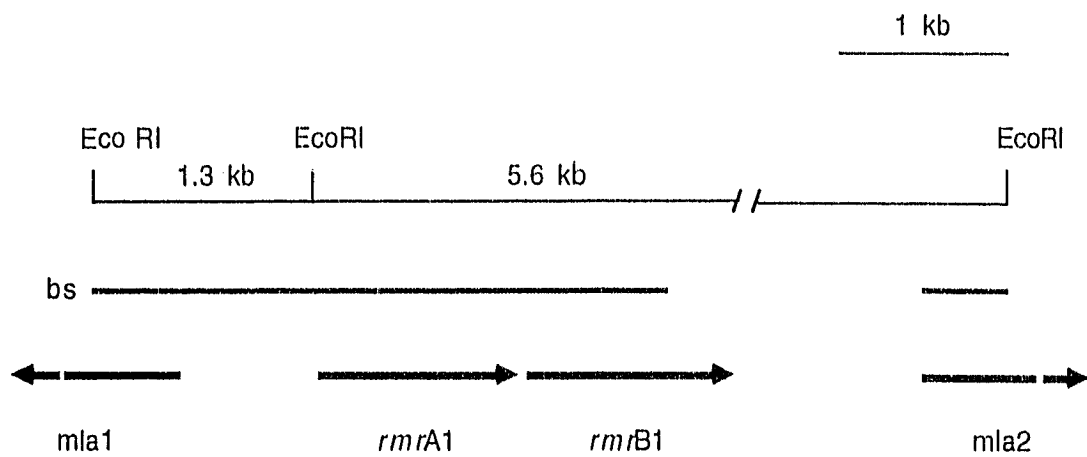


Fig. 18. Marcos de lectura abiertos identificados en la región secuenciada del pb.
 Abreviaturas: bs; bases secuenciadas

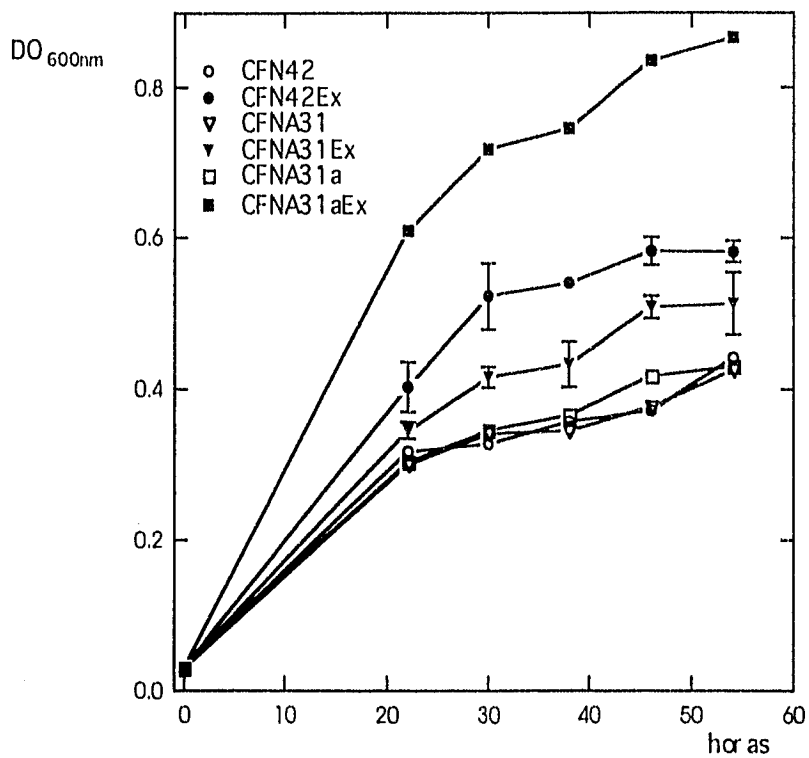


Fig. 19. Efecto del exudado de raíz de frijol sobre la cepa mutante CFNA31. Se tomaron mediciones del crecimiento en medio mínimo líquido en tubos de ensayo con o sin planta. Se tomó una muestra de cada tubo y se midió la DO_{600nm} a intervalos de 8 hs. En el caso de las cepas CFN42 y CFNA31 se midió el crecimiento en 3 tubos diferentes a cada tiempo y se calculó la desviación estándar (DE) que se indica con una barra. El símbolo y la correspondiente cepa se indican en la figura. Abreviatura: Ex, exudado de raíz de frijol.

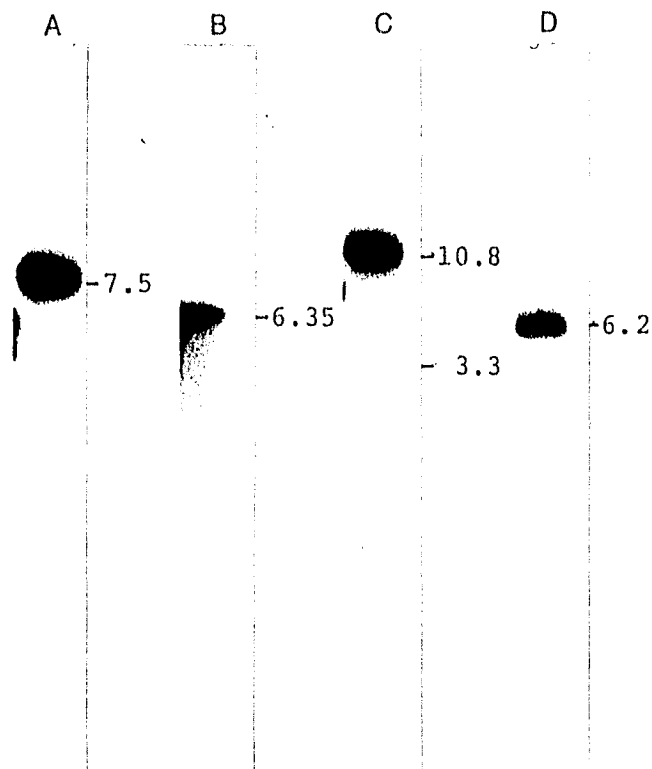


FIG. 20. Reiteraciones de los diferentes fragmentos HindIII de las cepas mutantes clonados en pUC18 que contienen secuencias de *R. etli* CFN42 inducibles por exudado de raíz de frijol. El ADN genómico de CFN42 fue digerido con HindIII y los fragmentos fueron separados en un gel de agarosa. Luego, el ADN fue transferido a una membrana de nylon e hibridado con los distintos fragmentos HindIII como sonda. El tamaño aproximado de cada fragmento (kilobases) se indica a la derecha de cada carril. Carriles: A, sonda derivada de CFNA3; B, sonda derivada de CFNA31; C, sonda derivada de CFNB3 y D, sonda derivada de CFNB18.

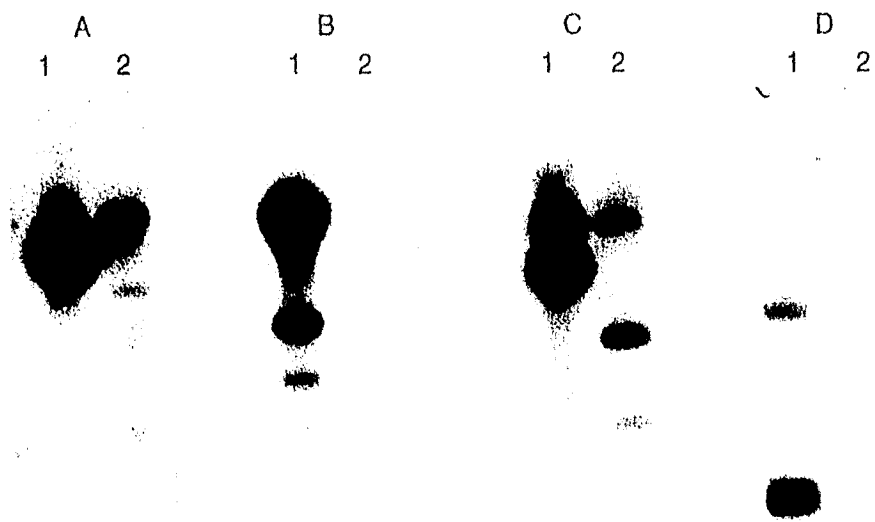
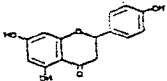
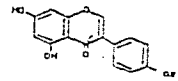
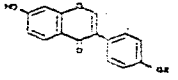
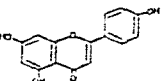
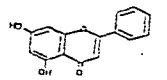
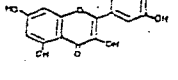
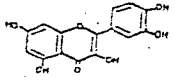


Fig. 21. Homología de las secuencias de *R. etli* CFN42 inducibles por exudado con secuencias de *R. tropici* CFN299. El ADN genómico de *R. etli* CFN42 y *R. tropici* CFN299 fue digerido con EcoRI y los fragmentos fueron separados en un gel de agarosa. Luego, el ADN fue transferido a una membrana de nylon e hibridado con el fragmento HindIII que contiene secuencias inducibles por exudado como sonda. Carriles: 1, *R. etli* CFN42; 2, *R. tropici* CFN299. Sondas: A, fragmento derivado de CFNA3; B, fragmento derivado de CFNA31; C, fragmento derivado de CFNB3; D, fragmento derivado de CFNB18.

Tabla I. Cepas y plásmidos.

Cepa o plásmido	Características relevantes	Fuente o referencia
Cepa		
<i>R. etli</i>		
CFN42	Sm ^r , Nal ^r	Quinto <i>et al.</i> , 1982
CFNA3	Derivada de CFN42 con <i>Tn5B30</i> insertado en cromosoma	este trabajo
CFNA31	Derivada de CFN42 con <i>Tn5B30</i> insertado en pb	este trabajo
CFNB3	Derivada de CFN42 con <i>Tn5B30</i> insertado en cromosoma	este trabajo
CFNB18	Derivada de CFN42 con <i>Tn5B30</i> insertado en cromosoma	este trabajo
CFNX182	Derivada de CFN42 pa ⁻	Brom <i>et al.</i> , 1992
CFNX183	Derivada de CFN42 pb ⁻	Brom <i>et al.</i> , 1992
CFNA31a	Derivada de CFNA31 con pCOS126	este trabajo
CFNA31b	Derivada de CFNA31 con pLAFR1	este trabajo
CFNA31c	Derivada de CFNA31 pa ⁻ pd ⁻ pLAFR1	este trabajo
<i>R. tropical</i>		
CFN299	cepa silvestre	Martínez <i>et al.</i> , 1987
<i>A. tumefaciens</i>		
C58	cepa silvestre	M. van Montagu
<i>E. coli</i>		
DH5 α	receptora en transformación	Hanahan, 1983
HB101	<i>recA</i> , Str ^r , Eyr ^r	Maniatis <i>et al.</i> , 1982
Plásmido		
pCos126	27 kb del pb de CFN42 en pLAFR1	Cava <i>et al.</i> , 1989
pLAFR1	vector para clonación	Friedman <i>et al.</i> , 1982
pRK2013	plásmido suicida	Figurski <i>et al.</i> , 1979
pSUP5001	Contiene <i>Tn5B30</i>	Simon <i>et al.</i> , 1989
pUC18	vector para clonación	Messing, 1983

Tabla II. Flavonoides utilizados en experimentos de inducción.

FLAVONOIDE	PRESENTE EN	INDUCCION				CONCENTRACION UTILIZADA
		A3	A31	B3	B18	
	FRIJOL (E)	+	+	+	+	1.2 μ M
	FRIJOL (E)	+	+	+	+	400 nM
	SOJA (S)	+	+	+	+	400 nM
		+	+	+	+	400 nM
		+	+	+	+	1 μ M
	FRIJOL (S)	+	+	+	+	1 μ M
	<i>Leucaena</i> sp	+	+	+	+	1 μ M

Abreviaturas: E, exudado de raíz; FN, flavonona; FV, flavona; FVL, flavonol; IFV, isoflavona; S, semilla; +, crecimiento.

Tabla III. Características relevantes de las cepas mutantes analizadas.

	MUTANTE			
	A3	A31	B3	B18
Localización del <i>Tn5B30</i>	cr	pb	cr	cr
Tamaño del <i>HindIII</i> con <i>Tn5B30</i> (kb)	4.2	1.7	5.7	3.1
Producción de LPS	+	+	+	+
Crecimiento en MM	+	+	+	+
Eficiencia en nodulación	-	-	+	+
Producción del factor de nodulación	+	+	+	+
Reiteraciones	-	-	+	-
Movilidad	+	+	+	+
Homología con <i>R. tropici</i> 299	+	-	-	+

Abreviatura: cr, cromosoma; pb, plásmido b.