

00381
20



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**Una bomba de resistencia múltiple de
Rhizobium etli CFN42 inducida por
exudado de raíz de *Phaseolus vulgaris*
(frijol).**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGIA)
P R E S E N T A :
RAMON ALEJANDRO GONZALEZ PASAYO**

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARIA ESPERANZA MARTINEZ ROMERO

279716



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 FUE REALIZADO EN EL PROGRAMA DE ECOLOGIA
MOLECULAR Y MICROBIANA DEL CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE
FIJACION DE NITROGENO DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO BAJO LA DIRECCION DE LA DRA. ESPERANZA MARTINEZ ROMERO.

DEDICADO A MIS PADRES,
POR SU CONTINUO APOYO

AGRADECIMIENTOS

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

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno y a la Facultad de Ciencias por darme la oportunidad de conseguir mis objetivos profesionales.

Al Comité Tutorial formado por los Drs. Esperanza Martínez Romero, Mario Rocha Sosa, Alejandra Covarrubias Robles y Enrique Morett Sánchez por sus comentarios y sugerencias.

A los sinodales que evaluaron mi tesis, los Drs. Esperanza Martínez Romero, Mario Rocha Sosa, Alejandra Covarrubias Robles, Alicia González Manjarrez, Gloria Soberón Chávez, Ana Luisa Anaya Lang y Mario Soberón Chávez.

A Patricia Bustos por la obtención de la secuencia de nucleótidos y Paul Gaytan y Eugenio López por la síntesis de oligonucleótidos.

A Mónica Rosenblueth, Ivonne Toledo y Julio Martínez por su ayuda y comentarios.

A mis compañeros y personal del CIFN por su colaboración.

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

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

INDICE	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
1-INTRODUCCION	
-Generalidades	4
-Interacciones entre bacterias y plantas	6
-Simbiosis entre rizobios y leguminosas	6
a-Intercambio de señales	6
Compuestos liberados por la planta	6
Compuestos producidos por los rizobios	12
b-Inducción	14
c-Infeción	16
-Sistemas exportadores conocidos en rizobios	17
-Sistemas regulatorios de rizobios que responden a compuestos liberados por leguminosas	18
-Respuesta de defensa de las plantas frente a microbios	19
2-ANTECEDENTES DIRECTOS Y OBJETIVOS	23
3-MATERIALES, METODOS Y RESULTADOS	
“Multiresistance genes of <i>Rhizobium etli</i> CFN42” González-Pasayo, R. and Martínez Romero, E. 2000. Mol. Plant-Microbe Interact.	
4-RESULTADOS ADICIONALES	26
5-DISCUSION Y CONCLUSIONES	42
6-BIBLIOGRAFIA	50

RESUMEN

Rhizobium etli establece una relación mutualista con *Phaseolus vulgaris* (frijol). Como resultado de esta interacción, se producen nódulos radicales en los cuales la bacteria fija nitrógeno atmosférico. El intercambio de señales moleculares entre los simbiontes en la rizósfera determina el éxito de esta interacción.

Un gen inducible por exudado de raíz de frijol y por flavonoides fue identificado en *R. etli* CFN42. La mutante con un transposón Tn5-B30 (que posee el gen reportero de la neomicina fosfotransferasa, *nptII*) insertado en este gen tiene una capacidad disminuída para formar nódulos en *P. vulgaris* y tiene mayor sensibilidad al exudado de raíz, a algunos flavonoides y al ácido salicílico comparada con la cepa silvestre. La secuencia nucleotídica mostró que este gen codificaría una proteína de 41.8 kDa que tiene similitud significativa con proteínas de la familia de Fusión de Membranas involucrada en resistencia múltiple y por esta razón fue designado *rmrA* (gen de *Rhizobium* para multiresistance A). Es probable que *rmrA* esté organizado como un operón junto con otro gen contiguo, *rmrB*, el cual codificaría una proteína de 56.1 kDa que presenta las propiedades típicas de los miembros de la superfamilia Principales Facilitadores. Un tercer gen, ubicado arriba de *rmrA*, denominado *orfR*, codificaría un polipéptido de 13.0 kDa que tiene similitud significativa con represores de la familia TetR/AcrR. Estos tres genes están ubicados en el plásmido LPS (pb, 150 kb) de la cepa CFN42. Se propone que los genes *rmrAB* codifican un sistema de transporte al exterior que se extiende a través de las dos membranas, el cual evita la acumulación dentro de la célula de compuestos tóxicos producidos por la raíz de frijol y que el *orfR* está involucrado en la regulación de *rmrAB*. Este sistema de transporte confiere una ventaja adaptativa a *R. etli* en la simbiosis con frijol.

ABSTRACT

An open reading frame (ORF) inducible by *Phaseolus vulgaris* bean-root exudate and by flavonoids was identified in *Rhizobium etli* strain CFN42. The mutant carrying a Tn5-B30 with the promoterless *nptIII* reporter gene inserted in this ORF has reduced nodulation capacity on *P. vulgaris* and has enhanced sensitivity to root exudates, some flavonoids, and salicylic acid compared to the wild type strain. Nucleotide sequence analysis showed that this ORF which is predicted to encode a 41.8 kDa protein, has significant similarity with proteins of the membrane fusion protein family, and is designated *rmrA* (rhizobium multiresistance gen A). *rmrA* is probably organized as an operon together with a downstream ORF, *rmrB*, which encodes a predicted 56.1 kDa protein with properties typical of members of the major facilitator superfamily. A third ORF, *orfR*, placed upstream of *rmrA*, specifies a putative 13.0 kDa polypeptide that has significant similarity to repressors. These genes are located on the LPS plasmid (pb, 150 kb) in the *R. etli* strain CFN42. We propose that *rmrAB* encodes an export system spanning the two membranes that prevents the accumulation inside the cell of different toxic compounds produced by bean-roots, and that the *orfR* encodes a regulatory component of the *rmrAB* operon. This transport system seems to confer an advantage to *R. etli* for nodulating bean plants.

1-INTRODUCCION

-Generalidades

Los procariotes (arqueas y bacterias) intervienen en transformaciones geoquímicas indispensables para los ciclos de la biósfera, producen componentes importantes de la atmósfera terrestre y representan una gran parte de la diversidad genética de los organismos vivos. Dichos organismos raramente viven aislados en el medio ambiente y frecuentemente interactúan con otros grupos de procariotes o eucariotas con metabolismos complementarios (Campbell et al. 1999). Este tipo de relación entre organismos de diferentes especies que están en contacto directo se denomina simbiosis. Existen tres categorías de relaciones simbióticas. Una de ellas, el comensalismo, ocurre cuando un simbiote recibe beneficios mientras que no es perjudicado ni ayudado de ninguna forma por el otro simbiote. En el parasitismo, uno de los simbiotes denominado parásito, se beneficia a expensas del huésped. Cuando los dos simbiotes se benefician, la relación se conoce como mutualismo (Campbell et al. 1999). Estas definiciones sólo sirven para definir ciertas situaciones pero en la naturaleza existen estadíos intermedios o puede ocurrir que la relación finalice de forma diferente a la relación inicial. Las interacciones entre organismos pueden ser variadas y sus efectos interrelacionados, por lo que los resultados no siguen una secuencia lineal de eventos.

Uno de los principales habitats ocupados por los procariotas, el suelo, es el mayor reservorio de carbono orgánico del planeta. Recientemente, Whitman et al. (1998) evaluaron por primera vez el número de bacterias en este hábitat y determinaron que contiene $2.6 \cdot 10^{29}$ células. Teniendo en cuenta este número de células y la diversidad genética que dicha cantidad puede contener, distintos tipos de relaciones entre los organismos pueden surgir y algunas perdurar en el tiempo. Una de ellas, es la asociación mutualista que se establece entre un grupo de bacterias del suelo denominadas rizobios y plantas leguminosas. Este grupo incluye a las bacterias Gram-negativas de los géneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium*, *Rhizobium* y (Martínez-

Romero et al. 2000). Bajo condiciones limitantes de nitrógeno, los rizobios pueden inducir la formación de nódulos, estructuras especializadas en las raíces o tallos de leguminosas. En los nódulos, las bacterias se transforman en bacteroides, los cuales son capaces de usar fotosintatos como fuente de energía, electrones y carbono para llevar a cabo la transformación de N_2 atmosférico a amonio, proceso conocido como fijación biológica de nitrógeno. Luego de dicho proceso, el amonio es incorporado al metabolismo de la planta, la cual obtiene así un beneficio de la asociación.

La información genética de rizobios se encuentra localizada en un cromosoma y uno o varios plásmidos, moléculas de ADN autónomas. La capacidad de establecer dicha asociación está relacionada en gran medida con la expresión de la información genética contenida principalmente en plásmidos, excepto en *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* y la mayoría de las especies del género *Mesorhizobium* donde los genes simbióticos están localizados en el cromosoma (Hanin et al. 1999). En gran parte de los rizobios que contienen la información simbiótica en plásmidos, sólo un plásmido es el que posee la mayoría de la información requerida para el proceso simbiótico que incluye a los genes de nodulación y fijación (*nod*, *nif*, *exo* y *fix*). Por esta razón, este plásmido se ha denominado plásmido simbiótico. En el caso de *R. etli* CFN42 (Segovia et al. 1993), la información contenida en sus seis plásmidos (pa-pf) alcanza el 45% de su genoma total (Martínez-Romero 1994). Por otro lado, se ha determinado que además del plásmido simbiótico (plásmido d, 370 ó 500 kb), el plásmido b (150 kb) es indispensable para la formación del nódulo ya que contiene genes necesarios para la biosíntesis de lipopolisacáridos (LPS) (Brom et al. 1992, García de los Santos y Brom 1997). También se identificaron en este plásmido a los genes *thiCOGE* involucrados en la biosíntesis de tiamina (Miranda-Ríos et al. 1997), un cofactor requerido por varias enzimas del metabolismo aeróbico.

-Interacciones entre bacterias y plantas

Las bacterias del suelo pueden interactuar con plantas con diferentes efectos sobre sus huéspedes. Como se mencionó antes, la asociación entre rizobios y leguminosas resulta en la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en raíces y tallos de la planta huésped (van Rhijn y Vanderleyden 1995). Las bacterias del género *Azospirillum*, quienes se asocian con raíces de maíz, arroz y trigo, promueven el crecimiento debido en buena medida a la producción de auxinas y la fijación de nitrógeno en menor medida. Diversas *Pseudomonas* sp promueven el crecimiento y protegen a la planta contra microbios patógenos (Dowling y O'Gara 1994) debido a la producción de sideróforos, antibióticos, cianuro y hormonas de crecimiento. Otro ejemplo, es la interacción entre *Agrobacterium* y plantas dicotiledóneas la cual resulta en la aparición de tumores (Kado 1991). A pesar de estas diferencias, resulta curioso que procesos comunes (como proliferación, quimiotaxis, motilidad y adhesión) estén involucrados en las fases iniciales de estas interacciones.

-Simbiosis entre rizobios y leguminosas

a-Intercambio de señales

Compuestos liberados por la planta

Como se mencionó antes, los rizobios que viven libres en forma saprofitica en el suelo (Segovia et al. 1991), son capaces de modificar dicha forma de vida y establecer una relación mutualista. Este cambio es producido principalmente por los compuestos liberados por las raíces de las plantas huéspedes, los cuales desencadenan diversos procesos como catabolismo de sustancias para la obtención de C y N (Murphy et al. 1987; Johnston et al. 1988; Tepfer et al. 1988; Peters y Verma 1990; Goldman et al. 1991), degradación de flavonoides (Görge y Werner 1991, Rao et al. 1991, Rao y Cooper 1994, Rao y Cooper 1995), quimiotaxis (Currier et al. 1977; Aguilar et al. 1988; Caetano-Anollés et al. 1988;

Kape et al. 1991; Dharmatilake et al. 1992), inducción de genes de nodulación (Redmond et al. 1986, Firmin et al. 1986), resistencia a compuestos tóxicos de la planta (Parniske et al. 1991) y a metales como cadmio (Perret et al. 1994), producción de un sistema secretor de tipo III que participa en nodulación (Viprey et al. 1998), promoción del crecimiento (Hartwig et al. 1991), modificación de la porción antigénica de lipopolisacáridos (Duelli y Noel 1997), transferencia de plásmidos (Martínez-Romero comunicación personal), producción de ácido indolacético (Prinsen et al. 1991), aparición de receptores específicos de lectinas (Bhuvanewari y Bauer 1978), competencia (Sadowsky et al. 1988), entre otros. Este primer paso determina la especificidad de la relación. Entre los compuestos liberados se han identificado azúcares, aminoácidos, alcoholes, fenoles, flavonoides y vitaminas. Algunas de estas moléculas han recibido especial atención.

Los aminoácidos, azúcares y alcoholes pueden ser utilizados por la bacteria como fuente de energía. En el caso del aminoácido prolina, se ha determinado que una mutación en una enzima del metabolismo de prolina en *S. meliloti* reduce la colonización de raíces de alfalfa ya que es aparentemente requerida para una óptima tasa de crecimiento en el proceso de infección (Jiménez-Zurdo et al. 1997). También se ha estudiado el papel de la homoserina en la simbiosis entre chícharo y *R. leguminosarum* bv. *viciae*. El 70% de los aminoácidos secretados corresponde a homoserina que puede ser utilizada por *R. leguminosarum* bv. *viciae* como fuente de C y N, mientras que otros rizobios son incapaces de utilizarla o bien puede tener efecto tóxico (van Egeraat 1975, Hynes y McGregor, 1990).

Entre las vitaminas, la biotina, es liberada por plantas de alfalfa y promueve la colonización por *S. meliloti* aumentando la tasa de crecimiento en la rizosfera (Streit y Phillips 1997). Esta vitamina también actúa como cofactor que une CO₂ a enzimas como acetilCoAcarboxilasa (síntesis de ácidos grasos) y piruvato carboxilasa (generación de energía y biosíntesis).

Existen metabolitos secundarios sintetizados por leguminosas que pueden afectar a ciertos microorganismos en la rizosfera. La mimosina es una toxina antimitótica que se encuentra en grandes cantidades en hojas, raíces y semillas de los géneros *Leucaena* y *Mimosa*. Los aislados de nódulos de *Leucaena* sp son capaces de degradar mimosina como única fuente de C y N, y se ha encontrado que al menos una enzima involucrada en el catabolismo de mimosina es inducida por esta toxina (Soedarjo et al. 1994). No se sabe si la capacidad de degradar mimosina provee ventaja competitiva en la rizosfera o en la nodulación; sin embargo, es probable que *Rhizobium* sp haya desarrollado la capacidad de beneficiarse de un compuesto abundante en las proximidades de las semillas y de las raíces de *Leucaena* sp, aunque la incapacidad de utilizar mimosina por otras cepas no les impida nodular dicha leguminosa (Soedarjo et al. 1996).

Las calisteginas son compuestos producidos por las plantas como *Calystegia sepium* y pueden ser catabolizados por *S. meliloti* Rme41 para utilizarla como fuente de carbono y nitrógeno. La incapacidad de catabolizar calistegina no afecta la simbiosis pero permite la sobrevivencia en la rizosfera (Tepfer et al. 1988).

Los flavonoides, moléculas heterocíclicas sintetizadas por la vía del fenilpropanoide (Fig. 1), han mostrado diversos efectos sobre los rizobios. Uno de dichos efectos es activar o reprimir la transcripción de genes *nod* involucrados en la producción de los factores de nodulación (Redmond et al. 1986, Firmin et al. 1986). La expresión de los genes de nodulación sería modulada mediante un mecanismo de continua retroalimentación que podría capacitar a la planta a regular la producción del factor de nodulación del rizobio en las diferentes etapas de la infección y nodulación ya que éstas tendrían diferentes requerimientos con respecto a la cantidad y calidad de esta señal (Spaink 1995). El tipo de flavonoide inductor varía según la leguminosa y según provenga de semilla, raíz o exudado. Muchos flavonoides se almacenan y liberan como glucósidos o conjugados relacionados que son más solubles en agua (más difusibles) que las agliconas y generalmente menos activos en la inducción de genes *nod* pero pueden ser hidrolizados a

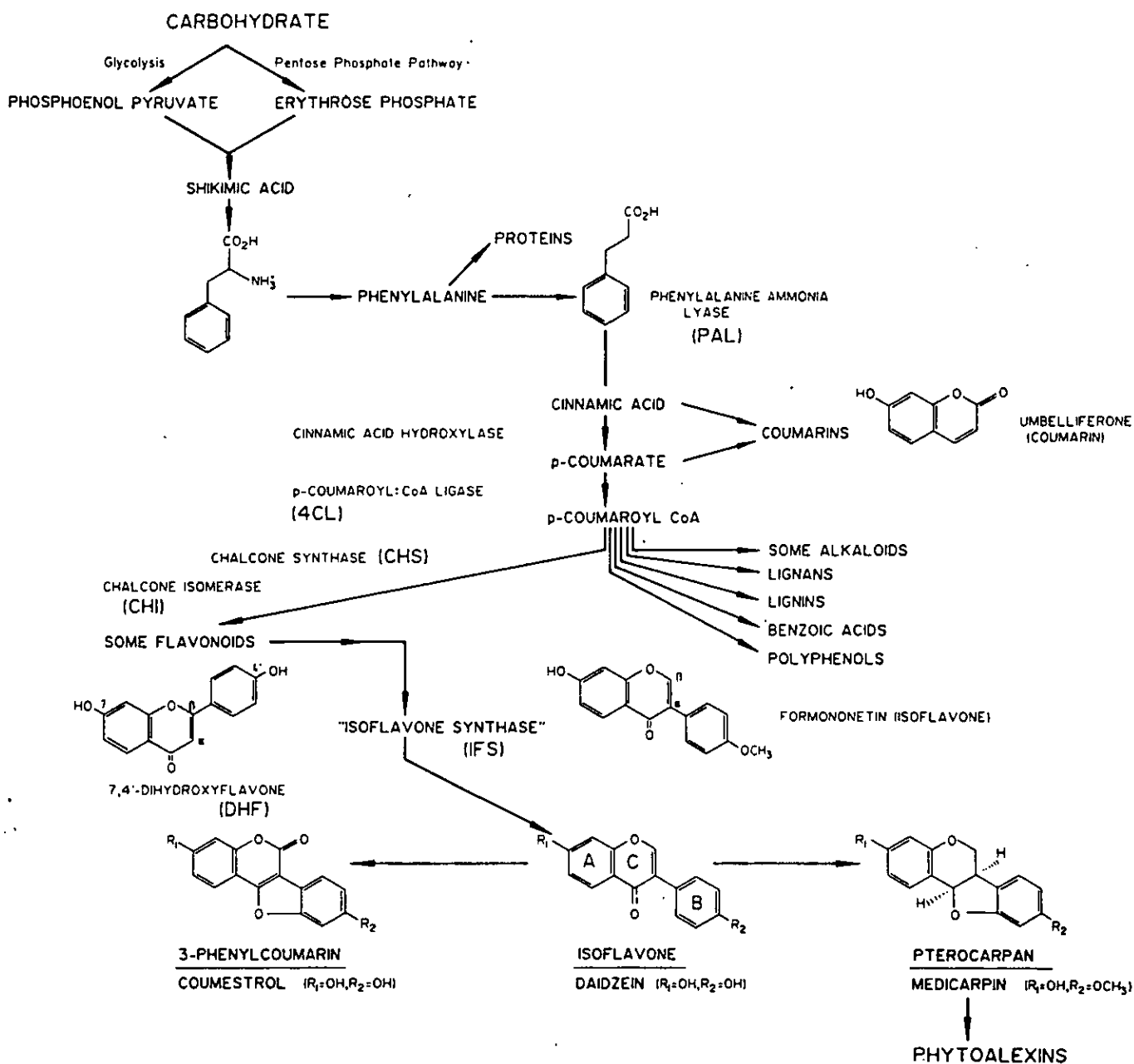


Fig. 1. Vía del fenilpropanoide propuesta para compuestos fenólicos, flavonoides, isoflavonoides y pterocarpanos. Reproducido de Rolfe y Gresshoff (1988).

sustancias más activas por exozimas bacterianas (Hartwig et al. 1991). También se ha observado que la inoculación de *Vicia sativa* con *R. leguminosarum* bv. *viciae* resulta en un aumento de la actividad inductora (sobre genes *nod*) de los exudados de raíz (Recourt et al. 1991). Este aumento puede ser causado por la síntesis *de novo* de flavonoides, ya que la acumulación de flavonoides ha sido observada en exudado radical de soya después de la inoculación con los factores de nodulación de *B. japonicum* y *R. sp* NGR234 (Schmidt et al. 1994). Otra explicación podría basarse en el hallazgo de la capacidad de los rizobios para degradar un amplio rango de flavonoides (Görge y Werner, 1991, Rao et al. 1991, Rao y Cooper 1994, Rao y Cooper 1995). Dicha degradación lleva a la aparición de chalconas que pueden ser, dependiendo de la cepa, inductores más eficientes de genes *nod* que otros flavonoides (Hartwig et al. 1990). Esto es posible debido a que la ruptura de la estructura del anillo C puede ocasionar una flexibilidad conformacional adicional para la unión a la proteína NodD (Rao y Cooper 1994).

Algunos flavonoides son quimioattractantes para rizobios (Aguilar et al. 1988, Caetano-Anollés et al. 1988; Kape et al. 1991; Dharmatilake et al. 1992) aunque la quimiotaxis y la inducción de los genes *nod* no correlaciona. Por ejemplo, entre los flavonoides inductores de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, apigenina y luteolina tienen respuesta quimiotáctica similar a los inhibidores de la inducción, umbeliferona y acetosiringona. Por otro lado, el inductor naringenina no tiene efecto en quimiotaxis (Aguilar et al. 1988).

La incubación de bacterias capaces de nodular soya (*B. japonicum* y *Sinorhizobium fredii*) en presencia de isoflavonas genisteína o daidzeína induce la resistencia a concentraciones tóxicas de gliceolina, una fitoalexina de soya. Dicha resistencia a gliceolina inducida por flavonoides tiene un papel importante en la supervivencia de rizobios en la rizosfera de soya aunque su mecanismo no ha sido aclarado (Parniske et al. 1991). Posteriormente, Kape et al. (1992) determinaron que una chalcona, isoliquiritigenina, es un potente inductor de la resistencia a gliceolina (induce a concentración un orden de magnitud

debajo de aquellas requerida por genistéina o daidzeína) y, al mismo tiempo, es el inductor conocido más poderoso de los genes *nod*.

Por otro lado, desde hace tiempo se conoce que ciertos isoflavonoides producidos por la raíz afectan el crecimiento de *Rhizobium* y pueden modificar la capacidad de esta bacteria para formar nódulos. Se observó efecto inhibitorio de la fracción hidrosoluble de la cubierta de semilla de alfalfa o trébol sobre el crecimiento de *Rhizobium* (Thompson 1960, Bowen 1961). van Egeraat (1975) observó crecimiento activo de *R. leguminosarum* en los sitios de emergencia de raíces laterales en chícharo, sitios en los cuales se produce abundante exudación. En otro estudio, se analizó el efecto de 11 flavonoides sobre el crecimiento de 8 cepas de rizobios *in vitro* y algunos de estos compuestos mostraron efecto inhibitorio sobre el crecimiento en experimentos realizados en cajas de Petri y cultivos líquidos (Pankhurst y Biggs 1980). Diversos flavonoides han sido identificados en la rizosfera provenientes del exudado de raíz de plántulas asépticas de soya como daidzeína, cumestrol (D'Arcy-Lameta 1986) y genistéina (Kosslak et al. 1987). En el caso de la daidzeína, se encontró bajo la forma de malonilglucósido en raíces de soya y que se liberaba 10 veces más en la punta de la raíz que arriba de la punta. Flavonoides liberados por semillas de alfalfa aumentan la tasa de crecimiento de *S. meliloti* y *Pseudomonas putida*, no tienen efecto sobre *Bacillus subtilis* o *Agrobacterium tumefaciens* y retardan el crecimiento de dos hongos patógenos de alfalfa (Hartwig et al. 1991). Se sugiere que la alfalfa puede controlar químicamente a ciertos microbios del suelo liberando flavonoides desde semillas y raíces.

Graham (1991) observó que la exudación de flavonoides en soya es específica, porque los perfiles de los exudados no son el simple reflejo de los perfiles de los tejidos intactos; y saturable, porque después de la exudación normal de las semillas, éstas pueden ser lavadas pero en poco tiempo liberan el mismo nivel de flavonoides que el alcanzado en la saturación inicial. Se ha reportado la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides en suelos (Siqueira et al. 1991) así como flavonoides con capacidad inductora de genes *nod* en

suelo y rizosfera de alfalfa (León-Barrios et al. 1993). Se identificaron compuestos aislados del suelo con base en su actividad biológica (inductores de genes *nod*) y se encontró que la rizosfera contiene 400% más actividad inductora que el suelo libre de plantas, dicha actividad inductora decrece con la distancia desde la rizosfera lo cual apoya la idea que la raíz de alfalfa es la fuente original de estos compuestos (León-Barrios et al. 1993). También se observó que los rizobios cercanos a la superficie de la semilla y la raíz están expuestos a los compuestos liberados por la planta, los cuales influyen sobre la infección al afectar la proliferación de los rizobios en la superficie de la semilla y raíz (Kato et al. 1997). La condición lipofílica de los flavonoides ocasiona que su difusión en el suelo dependa en gran medida de la existencia de lípidos, los cuales están presentes en la mayoría de los suelos y pueden llegar al 30% de la materia orgánica (Amblès et al. 1991).

Cuando los microorganismos están presentes, fitoalexinas como cumestrol, pterocarpanos y otros isoflavonoides han sido encontrados frecuentemente en exudados de raíz de leguminosas por lo que se postula que proveen de un mecanismo de defensa contra microorganismos potencialmente patógenos (Phillips y Kapulnik 1995). Este punto será ampliado en la sección Respuesta de defensa de la planta frente a microbios.

Otros metabolitos secundarios presentes en gran cantidad en leguminosas son la betaínas que incluyen a la trigonelina, estaquidrina, carnitina y colina. La trigonelina es producida por muchas leguminosas en semilla, tallo y raíz e induce su propio catabolismo en *S. meliloti* durante todos los estadios de infección en raíz de alfalfa (Boivin et al. 1990). Además, es activador de *nodD2*, un gen regulador de la nodulación, en *S. meliloti* (inductor no flavonoide) (Phillips et al. 1992).

Cabe señalar además, que los flavonoides presentan un efecto hormonal directo actuando como inhibidores del transporte de auxinas en las plantas y este efecto afectaría el crecimiento del nódulo (Spaink 1995).

Compuestos producidos por rizobios

Se ha propuesto por algunos laboratorios que la producción de antibióticos por las cepas inoculantes podría dar una ventaja competitiva sobre rizobios sensibles a ese antibiótico en el suelo. Este efecto ha sido observado en condiciones controladas donde la planta crece en un medio de crecimiento definido (sin suelo) o en suelo estéril (Triplett 1990, Triplett y Sadowsky 1992). No se ha probado aún que la producción de antibiótico mejore la nodulación en suelos no estériles pero de esta forma se podría resolver el problema de la competencia con cepas indígenas cuando los genes de producción y resistencia a un determinado antibiótico puedan ser introducidos en cepas de *Rhizobium* sp que mejoren el rendimiento de los cultivos.

El sistema mejor estudiado en relación al papel de la producción de antibióticos en la competencia por la nodulación es el de la trifolitoxina producida por *R. leguminosarum* bv. *trifolii* T24 que es incapaz de fijar N₂ en trébol (Maier y Triplett 1996). La trifolitoxina es un antibiótico peptídico modificado postraduccionalmente que inhibe diferentes grupos de α -proteobacterias que incluye a todas las especies de rizobios y dos de las tres especies de *Agrobacterium*, además de otros patógenos y simbiontes de plantas. Un grupo de siete genes *tfxABCDEFG* confieren la producción y resistencia. Los genes de producción y resistencia fueron integrados en una cepa efectiva y mejoró la competencia por la nodulación. Resultados preliminares indican que la trifolitoxina se produce en el suelo (Triplett y Sadowsky 1992).

Las rizopinas son carbohidratos basados en inositol, producidos (función codificada por los genes *mos*) y catabolizados (función codificada por los genes *moc*) por ciertas cepas de *S. meliloti* (10% de las cepas) y *R. leguminosarum* bv. *viciae* (14% de las cepas) (Murphy et al. 1995). Los genes *moc* se expresan en vida libre y permiten a las cepas crecer con rizopinas como única fuente de C, lo cual otorga una ventaja competitiva sobre otras bacterias incapaces de utilizar este compuesto.

b-Inducción

Dentro del intercambio de señales, el proceso mejor estudiado es la inducción de los genes de nodulación que comienza cuando las plantas secretan una variedad de metabolitos secundarios, en su mayoría flavonoides (Firmin et al. 1986, Kosslak et al. 1986, Peters et al. 1986, Redmond et al. 1986) que incluyen a las chalconas (Maxwell et al. 1989, Recourt et al. 1991), las antocianidinas (Hungria et al. 1991a) entre otros y betaínas (Phillips et al. 1992) que son reconocidos por los rizobios. Estas señales son percibidas mediante el activador transcripcional NodD que posee diferente especificidad en los distintos grupos de rizobios. Este activador induce a los genes de nodulación (*nod* y *nol*) los cuales producen la síntesis y secreción de los factores de nodulación que constituyen la señal bacteriana requerida para el progreso de la simbiosis (Phillips et al. 1994) (Fig. 2).

Los factores de nodulación tienen diversos efectos sobre la planta huésped entre los que se incluyen la deformación del pelo radical, cambios en las células corticales, la despolarización de la membrana de las células del pelo radical y estimulación de la exudación de ciertos flavonoides en la raíz (Spaink 1995) (Fig. 2). Algunos de estos efectos, como cambios en el desarrollo de la raíz y la similitud estructural a estimuladores de hongos han sido la base para especular que los factores pueden ser estimuladores de la respuesta con la cual los procesos de reconocimiento y transducción de señales en la respuesta mutualista o patógena de plantas podrían ser similares (Baron y Zambryski 1995).

Además, en las etapas tempranas de la interacción entre *B. japonicum* y soya, se inducen las enzimas características de la respuesta de la planta contra patógenos como fenilalanina amonioliasa y chalcona sintetasa (Estabrook y Sengupta-Gopalan 1991). Dichas enzimas pertenecen a la vía del fenilpropanoide y son marcadores clásicos de la respuesta de la planta frente al ataque de patógenos (Dixon y Lamb 1990). Esto sugiere que al menos inicialmente son percibidos como patógenos. Sin embargo, la producción de

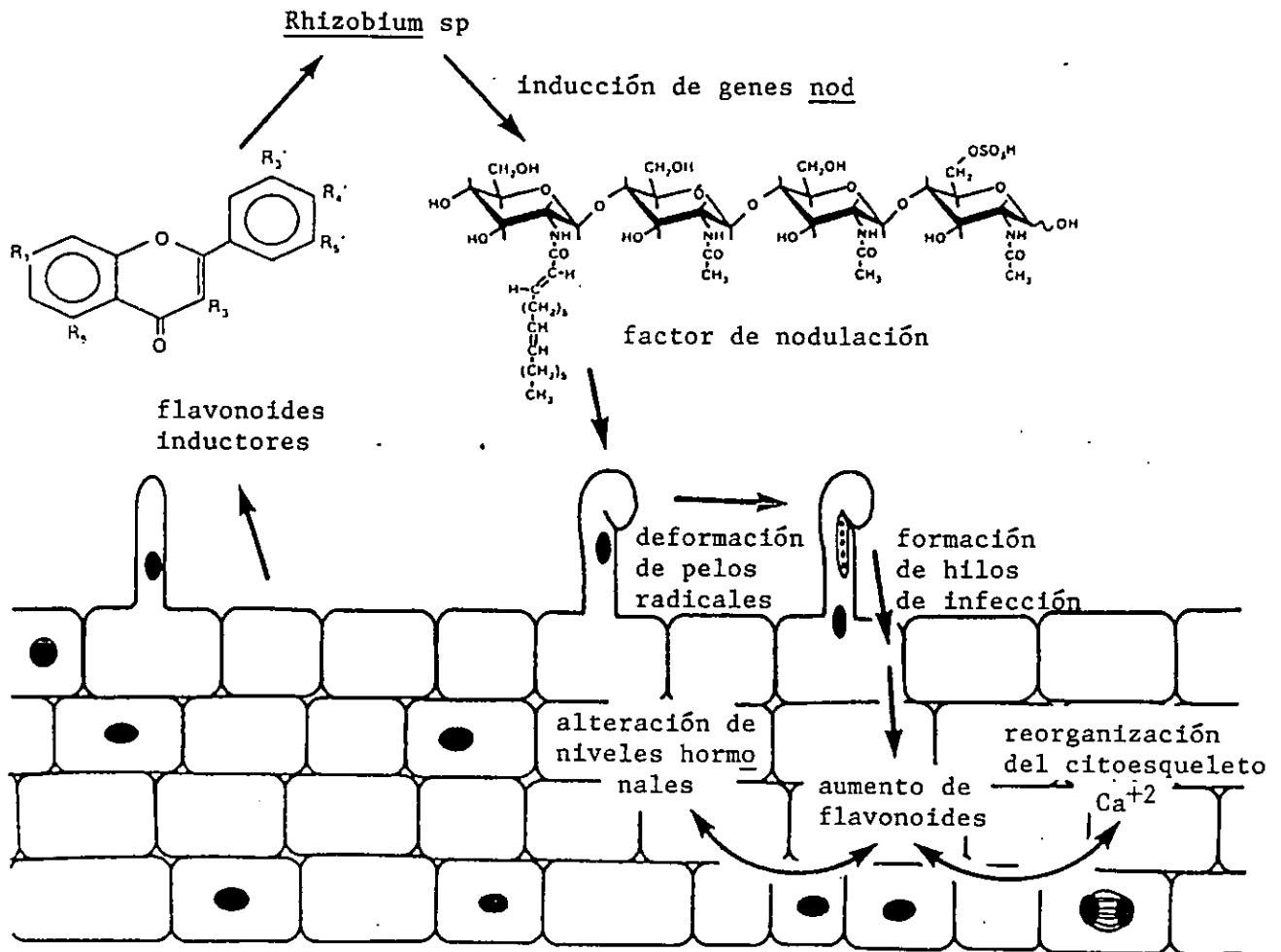


Fig. 2. Modelo de inducción por flavonoides de los genes de nodulación los cuales producen las enzimas necesarias para la síntesis del factor de nodulación. Este factor estimula el enroscado de los pelos radicales y altera el nivel de los flavonoides de la raíz. Estos cambios provocan divisiones celulares que finalmente llevan a la formación de nódulos. Reproducido de Hirsch (1992).

fitoalexinas es tan baja comparada con una respuesta típica a patógeno que se ha sugerido que *Rhizobium* sp puede suprimir la respuesta del huésped (Schmidt et al. 1992). De esta forma, mediante una respuesta de defensa atenuada, se consigue un exudado radical con mayor actividad inductora, mayor número de rizobios son atraídos quimiotácticamente y sus genes de nodulación son inducidos. Esto constituye una regulación positiva de los eventos de la nodulación. Es posible que las bacterias hayan desarrollado mecanismos para evadir o suprimir la respuesta de defensa de la planta. Dicha hipótesis se basa en el análisis de infecciones abortivas (debido a que la bacteria es inhibida por las fitoalexinas de la planta) en ensayos con cepa silvestre y mutantes deficientes en exopolisacáridos de *B. japonicum* (Parniske et al. 1994) y *S. meliloti* (Battisti et al. 1992, Niehaus et al. 1993). Los resultados sugieren que los exopolisacáridos actuarían como una de las formas para suprimir la respuesta de defensa.

c-Infeción

Luego de la colonización de la rizosfera y la adhesión a los pelos radicales, se inicia el proceso de infección. En presencia de un rizobio compatible, el primer cambio visible en la raíz es el enroscado de los pelos radicales y le sigue la formación del cayado que sirve como sitio de entrada a los rizobios en ciertas leguminosas. La bacteria invade el pelo radical, los hilos de infección entran en los tejidos de las raíces y se induce la actividad mitótica en las células corticales ya diferenciadas (Fig. 2). El hilo de infección crece hacia ese primordio de nódulo y la bacteria entra al citoplasma de la célula del primordio (Fig. 2). Finalmente, el primordio se diferencia en un nódulo maduro que contiene a las bacterias, las cuales se diferencian en bacteroides fijadores de nitrógeno. En estas diferentes etapas, distintos genes son inducidos en la planta cuyos productos, denominados nodulinas, presumiblemente juegan un papel en la formación o mantenimiento del nódulo (Baron y Zambryski 1995).

La mayoría de los rizobios tienen un rango limitado de plantas huésped y nodulan sólo especies de leguminosas. Esto es debido en gran parte, al intercambio de señales de reconocimiento entre rizobios y sus huéspedes, factores de nodulación y flavonoides, respectivamente.

-Sistemas exportadores conocidos en rizobios

La mayoría de las enzimas que sintetizan el factor de nodulación están ubicadas en el citosol y en la membrana interna por lo cual probablemente la síntesis ocurre en ese sitio. Luego de ser sintetizados, los factores de nodulación son excretados al medio extracelular, proceso que involucraría a uno o varios sistemas transportadores.

Los genes *nodIJ* están involucrados en el transporte de los factores de nodulación. Con base en la homología de la secuencia se ha propuesto que el complejo NodIJ es un transportador de tipo ABC (ATP-Binding Cassette). Este transportador consiste de una proteína integral de membrana y una proteína que une ATP. NodI corresponde a la parte citoplásmica de un complejo que une ATP y, NodJ a una proteína hidrofóbica integrada a la membrana. Ambas proteínas están asociadas a la membrana interna (Vázquez et al. 1993) lo cual sugiere que podría traslocar los factores de nodulación desde el citoplasma al periplasma. Según esta hipótesis una tercera proteína sería necesaria para excretar el factor al medio. En *R. leguminosarum* NodT probablemente desempeñe esta función formando un sistema de secreción junto con NodI y NodJ (Spaink et al. 1995). En *S. meliloti* es posible que NodGHI, los cuales son homólogos a miembros de familias de proteínas de fusión membrana (Saier et al. 1994), estén involucrados al transporte de sustancias, incluyendo a los factores de nodulación, a través de la membrana interna hacia el periplasma.

El gen *nodO* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* codifica una proteína de excreción que forma canales iónicos a través de la membrana que permitiría el movimiento de cationes

monovalentes a través de la membrana de la planta huésped involucrada en el intercambio de señales de nodulación (Sutton et al. 1994)

Otros genes codifican transportadores que excretan proteínas con función desconocida después de la inducción con flavonoides (Krishnan y Pueppke 1993).

-Sistemas regulatorios que responden a compuestos liberados por la planta en rizobios

El sistema regulatorio que controla los genes de nodulación es el más conocido hasta el momento. Este sistema requiere de los flavonoides excretados por las raíces del huésped (inductor), de un activador transcripcional denominado NodD y de una caja *nod* que es el sitio de unión de la proteína NodD al AND. Dicha caja *nod* consta de alrededor de 50 pares de bases ubicados entre 100 y 250 pb arriba del sitio del inicio de la transcripción de los genes *nod* (Rostas et al. 1986).

La regulación génica involucra frecuentemente controles positivos y negativos. La expresión de los genes *nod* es inhibida por ciertos compuestos fenólicos (Firmin et al. 1986). Por otro lado, se han identificado genes reguladores como NolA de *B. japonicum* requerido para la nodulación genotípico-específica de soya (Sadowsky et al. 1991) que actúa como represor de la expresión de genes *nod* (Dockendorff et al. 1994) al activar a *nodD2* el cual luego reprime la expresión de genes *nod*. En *S. meliloti*, NolR reprime la transcripción de los genes *nodD1*, *nodD2* y *nodABC* mediante la unión a sus promotores traslapados. De esta forma, NolR evita la sobreproducción de los factores de nodulación (Kondorosi et al. 1991).

Otro sistema regulatorio controlado por flavonoides es el de *nolX* de *R. fredii* USDA257 que carece de caja *nod* pero depende de *nodD* (Bellato et al. 1996). El gen *nodZ* de *B. japonicum* también carece de caja *nod* y su expresión no depende de NodD. La expresión de *nodZ* es constitutiva bajo condiciones aeróbicas y aneróbicas y además, tiene

altos niveles de expresión en bacteroides. Esto sugiere que otro(s) reguladores simbióticos desconocido(s) estaría(n) involucrados (Stacey et al. 1994).

Los genes *nodVW* se encuentran sólo en *B. japonicum* (que además tiene los genes *nodD1* y *nodD2*) y son requeridos para la nodulación de huéspedes alternativos de *B. japonicum* como *Macroptilium atropurpureum* y *Vigna unguiculata* (Göttfert et al. 1990). Se ha sugerido que estas plantas excretan inductores que interactúan con *nodVW*. NodV posee una secuencia de aminoácidos similar a una quinasa sensora que responde a una señal de la planta aún no identificada. Posteriormente, NodV fosforila a NodW el cual es un regulador de la respuesta (Loh et al. 1997).

-Respuesta de defensa de la planta frente a microbios

Las plantas están formadas de células inmóviles embebidas en paredes celulares rígidas por lo que a migración de células especiales de defensa a sitios de invasión microbiana, como ocurre en animales, es imposible. En su lugar, los sistemas de defensa de las plantas han evolucionado de tal forma que las células han adquirido la capacidad de responder a las infecciones y desarrollar una respuesta de defensa. Como consecuencia, las plantas son resistentes a la mayoría de los patógenos potenciales en su medio ambiente y existen relativamente pocos pares huésped-patógeno respecto al total de casos posibles en los que la planta es susceptible y el patógeno virulento.

Los elementos típicos del complejo de defensa producido después de una infección microbiana incluyen (Ebel y Mithöfer 1998):

- el colapso de las células vegetales, denominado respuesta hipersensible;
- la producción de especies reactivas de oxígeno;
- la activación de genes relacionados con la defensa;
- cambios estructurales en la pared celular; y
- síntesis de fitoalexinas.

Estas defensas localizadas ocurren en el sitio de ataque y resultan en lesiones restringidas delimitadas por tejido saludable. Además, la resistencia sistémica adquirida es activada en muchas plantas, el cual aumenta de forma transitoria la resistencia de la planta a algún ataque posterior. Las plantas detectan a los patógenos potenciales al percibir las sustancias químicas en su medio ambiente. Estas sustancias son reconocidas como compuestos señales por un sistema de percepción que presenta alta sensibilidad (aproximadamente 10^{-9} M o aún menos, Boller 1995).

Como se mencionó antes, las fitoalexinas que incluyen compuestos como los flavonoides y terpenoides, entre otros (Phillips y Kapulnik 1995), están involucradas en la defensa contra un patógeno potencial. Muchos patógenos tienen mecanismos para detoxificar estos compuestos, sin embargo los patógenos raramente prosperan en su presencia. La estrecha relación entre fitoalexinas y la supresión de una enfermedad ha sido confirmada al transferir los genes necesarios para degradar fitoalexinas de chícharo (pisatina) a un hongo patógeno del maíz pero no de chícharo y convertirlo en patógeno de chícharo (Schäfer et al. 1989).

Aunque las plantas pueden expresar los genes para la producción de fitoalexinas en condiciones asépticas (Tiller et al. 1994), ciertos oligosacáridos (con galactosa, glucosa y glucosamina) aumentan la expresión de estos genes (Junghans et al. 1993). El término estimulador se refiere a sustancias de diversa estructura química que han mostrado poseer la habilidad de activar varias reacciones de defensa. Entre ellas se incluyen componentes de la superficie celular, así como metabolitos excretados entre los que se encuentran oligosacáridos, glicoproteínas o ácidos grasos. En el caso de *Rhizobium* sp y *Bradyrhizobium* sp, producen un factor de nodulación (lipo-oligoglucosamina) inducible (Dénarié et al. 1992) y en el caso de *B. japonicum* produce constitutivamente un glucano cíclico (Miller et al. 1994) que actúan como estimuladores.

Por ejemplo, en soya se observó una fuerte acumulación de compuestos isoflavonoides, especialmente hidroxifaseolina asociada a la respuesta hipersensible (Keen

y Kennedy 1974). La hidroxifaseolina tienen propiedades antibacteriana entre 25 y 100 partes/10⁶ *in vitro*, mientras que los niveles de isoflavonoides de las plantas resistentes son mucho más altos en exceso de 1000 partes/10⁶ en el caso de la hidroxifaseolina. Cuando las poblaciones bacterianas localizadas en los espacios intercelulares llegan a nivel suficiente, las células adyacentes del huésped aumentan su producción de isoflavonoides y de esta forma restringen el crecimiento bacteriano y producen células necróticas. Se establecería un equilibrio entre poblaciones bacterianas y la respuesta de isoflavonoides. Tal interpretación es consistente con las observaciones que sugieren que la hidroxifaseolina es bacteriostática en lugar de bactericida.

Kado y Heskett (1970) señalan que muchas sustancias actúan sinérgicamente para producir un efecto antibacteriano, por lo tanto no puede concluirse que un compuesto carece de efecto fisiológico basado sólo en la ausencia de actividad antibacteriana bajo condiciones específicas *in vitro*. Puede ocurrir además, que la limitada solubilidad en agar de ciertos compuestos como los cumestanos (que incluye al cumestrol) no refleje el verdadero efecto que tendría en el suelo donde otros compuestos, como las saponinas podrían aumentar la solubilidad aunque es difícil discriminar entre este efecto y la propia acción antibiótica que poseen las saponinas.

Existen evidencias sobre la producción de fitoalexinas isoflavonoides promovidas por hongos y bacterias mutualistas (Hirsch y Kapulnik 1998). En la simbiosis entre *Glomus* (hongo) y soya se observó un aumento en los niveles de daidzeína, gliceolina y cumestrol en el extracto de raíz de soya (Morandi et al. 1984) y se observó que daidzeína (Kape et al. 1992) y algunos flavonoides (Tsai y Phillips 1991) estimulan la germinación de las esporas de *Glomus* a concentraciones μM en condiciones *in vitro*. Es decir, tanto en mutualismo como en patogénesis hay una mayor producción de fitoalexinas pero aún en presencia de estos compuestos algunos microorganismos pueden sobrevivir por lo que se supone que los microorganismos tolerantes crearían sus propias condiciones que los benefician. En relación a este efecto es posible plantear ciertas cuestiones que aún no han

sido aclaradas. Las distintas cantidades y tipos de flavonoides determinarían que una interacción resulte patógena o mutualista; o bien, el tipo de interacción sería determinada por los estimuladores, los cuales serían diferentes para cada tipo de relación o se determinaría por otro(s) mecanismo(s) aún no descritos.

2-ANTECEDENTES DIRECTOS Y OBJETIVOS

El interés inicial de este proyecto fue estudiar las etapas tempranas de la interacción entre *R. etli* y *P. vulgaris* mediante la búsqueda de genes expresados en presencia de compuestos liberados por raíces de frijol. Durante el proyecto de Maestría, se analizó un banco de 3000 mutantes derivadas de *R. etli* CFN42 construido mediante mutagénesis al azar con el transposón Tn5-B30 (Simon et al. 1989). Dicho transposón contiene al gen de la neomicina fosfotransferasa como gen reportero. Se identificaron cuatro mutantes con inserción del transposón en genes inducidos por exudado de raíz. Se estudió el fenotipo de las cuatro cepas en relación a su capacidad de crecimiento en medio mínimo, su perfil de lipopolisacáridos, su movilidad sobre agar y su perfil de factores de nodulación. Ninguna de estas características fenotípicas mostraron diferencias significativas comparadas con la cepa silvestre. Tres de estas mutantes, CFNEA3, CFNEB3 y CFNEB18, tienen el transposón insertado en el cromosoma y la cuarta, CFNEA31, tiene la inserción en el plásmido b (pb).

Un fragmento *HindIII-HindIII* de 1.7 kb del pb de la cepa CFNEA31 (Fig. 2, artículo) conteniendo al transposón Tn5-B30 fue clonado en el vector pUC18 con el fin de obtener la secuencia de bases en la región vecina a la inserción. Además, con este fragmento se determinó, la localización de las secuencias silvestres del gen mutado en los fragmentos 1.3 y 5.6 kb del pCOS126 construido por Cava et al. (1989) al estudiar lipopolisacáridos involucrados en simbiosis. Debido a que dicha mutante mostró un menor número de nódulos en ensayos de nodulación con plantas de frijol, lo cual indica que el gen mutado está involucrado en simbiosis, se decidió analizar la mutante CFNEA31 en detalle. Las secuencias parciales obtenidas mostraron que se trataba de un gen con similitud significativa a genes que codifican a proteínas involucradas en el transporte de compuestos tóxicos conocidas como proteínas de resistencia a multidroga de bacterias patógenas, en particular de *E. coli*.

El objetivo general del proyecto de Doctorado fue la caracterización y análisis de secuencias genómicas de *Rhizobium* que se expresen en presencia de exudado de raíz de leguminosas con el fin de contribuir al conocimiento sobre los procesos que participan en etapas tempranas de la interacción planta-bacteria. Se eligió como modelo de estudio la relación simbiótica entre *R. etli* y *P. vulgaris*.

Los objetivos particulares fueron los siguientes:

-Obtención de la secuencias de bases de la región vecina a la inserción del transposón para analizarla y determinar cuales son los genes involucrados en transporte.

Los sistemas de transporte que dan resistencia a multidroga en bacterias Gram-negativas generalmente presentan un gen que codifica una proteína integral de membrana y otro gen que codifica una proteína periplásmica unida a la membrana interna que fusiona a las membranas interna y externa. A este esquema básico se puede agregar un gen que codifica una proteína regulatoria, ubicada arriba o abajo de los genes antes mencionados y, en algunos casos, un cuarto gen que codifica a una porina de membrana externa (Lewis 1994). Teniendo en cuenta este esquema general era necesario obtener la secuencia de las regiones próximas al gen mutado.

Se obtuvo la secuencia de 800 pb debajo de *rnrB* con el objeto de buscar algún marco de lectura. En el análisis, se encontró un gen, *orf5*, cuya secuencia deducida de aminoácidos presenta similitud con LacX, una proteína de *Lactococcus lactis* de función desconocida (I: 26%, S: 46% en 182 aa; la probabilidad que el parecido sea por azar es 4.0×10^{-16}) (no. de acceso: P42096). El gen *lacX* en *L. lactis* es el último gen de un operón inducible por lactosa, constituido por los genes *lacF-lacE-lacG-lacX*, en el cual los 2 primeros codifican a un sistema de fosfotransferasas y el tercero, a una fosfo- β -galactosidasa. Del análisis de esta región se puede concluir que existe un gen que codifica para una proteína posiblemente involucrada con el metabolismo de la lactosa y que debido a

su orientación (opuesta a *rmrAB*) y a la presencia de un potencial terminador (AAGCCCTCCTTTATCCGGAAAGGAGGGCTT) debajo de *rmrB*, el *orf5* no codificaría a ninguna proteína conocida relacionada con las proteínas RmrA y RmrB; por lo cual, el operón *rmrAB* no incluiría un tercer gen.

-Identificación de los compuestos tóxicos a los cuales los genes *rmrAB* otorgan resistencia.

Se realizaron diversos experimentos con el objeto de identificar los compuestos tóxicos. Debido a que:

-la mayor similitud de las proteínas codificadas por los genes *rmrAB* se observó con las proteínas EmrA y EmrB que dan resistencia a compuestos de alta hidrofobicidad (Lomovskaya y Lewis 1992);

-en el grupo de posibles compuestos exudados por las raíces de frijol se ha reportado efecto antimicrobiano en el caso de compuestos del tipo flavonoide (que poseen carácter hidrofóbico);

-el operón *emr* de *E. coli* es inducido por el mismo tipo de compuestos al que da resistencia (Lewis 1994) y como el operón *rmrAB* es inducido por flavonoides, diversos flavonoides fueron ensayados en primer término. Los resultados se presentan en la Fig. 1 del artículo.

-Complementación de la mutación en la cepa CFNEA31.

Se intentó la clonación de un fragmento de 3 kb del pb obtenido por PCR que contiene los genes *rmrAB* y *orfR* en distintos vectores de clonación. En ningún caso se obtuvo el fragmento clonado. Una de las causas posibles pudo haber sido que la sobreexpresión de estos genes es tóxica para la célula. Este efecto tóxico fue observado en *E. coli* con los genes *emrAB* (Lomovskaya, comunicación personal). Debido a esto, se

Research Note

Multiresistance Genes of *Rhizobium etli* CFN42

Ramón González-Pasayo^{1,2} and Esperanza Martínez-Romero¹

¹Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, and ²Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos, México

Accepted 12 January 2000.

Multidrug efflux pumps of bacteria are involved in the resistance to various antibiotics and toxic compounds. In *Rhizobium etli*, a mutualistic symbiont of *Phaseolus vulgaris* (bean), genes resembling multidrug efflux pump genes were identified and designated *rmrA* and *rmrB*. *rmrA* was obtained after the screening of transposon-generated fusions that are inducible by bean-root released flavonoids. The predicted gene products of *rmrAB* shared significant homology to membrane fusion and major facilitator proteins, respectively. Mutants of *rmrA* formed on average 40% less nodules in bean, while mutants of *rmrA* and *rmrB* had enhanced sensitivity to phytoalexins, flavonoids, and salicylic acid, compared with the wild-type strain. Multidrug resistance genes *emrAB* from *Escherichia coli* complemented an *rmrA* mutant from *R. etli* for resistance to high concentrations of naringenin.

Rhizobia form nitrogen-fixing nodules on the roots of legumes. Nodule formation is a complex process that is initiated with the release of flavonoids by the legume root and these compounds induce the expression of *Rhizobium* spp. symbiotic genes (Hanin et al. 1999; Perret et al. 1999). In the interaction with symbionts, such as mycorrhizae (Hirsch and Kapulnik 1998) and rhizobia (Baron and Zambryski 1995; Spaink 1995), some of the plant defense responses are triggered. For example, legumes produce phytoalexins in response to various biological, chemical, or physical stresses (Kuc 1995) as well as to the presence of rhizobia (Dakora et al. 1993; Schmidt et al. 1994; Wolff and Werner 1990). These bacteria can survive antibacterial concentrations of phytoalexins either by acquired resistance (Parniske et al. 1991) or by their ability to catabolize these compounds (Rao and Cooper 1994).

In *Phaseolus vulgaris* (bean), flavonoid phytoalexins such as phaseollin, phaseollinisoflavan, phaseollidin, kievitone, and coumestrol increase upon wounding, by abiotic stresses, and also in response to viruses or pathogenic rhizobacteria (Dixon

1986). *R. etli* exopolysaccharide (EPS⁻) or lipopolysaccharide (LPS⁻) mutants display enhanced sensitivity to coumestrol and other coumestans from bean roots, indicating that EPS and LPS may act as barriers to restrain the entry of root inhibitory compounds into *Rhizobium etli* cells (Eisenschenk et al. 1994). In addition, *R. etli* EPS and LPS have been implicated in actively suppressing the plant defense response (Niehaus et al. 1993). Salicylic acid is another phenolic compound that has been implicated in plant defense against pathogens (Klessig and Malamy 1994). *R. meliloti* nodulation factors have been reported to inhibit the salicylic acid-mediated defense response in alfalfa (Martínez-Abarca et al. 1998).

The main *P. vulgaris* nodule isolates in Mesoamerica are *R. etli* strains (Segovia et al. 1993). Here, we describe the identification in *R. etli* of genes resembling the multidrug resistance (MDR) loci from microbial pathogens and present their structural and functional characterization. We also propose a role for the *rmrAB* (*Rhizobium* multiresistance) gene products in phytoalexin and salicylic acid resistance in *R. etli*.

R. etli CFN42 derivatives carrying Tn5-B30 (Simon et al. 1989) with a promoterless *npII* reporter gene were obtained by mating *Escherichia coli* S17-1 (Simon et al. 1983) containing pSUP102::Tn5-B30 with strain CFN42 (Table 1). The *R. etli* CFN42 mutants were tested for growth in modified PY media (0.25% peptone, 0.15% yeast extract, and 7 mM CaCl₂) containing different kanamycin concentrations in the presence or absence of root exudates (obtained as described by Rosenblueth et al. 1998) or with naringenin (1.2 μM). Naringenin, genistein, and other flavonoids are inducers of *R. etli* nodulation genes and have been found in bean exudates (Hungria et al. 1991). Bacteria that grew in the presence of bean root exudates or naringenin but not in their absence were considered to be mutated on genes up-regulated by root exudates or flavonoids. A mutant, CFNEA31, whose growth on kanamycin (100 μg ml⁻¹) was dependent on naringenin (1.2 μM) but also on genistein (0.4 μM), quercetagenin (1.0 μM), or chrysin (1.0 μM), was selected for further analysis. The flavonoid-dependent growth of CFNEA31 was also estimated in liquid MM containing kanamycin by measuring cell densities at OD₆₀₀. The MM had the following composition (per liter of demineralized water): sucrose, 2 g; K₂HPO₄, 0.17 g; MgSO₄, 0.25 g; KNO₃, 0.01 g; KH₂PO₄, 1.0 g; NaCl, 0.16 g; Fe citrate, 1.2 g; CaCl₂, 1.2 g; biotin, 10 μg; and trace minerals (Fahraeus 1957). In two separate experiments, we found significantly higher growth in kanamycin in the presence of genistein (5 μM) than in its absence ($P < 0.01$; Fig. 1). Cell

Corresponding author: Esperanza Martínez-Romero; Address: Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos, México; Telephone: (52) (73) 13 16 97; Fax: (52) (73) 17 55 81; E-mail: martine@cifn.unam.mx

Nucleotide and/or amino acid sequence data can be found at the GenBank data base as accession no. AF233286.

growth studies also included cultures of strain CFNEA31 grown in the absence of kanamycin. The addition of genistein up to 5 μ M did not affect growth of the wild-type strain CFN42 in MM.

The location of the Tn5-B30 insertion in the CFNEA31 genome was determined with the plasmid-cured CFN42 derivatives CFNX182 and CFNX183 (Brom et al. 1992). In a Southern blot hybridization, the flanking sequences of the insert (cloned in pUC18) hybridized to CFNX182 but not to CFNX183 (cured of plasmid b). Hybridization was also obtained to cosmid pCOS126 (Cava et al. 1989) from CFN42 plasmid b (which carries LPS genes; Sambrook et al. 1989) and localized to two *Eco*RI fragments of 1.3 and 5.6 kb (Fig. 2A), which were subsequently cloned and used for sequencing. The 1.3-kb DNA fragment and a 3.7-kb fragment from the 5' end of the 5.6-kb subclone were sequenced by primer walking with a 373A automated DNA sequencer and *Taq* DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing kits (Applied Biosystems, Foster City, CA). The flanking regions of Tn5-B30 obtained from CFNEA31 were sequenced and their alignment with the wild-type sequence derived from pCOS126 subclones allowed us to determine that the Tn5-B30 in CFNEA31 was inserted 299 bp downstream of the start codon of an open reading frame (ORF1) of 1,191 bp. ORF1 is preceded by a potential ribosomal binding site (RBS) and encodes a predicted 41.8-kDa protein that was compared with protein sequences in the NCBI data bases with the BLAST program (Altschul et al. 1990) and pairwise alignments with GCG Gap (Henikoff and Henikoff 1992) to estimate the identity (I) and similarity (S) scores. Homology was observed over the entire length of the ORF1 putative protein with the *EmrK* (accession no. P52599) and *EmrA* (accession no. 27303) multiresistance proteins from *E. coli* (34.3% I, 53.5% S and 34.0% I, 52.1% S, respectively), the *VceA* protein from *Vibrio cholerae* (31.7% I, 50.0% S) (accession no. 2815577), and the *EmrA* protein from *Haemophilus influenzae* (29.8% I, 49.7% S) (accession no. P44928).

An ORF of 1,581 bp (ORF2) was found downstream of ORF1 (Fig. 2A) in the same orientation. ORF2 was also preceded by a potential RBS and encoded a predicted 56.1-kDa protein with homology over their entire lengths to *VceB* from *V. cholerae* (29.3% I, 55.6% S) (accession no. 2815578),

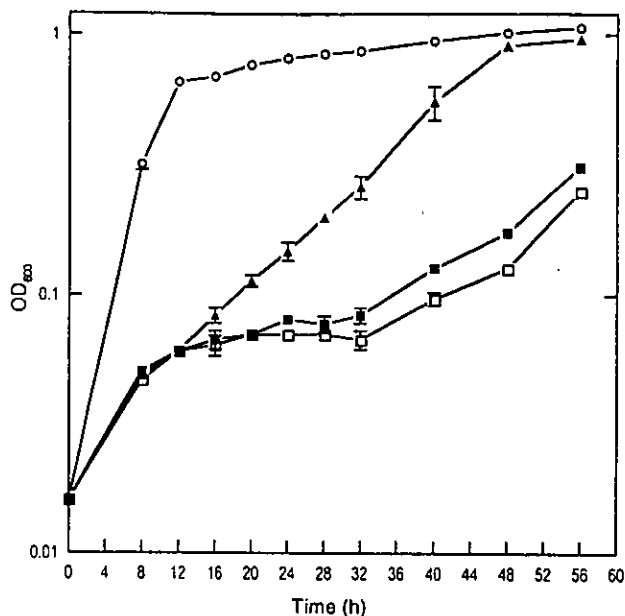


Fig. 1. Growth dependence of CFNEA31 mutant on genistein in the presence of kanamycin. Growth of CFNEA31, carrying the *nptII* kanamycin resistance gene as a promoter probe from Tn5::B30, was screened by testing kanamycin (100 μ g/ml) resistance with genistein 1 μ M (■), 5 μ M (▲), or without genistein (□). As a control, growth of CFNEA31 without kanamycin was measured (○). Statistical significance of differences between treatments was determined with a *t* test ($P < 0.01$). Growth was measured by increase of OD₆₀₀ (optical density at 600 nm); values are means from three replicates \pm standard errors represented by bars.

Table 1. Bacterial strains and plasmids

Strain or plasmid	Characteristics ^a	Reference
Strain		
<i>Rhizobium etli</i>		
CFN42	Wild type, Nal ^r	Segovia et al. 1993
CFNX182	CFN42 cured of plasmid a, pa	Brom et al. 1992
CFNX183	CFN42 cured of plasmid b, pb	Brom et al. 1992
CFNEA31	CFN42 <i>rmrA</i> ::Tn5-B30, Tc ^r	This study
CFNEA32	CFNEA31 harboring pCOS126, Tc ^r	This study
CFNEA31pLAFR1	CFNEA31 harboring pLAFR1, Tc ^r	This study
CFNEA33	CFNEA31 harboring pRK7813 <i>emrAB</i> , Tc ^r	This study
CFNEA31pRK7813	CFNEA31 harboring pRK7813, Tc ^r	This study
CFNEA34	CFN42 <i>rmrA</i> ::pWS233	This study
CFNEA35	CFN42 <i>rmrB</i> ::pWS233	This study
<i>Escherichia coli</i>		
DH5a	<i>rec A1</i> , Δ <i>lacZ</i> , Nal ^r	Sambrook et al. 1989
S17-1	Modified RP4 integrated into chromosome	Simon et al. 1983
Plasmids		
pLAFR1	Broad-host-range cloning vector, Tc ^r	Friedman et al. 1982
pCOS126	27 kb of CFN42 pb in pLAFR1	Cava et al. 1989
pRK7813	Broad-host-range cosmid vector, Mob, IncP, Tc ^r	Jones and Gutterson 1987
pSE380 <i>emrAB</i>	pSE380 vector carrying <i>emrAB</i>	O. Lomovskaya, unpublished
pRK <i>emrAB</i>	pRK7813 vector carrying <i>emrAB</i>	This study
pSUP102	Containing Tn5-B30, Tc ^r	Simon et al. 1989
pUC18	Multicopy cloning vector	Messing 1983
pWS233	Cloning vector, <i>sacRB</i> , Gm ^r , Tc ^r	Selbitschka et al. 1993

^a Gm, gentamicin; Nal, nalidixic acid; Sm, streptomycin; Tc, tetracycline; sac, levansucrase gene; r, resistant.

EmrB from *E. coli* (28.2% I, 53.2% S) (accession no. 27304), EmrB from *H. influenzae* (26.3% I, 53.8% S) (accession no. P44927), and EmrY from *E. coli* (25.5% I, 53.4% S) (accession no. 52600). These proteins exhibited the greatest degree of sequence similarity in their N-terminal regions. This feature was found in previous analyses of MDR proteins (Marger and Saier 1993; Paulsen and Skurray 1993) and it was suggested that the conserved sequence may be involved in common functions, such as proton translocation, while specialized functions, such as substrate binding, are encoded by the C-terminal regions (Rouch et al. 1990). The drug extrusion consensus (GxhhGPxIGG, with "x" as any amino acid; and "h" as hydrophobic; upper case, high frequency of occurrence), a highly conserved motif of exporters of the major facilitator superfamily (Lewis 1994; Marger and Saier 1993; Paulsen and Skurray 1993), was identified within the ORF2 protein sequence.

A nucleotide sequence similar to the *E. coli* and *B. japonicum* σ^{70} (the major sigma factor used for normal growth conditions in *E. coli*) consensus binding sequence (Beck et al. 1997; Lisser and Margalit 1993) was identified upstream of ORF1. This sequence is identical to the -35 *E. coli*/*B. japonicum* region and five out of six nucleotides of the -10 site were conserved (Fig. 2B). An additional feature of this region is a dyad symmetry at the 5' end of ORF1, which may be a regulatory palindrome. Neither promoter sequence nor putative transcription terminator were found immediately upstream of ORF2 and the distance between the TAG translation stop codon of ORF1 and the ATG translation initiation codon of ORF2 is 24 bp, suggesting that the two genes could be organized into an operon. Moreover, a potential transcription terminator (AAGCCCTCCTTTATCCGGAAGGAGGGCTT) was found downstream of ORF2. No *nod* box (Rostas et al. 1986) or A3-like sequence (Mao et al. 1994) was identified in 400 bp upstream of ORF1.

A hydrophobicity analysis was performed with the Gene Works package (release 2.4; IntelliGenetics, Mountain View, CA) (Kyte and Doolittle 1982) and Psort program (Nakai and Kanehisa 1991) to examine the predicted proteins for potential hydrophobic and hydrophilic regions. The ORF1 putative protein showed a hydrophobic domain at the amino terminal region, forming a single α -helix that spans the membrane (between amino acids 54 and 70) and a large, hydrophilic, C-terminal domain that could be located in the periplasm. This hydropathy pattern is conserved in EmrA (Lomovskaya and Lewis 1992) and in VceA (Colmer et al. 1998). In the case of the ORF2 putative protein, the analysis revealed 14 hydrophobic domains that may form transmembrane α -helical segments, which is a pattern also conserved in EmrB (Lomovskaya and Lewis 1992) and VceB (Colmer et al. 1998) (data not shown).

Based on the similarity in sequence, length, hydropathy plots, and proteins encoded by genes adjacent to EmrA and VceA, the protein encoded by ORF1 was included in the membrane fusion protein (MFP) family and designated RmrA (*Rhizobium* multiresistance gene A). The MFPs may cause fusion of the inner and outer membranes, as proposed by Saier et al. (1994). Based on its similarity at the amino acid level with EmrB, the hydropathy profile, and the presence of the extrusion consensus sequence, the ORF2 putative protein may be included in the major facilitator superfamily (Pao et al.

1998), in particular, the drug-resistance protein family (Griffith et al. 1992; Marger and Saier 1993), and was therefore named RmrB. This group of transporter proteins share a common structure and function. They are integral membrane proteins with 12 to 14 transmembrane segments and they confer drug efflux driven by proton motive force (Marger and Saier 1993).

A third ORF of 357 bp, oriented in the opposite direction and named ORFR, was also identified 136 bp upstream of *rmrA* (Fig. 2A). Analysis of the protein sequence deduced from ORFR showed that it encodes a putative 13.0-kDa protein that is similar to members of the TetR-AcrR family (Hinrichs et al. 1994). ORFR product contains a helix-turn-helix motif similar to that of proteins that exert transcriptional control. Upstream of ORFR, an RBS was localized, as well as a potential promoter (Fig. 2B). This potential promoter overlaps the *rmrA* upstream sequence between the ATG start codon and putative promoter of *rmrA*. This organization is similar to that of the *qacA* gene (encoding an efflux transporter of quaternary ammonium antiseptics and some basic dyes in *Staphylococcus aureus*) and its putative regulator, ORF188 (Rouch et al. 1990). The protein encoded by ORFR could be involved in regulating *rmrAB* but this possibility remains to be tested.

With the *sacRB*-containing vector, pWS233, (Selbitschka et al. 1993) two additional mutants of *R. elli* CFN42 (CFNEA34 and CFNEA35) were obtained by mutagenesis of *rmrA* and *rmrB* genes, respectively (Table 1). The mutant strains (CFNEA31, CFNEA34, and CFNEA35) and the wild-type strain CFN42 had identical growth rates in PY medium (per liter: 5 g of peptone, 3 g of yeast extract, and 1 g of CaCl₂·H₂O) and MM media (data not shown).

The bean-nodulating ability of strains CFNEA31, CFNEA31 (pLAFR1; see below for the details of genetic construction), and CFNEA34 was diminished, compared with the wild-type strain ($P < 0.01$) and was restored in CFNEA32, which contains the plasmid pCOS126 (Fig. 3). In three independent experiments, *rmrA* mutants CFNEA31 and CFNEA34 produced an average of 40% less nodules, when compared with the wild-type strain. A smaller decrease in nodulation was observed with CFNEA35 (data not shown). The nodules were otherwise morphologically unaltered and fixed nitrogen. CFNEA31 produced Nod factors identical to those of the wild-type strain and its LPS profiles and motility were unaltered (data not shown).

To study the role of the RmrAB with regard to tolerance to toxic compounds we used different compounds at concentrations that may be toxic in MM plates and liquid MM. On plates with MM, CFNEA31 was unable to grow in the presence of 0.2 mM phaseollin and 0.1 mM phaseollidin while growth of CFN42 was obtained. In liquid MM, in experiments similar to those performed when determining minimal inhibitory concentration (Colmer et al. 1998), there was no growth of strains CFNEA31, CFNEA34, and CFNEA35 in the presence of 735 μ M naringenin, 1.2 mM coumaric acid, or 725 μ M salicylic acid. In contrast, the wild-type strain grew even at higher concentrations of these compounds (1.1 mM naringenin, 1.8 mM coumaric acid, or 3.6 mM salicylic acid). The 4-kb *EcoRI*-*HindIII* fragment of pSE380*emrAB* (*O. Lomovskaya, unpublished*) containing *emrAB* from *E. coli* was cloned into pRK7813 (Jones and

Gutterson 1987), yielding pRK*emrAB*. The cosmids pLAFR1 and pCOS126 and the plasmids pRK7813 and pRK*emrAB* were transferred to CFNEA31 in matings from *E. coli* S17-1. Transconjugants were selected in PY medium supplemented with 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ nalidixic acid and 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ tetracycline. CFNEA31 complemented with pCOS126 (strain CFNEA32) or with pRK*emrAB* (strain CFNEA33) grew in the presence of 300 $\mu\text{g ml}^{-1}$ naringenin, as did the wild-type controls, while the growth of CFNEA31 with either pLAFR1 or pRK7813 was completely inhibited. These complementations suggest a functional similarity between the products of the *E. coli emrAB* genes and of the *rmrAB* locus of *R. etli* CFN42.

The MDR system is found mostly in pathogens and to our knowledge has not been previously described in rhizobia. *Agrobacterium tumefaciens*, a pathogen related to rhizobia, forms tumors on a variety of dicotyledonous plants. This pathogen possesses an efflux pump inducible by alfalfa isoflavonoids that is required for competitive colonization of the bacteria of alfalfa roots (Palumbo et al. 1998). Our findings support the notion discussed by Saier et al. (1998) that the MDR systems have not arisen recently as a result of extensive exposure of microorganisms to drugs and that they play important physiological roles in the extrusion of natural toxic substances. We propose that *rmrAB* encodes an inducible export system that prevents the accumulation of toxic plant compounds within the bacterial cell, thereby conferring an advantage to *R. etli* for bean nodulation.

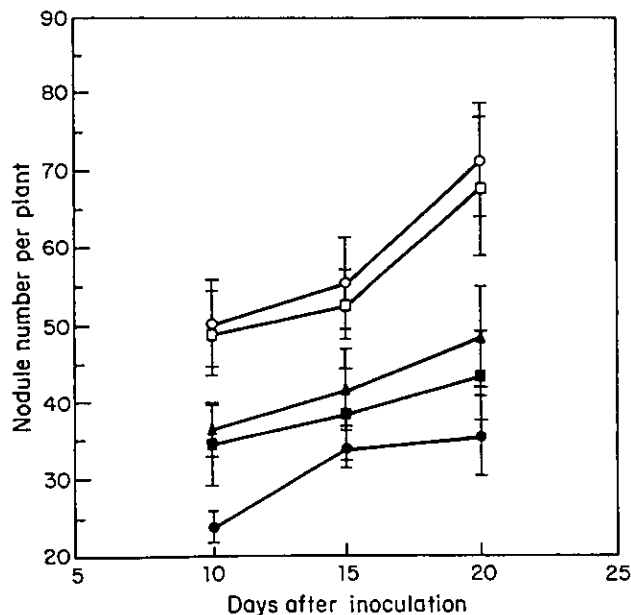


Fig. 3. Nodule numbers per plant of CFN42 (O), CFNEA31 (▲), CFNEA32 (CFNEA31 complemented with pCOS126, □), CFNEA34 (●), and CFNEA31 (pLAFR1) (■) on beans. Seeds of *Phaseolus vulgaris* cv. Negro Jamapa or N-8-116 were surface sterilized. Two-day-old seedlings were transferred to 250-ml Erlenmeyer flasks containing agar or vermiculite with nitrogen-free Fahraeus medium (Fahraeus 1957). One hundred microliters with around 10^6 cells of each bacterial suspension was used per plant as inoculum. Mean number of nodules from five plants was determined at 10, 15, or 20 days post inoculation. Statistical significance of differences between treatments was determined with a *t* test ($P < 0.01$). Bars represent standard errors. Two independent plants assays were performed; data for one experiment are presented.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Patricia Bustos for DNA sequencing, Paul Gaytan and Eugenio López for the synthesis of the oligonucleotides, Juan Miranda, Brenda Valderrama, and Ernesto Pérez-Rueda for advice and critical comments, Mónica Rosenblueth for cloning the 1.7-kb *HindIII* fragment into pUC18, Ivonne Toledo for technical assistance, Julio Martínez-Romero for statistical analysis, and Michael Dunn and Les Barran for critically reading the manuscript. R. G. P. was supported by DGAPA fellowship (Facultad de Ciencias, UNAM) and PADEP-UNAM. We also thank O. Lomovskaya for providing pSE380*emrAB*. Partial financial support was from DGAPA grant IN202097.

LITERATURE CITED

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Baron, C., and Zambryski, P. C. 1995. The plant response in pathogenesis, symbiosis, and wounding: Variations on a common theme? *Annu. Rev. Genetics* 29:107-129.
- Beck, C., Marty, R., Klausli, S., Hennecke, H., and Gottfert, M. 1997. Dissection of the transcription machinery for housekeeping genes of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 179:364-369.
- Brom, S., García de los Santos, A., Stepkowsky, T., Flores, M., Dávila, G., Romero, D., and Palacios, R. 1992. Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* are required for optimal symbiotic performance. *J. Bacteriol.* 174:5183-5189.
- Cava, J. R., Elias, P. M., Turowski, D. A., and Noel, K. D. 1989. *Rhizobium leguminosarum* CFN42 genetic regions encoding lipopolysaccharide structures essential for complete nodule development on bean plants. *J. Bacteriol.* 171:8-15.
- Colmer, J. A., Fralick, J. A., and Hamood, A. N. 1998. Isolation and characterization of a putative multidrug resistance pump from *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 27:63-72.
- Dakora, F. D., Joseph, C. M., and Phillips, D. A. 1993. Common bean root exudates contain elevated levels of daidzein and coumestrol in response to *Rhizobium* inoculation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6: 665-668.
- Dixon, R. A. 1986. The phytoalexin response: Elicitation, signalling and control of host gene expression. *Biol. Rev.* 61:239-291.
- Eisenschenk, L., Diebold, R., Perez-Lesher, J., Peterson, A. C., Peters, N. K., and Noel, K. D. 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.
- Friedman, A. M., Long, S. R., Brown, S. E., Buikema, W. J., and Ausubel, F. M. 1982. Construction of a broad host range cosmid cloning vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium* mutants. *Gene* 18:289-296.
- Griffith, J. K., Baker, M. E., Rouch, D. A., Page, M. G., Skurray, R. A., Paulsen, I. T., Chater, K. F., Baldwin, S. A., and Henderson, P. J. 1992. Membrane transport proteins: Implications of sequence comparisons. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4:684-695.
- Hanin, M., Jabbouri, S., Broughton, W. J., Fellay, R., and Quesada-Vincens, D. 1999. Molecular aspects of host-specific nodulation. Pages 1-37 in: *Plant-Microbe Interactions*. Vol. 4. G. Stacey and N. T. Keen, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Henikoff, S., and Henikoff, J. G. 1992. Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915-10919.
- Hinrichs, W., Kisker, C., Duvel, M., Müller, A., Tovar, K., Hillen, W., and Saenger, W. 1994. Structure of the Tet repressor-tetracycline complex and regulation of antibiotic resistance. *Science* 264:418-420.
- Hirsch, A. M., and Kapulnik, Y. 1998. Signal transduction pathways in mycorrhizal associations: Comparisons with the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Fungal Genet. Biol.* 23:205-212.
- Hungria, M., Joseph, C. M., and Phillips, D. A. 1991. *Rhizobium nod* gene inducers exuded naturally from roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiol.* 97:759-764.
- Jones, J. D., and Gutterson, N. 1987. An efficient mobilizable cosmid vector, pRK7813, and its use in a rapid method for marker exchange in *Pseudomonas fluorescens* strain HV37a. *Gene* 61:299-306.

- Klessig, D. F., and Malamy, J. 1994. The salicylic acid signal in plants. *Plant Mol. Biol.* 26:1439-1458.
- Kuc, J. 1995. Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33:275-297.
- Kyte, J., and Doolittle, R. F. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157:105-132.
- Lewis, K. 1994. Multidrug resistance pumps in bacteria: Variations on a theme. *Trends Biochem. Sci.* 19:119-123.
- Lisser, S., and Margalit, H. 1993. Compilation of *E. coli* mRNA promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* 21:1507-1516.
- Lomovskaya, O., and Lewis, K. 1992. *emr*, an *Escherichia coli* locus for multidrug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:8938-8942.
- Mao, C., Downie, J. A., and Hong, G. 1994. Two inverted repeats in the *nodD* promoter region are involved in *nodD* regulation in *Rhizobium leguminosarum*. *Gene* 145:87-90.
- Marger, M. D., and Saier, M. H., Jr. 1993. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyze uniport, symport and antiport. *Trends Biochem. Sci.* 18:13-20.
- Martínez-Abarca, F., Herrera-Cervera, J. A., Bueno, P., Sanjuan, J., Biseling, T., and Olivares, J. 1998. Involvement of salicylic acid in the establishment of the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11:153-155.
- Messing, J. 1983. New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.* 101:20-78.
- Nakai, K., and Kanehisa, M. 1991. Expert system for predicting protein localization sites in Gram-negative bacteria. *Proteins* 11:95-110.
- Niehaus, K., Kapp, D., and Pühler, A. 1993. Plant defence and delayed infection of alfalfa pseudonodules induced by an exopolysaccharide (EPS I)-deficient *Rhizobium meliloti* mutant. *Planta* 190:415-425.
- Palumbo, J. D., Kado, C. I., and Phillips, D. A. 1998. An isoflavonoid-inducible efflux pump in *Agrobacterium tumefaciens* is involved in competitive colonization of roots. *J. Bacteriol.* 180:3107-3113.
- Pao, S. S., Paulsen, I. T., and Saier, M. H., Jr. 1998. Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:1-34.
- Pamiske, M., Ahlborn, B., and Werner, D. 1991. Isoflavonoid-inducible resistance to the phytoalexin glyceollin in soybean rhizobia. *J. Bacteriol.* 173:3432-3439.
- Paulsen, I. T., and Skurray, R. A. 1993. Topology, structure and evolution of two families of proteins involved in antibiotic and antiseptic resistance in eukaryotes and prokaryotes - an analysis. *Gene* 124:1-11.
- Perret, X., Freiberg, C., Rosenthal, A., Broughton, W. J., and Rémy, F. 1999. High-resolution transcriptional analysis of the symbiotic plasmid of *Rhizobium* sp. NGR234. *Mol. Microbiol.* 32:415-425.
- Rao, J. R., and Cooper, J. E. 1994. Rhizobia catabolize *nod* gene-inducing flavonoids via C-ring fission mechanisms. *J. Bacteriol.* 176:5409-5413.
- Rosenblueth, M., Hynes, M. F., and Martínez-Romero, E. 1998. *Rhizobium tropici* *teu* genes involved in specific uptake of *Phaseolus vulgaris* bean-exudate compounds. *Mol. Gen. Genet.* 258:587-598.
- Rostas, K., Kondorosi, E., Horvath, B., Simoncsits, A., and Kondorosi, A. 1986. Conservation of extended promoter regions of nodulation genes in *Rhizobium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:1757-1761.
- Rouch, D. A., Cram, D. S., DiBerardino, D., Littlejohn, T. G., and Skurray, R. A. 1990. Efflux-mediated antiseptic resistance gene *qacA* from *Staphylococcus aureus*: Common ancestry with tetracycline- and sugar-transport proteins. *Mol. Microbiol.* 4:2051-2062.
- Saier, M. H., Jr., Paulsen, I. T., Sliwinski, M. K., Pao, S. S., Skurray, R. A., and Nikaido, H. 1998. Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. *FASEB J.* 12:265-274.
- Saier, M. H., Jr., Tam, R., Reizer, A., and Reizer, J. 1994. Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol. Microbiol.* 11:841-847.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. A. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Schmidt, P. E., Broughton, W. J., and Werner, D. 1994. Nod factors of *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium* sp. NGR234 induce flavonoid accumulation in soybean root exudate. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7:384-390.
- Segovia, L., Young, J. P. W., and Martínez-Romero, E. 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:374-377.
- Selbitschka, W., Niemann, S., and Pühler, A. 1993. Construction of gene replacement vectors for Gram⁻ bacteria using a genetically modified *sacRB* gene as a positive selection marker. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38:615-618.
- Simon, R., Priefer, U., and Pühler, A. 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: Transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Bio/Technology* 1:784-791.
- Simon, R., Quandt, J., and Klipp, W. 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.
- Spaink, H. P. 1995. The molecular basis of infection and nodulation by rhizobia: The ins and outs of sympathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33:345-368.
- Wolff, A. B. and Werner, D. 1990. Defense reactions in *Rhizobium-legume* symbiosis: Phytoalexin concentration in *Vicia faba* nodules is affected by the host genotype. *Z. Naturforsch. C Biosci.* 45:958-962.

complementó a la mutante CFNEA31 con los genes *emrAB*, en un vector de bajo número de copias.

4-RESULTADOS ADICIONALES

Homología de las secuencias mutadas y fenotipo simbiótico de las mutantes de *R. etli* con inserción cromosomal del Tn5-B30.

Al analizar las 3000 cepas mutantes derivadas de *R. etli* CFN42 con inserciones del transposón Tn5-B30 (Simon et al. 1989), cuatro de ellas mostraron inducción de la resistencia a kanamicina en presencia de exudado radical y flavonoides al expresar el gen *nptII* que codifica a la neomicina fosfotransferasa contenida en el transposón. Una de dichas mutantes, CFNEA31 fue analizado en detalle y los resultados se presentan en el artículo.

De las restantes tres inserciones localizadas en el cromosoma se analizaron algunas características fenotípicas y se obtuvo una secuencia parcial de bases de la región próxima a la inserción del Tn5-B30.

En la cepa CFNEA3, se observó una marcada reducción (35%) del número de nódulos en raíces de frijol en una cinética de nodulación donde se determinó el número de nódulos a los 10, 15 y 20 días posteriores a la nodulación (Fig. 3). La secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de bases obtenida mostró homología con el Orf3 de *S. meliloti* (Barnett y Long 1997) (no. de acceso: AAB63672). En una extensión de 50 bases la identidad (I) es del 50%, la similitud (S) es de 66% y la probabilidad que el parecido se deba al azar es de 2×10^{-6} por lo cual la similitud es significativa aunque se trata de una región corta entre los aminoácidos 92-141 del Orf3 que es una proteína de 451 aminoácidos. Cabe señalar que el Orf3 no presenta similitud significativa con ninguna secuencia de la base de datos GenBank. Sólo se sabe que se localiza en el plásmido

complementó a la mutante CFNEA31 con los genes *emrAB*, en un vector de bajo número de copias.

4-RESULTADOS ADICIONALES

Homología de las secuencias mutadas y fenotipo simbiótico de las mutantes de *R. etli* con inserción cromosomal del Tn5-B30.

Al analizar las 3000 cepas mutantes derivadas de *R. etli* CFN42 con inserciones del transposón Tn5-B30 (Simon et al. 1989), cuatro de ellas mostraron inducción de la resistencia a kanamicina en presencia de exudado radical y flavonoides al expresar el gen *nptIII* que codifica a la neomicina fosfotransferasa contenida en el transposón. Una de dichas mutantes, CFNEA31 fue analizado en detalle y los resultados se presentan en el artículo.

De las restantes tres inserciones localizadas en el cromosoma se analizaron algunas características fenotípicas y se obtuvo una secuencia parcial de bases de la región próxima a la inserción del Tn5-B30.

En la cepa CFNEA3, se observó una marcada reducción (35%) del número de nódulos en raíces de frijol en una cinética de nodulación donde se determinó el número de nódulos a los 10, 15 y 20 días posteriores a la nodulación (Fig. 3). La secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de bases obtenida mostró homología con el Orf3 de *S. meliloti* (Barnett y Long 1997) (no. de acceso: AAB63672). En una extensión de 50 bases la identidad (I) es del 50%, la similitud (S) es de 66% y la probabilidad que el parecido se deba al azar es de 2×10^{-6} por lo cual la similitud es significativa aunque se trata de una región corta entre los aminoácidos 92-141 del Orf3 que es una proteína de 451 aminoácidos. Cabe señalar que el Orf3 no presenta similitud significativa con ninguna secuencia de la base de datos GenBank. Sólo se sabe que se localiza en el plásmido

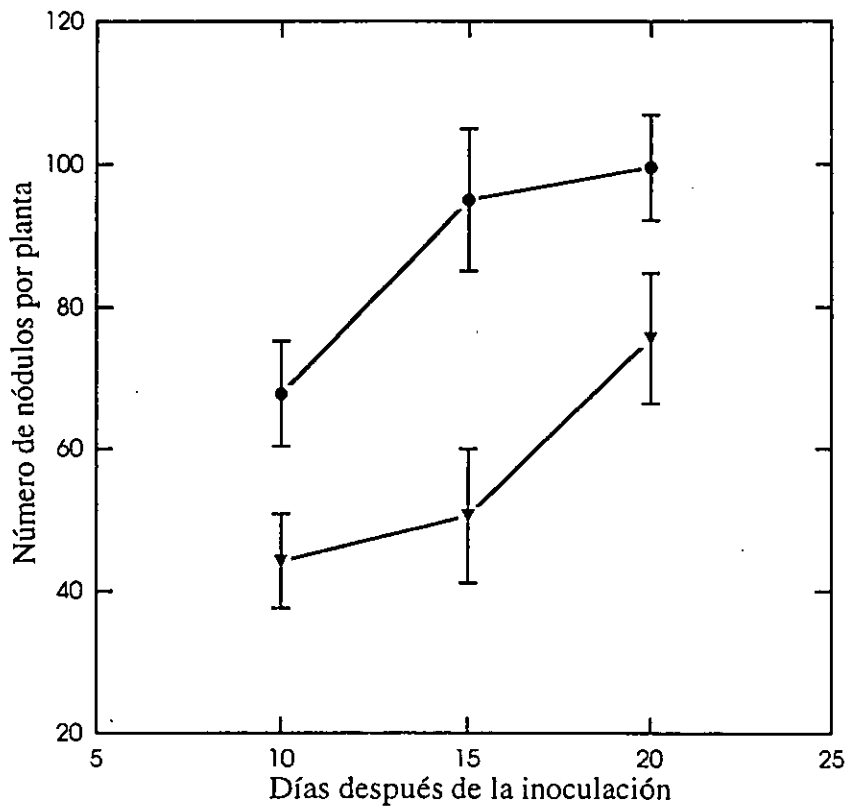


Fig. 3. Cinética de nodulación de *R. etli* CFN42 (●) y la cepa mutante CFNEA3 (▼). Las plantas de frijol (cv N-8-116) fueron crecidas en matraces con vermiculita y regadas con solución Fahraeus. Se determinó el número de nódulos de 5 plantas a los 10, 15 y 20 días después de la inoculación. Se calculó la desviación estándar que se indica con una barra.

simbiótico pSyma de *S. meliloti* próximo al gen *syrB*, un gen que reprime la actividad de SyrM. Esta última proteína, activa la transcripción de *nodD3*, un gen regulador de la nodulación. Su efecto en simbiosis no ha sido estudiado aún (Barnett y Long 1997).

La mutante CFNEB18 no presentó diferencias en el número de nódulos respecto a la cepa silvestre en la cinética de nodulación (Fig. 4). La secuencia próxima a la inserción del Tn5-B30 mostró homología significativa con proteínas del tipo HtrA de *Brucella abortus* en particular con la proteína similar a HtrA (I:39%, S:56% en 125 aminoácidos e I:35%, S:46% en los siguientes 105 aminoácidos; la probabilidad que el parecido se deba al azar es de 7×10^{-14}) (no. de acceso: I40059), una proteasa que reconoce serina inducible por temperatura. En la lista de homología le sigue un endopeptidasa periplásmica DegP de *S. meliloti* (I:38%, S:54% en 118 aminoácidos; la probabilidad que el parecido se deba al azar es de 8×10^{-11}) (no. acceso: AAC43669). Este tipo de proteínas son requeridas para la virulencia en patógenos intracelulares de mamíferos como *B. abortus* y *Salmonella typhimurium* pero no se ha observado que esté involucrada en alguna forma en la simbiosis entre *S. meliloti* y alfalfa. También se encontró homología con DegP de *B. japonicum* (I:35%, S:50% en 134 aminoácidos; la probabilidad que el parecido se deba al azar es de 2×10^{-6}) (no. de acceso: CAA73938) la cual tampoco afecta la simbiosis. En ninguno de los tres genes se ha encontrado efecto en el crecimiento a altas temperaturas y en el caso de los genes de rizobios no se observó efecto en la simbiosis. El último resultado coincide con el obtenido en la mutante CFNEB18 en simbiosis. El mayor parecido a genes de *B. abortus*, más que a genes de *E. coli* o *Haemophilus influenzae*, se debe a que *Rhizobium* sp está ubicado filogenéticamente más cerca de *B. abortus* que de otros patógenos (Martínez-Romero et al. 2000). No se conoce el papel que podría desempeñar este tipo de proteínas en rizobios los cuales se ubican intracelularmente en células vegetales.

La secuencia obtenida de la inserción en la cepa CFNEB3 no mostró efecto en simbiosis ni homología con ninguna secuencia del banco de datos.

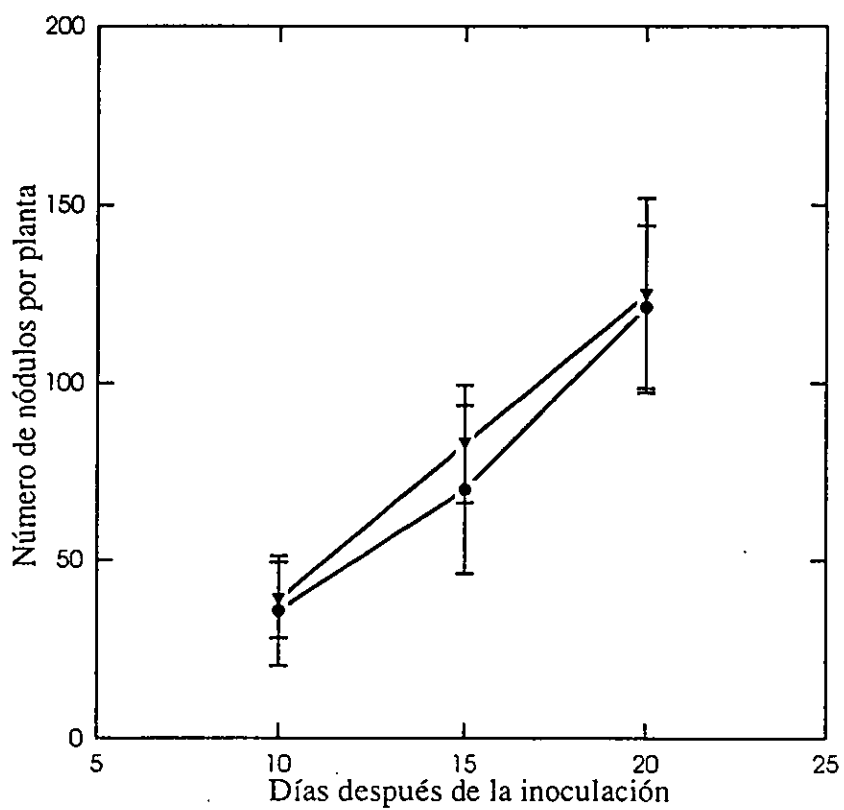


Fig. 4. Cinética de nodulación de *R. etli* CFN42 (●) y la cepa mutante CFNEB18 (▼). Las plantas de frijol (cv N-8-116) fueron crecidas en matraces con vermiculita y regadas con solución Fahraeus. Se determinó el número de nódulos de 5 plantas a los 10, 15 y 20 días después de la inoculación. Se calculó la desviación estándar que se indica con una barra.

Análisis de la presencia de los genes *rmrA* y *rmrB* en otras cepas de rizobios

El fragmento *HindIII-HindIII* de 1.7 kb (Fig. 2A, artículo) fue utilizado como sonda en un experimento de hibridación con el ADN digerido con la enzima *EcoRI* de *R. tropici* 299 en condiciones de alta severidad, con el objeto de identificar posibles secuencias homólogas. No se observó señal positiva con ningún fragmento de ADN de *R. tropici* (González-Pasayo 1996).

Como parte de su proyecto de Doctorado, Alejandro García de los Santos realizó hibridaciones en condiciones de alta severidad entre el plásmido pA31 que contiene un fragmento de 5.6 kb del pb descrito en la Fig. 2A del artículo (como sonda) y el ADN de las cepas de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843 y *R. leguminosarum* bv. *viciae* VF39. El propósito de este experimento fue evaluar la conservación de secuencias del pb de *R. etli* CFN42 en otros plásmidos de las cepas mencionadas. Resultados previos mostraron que la región que contiene a los genes *lpsβ1* y *lpsβ2* es esencial en la biosíntesis de lipopolisacáridos requeridos en el simbiosis con frijol y se encontraban conservados en los plásmidos pANU843b y pVF39c (García de los Santos y Brom 1997, Fig. 5). Los resultados indicaron que secuencias homólogas al fragmento de 5.6 kb se encontraron en los plásmidos de las cepas ANU843 y VF39 y que esos plásmidos son los mismos que contienen los genes con secuencias homólogas a *lpsβ1* y *lpsβ2*, pANU843b y pVF39c, respectivamente. Los datos anteriores indicarían que un sistema transportador similar al encontrado en *R. etli* CFN42 estaría presente en *R. leguminosarum* bv. *trifolii* y bv. *viciae* aunque se requieren mayores estudios para confirmar esta hipótesis ya que el fragmento de 5.6kb utilizado contiene otros genes además de *rmrAB*. Debido a que distintas plantas poseen diferentes fitoalexinas, es posible que los genes en los bv. *trifolii* y bv. *viciae* sean variantes alélicas más afines a las fitoalexinas que excreta cada leguminosa como por ejemplo, pisatina en el caso del chícharo. Cabe agregar que con la secuencia de *rmrAB*, el Dr. Les Barran (en año sabático con la Dra. Esperanza Martínez-Romero) encontró

secuencias homólogas en el cromosoma de *S. meliloti*. Es interesante que estos genes están organizados con otro gen regulador diferente al encontrado en *R. etli*, el cual puede ser incluido en la familia MarR.

Análisis de la secuencia obtenida

Se comparó la secuencia de aminoácidos obtenida de las secuencias de bases de *rmrA*, *rmrB* y *orfR* con las secuencias de la base de datos GenBank utilizando el programa BLAST (Altschul et al. 1990). Los resultados se muestran en las Fig. 5, 6 y 7. El resultado del BLAST de las proteínas RmrA y RmrB aquí presentado difiere del resultado obtenido al escribir el artículo un año atrás debido a que nuevas secuencias fueron incluidas en la base de datos. Algunas de ellas, presentaron mayor homología con las proteínas RmrA y RmrB que las encontradas con *E. coli*, *Haemophilus influenzae* y *Vibrio cholerae* las cuales se incluyen dentro de las γ -bacterias y ya fueron reportadas. La mayoría de las nuevas secuencias homólogas pertenecen a bacterias como *Sphingomonas aromaticivorans* y *Rickettsia prowazeki*, las cuales están ubicadas dentro del α -bacterias al igual que el género *Rhizobium* por ser filogenéticamente más cercanas que las anteriores. Se realizaron alineamientos con el programa Gap (Devereux et al. 1984) para estimar los valores de identidad y similitud. El resultado de dicha comparación y los porcentajes de identidad y similitud se describen en el artículo. Los alineamientos parciales se muestran en la Fig. 8, 9 y 10 de esta tesis.

El *orfR* fue identificado mediante un análisis detallado de la región comprendida entre el marco de lectura abierto, denominado *orf4* y *rmrA* (Fig. 2, artículo). Esta región tiene una extensión 880 pb. La única similitud con proteínas conocidas se presenta entre un gen de 357 pb que codifica a una proteína de 137 aa. y un grupo de proteínas reguladoras (que incluye a varios represores) de operones que codifican a un regulador transcripcional de *Bacillus subtilis* (la probabilidad que el parecido se deba al azar es 3.8×10^{-6}), al regulador

Sequences producing significant alignments:	Score	E Value
	(bits)	
<u>gb AAC31387.1 </u> (AF047693) multidrug resistance efflux pump ...	<u>153</u>	2e-36
<u>gb AAD03861.1 </u> (AF079317) putative aromatic efflux pump mem...	<u>152</u>	7e-36
<u>pir G71678</u> multidrug resistance protein A (emrA) RP243 - R...	<u>146</u>	2e-34
<u>gb AAD33771.1 AF139107_1</u> (AF139107) hypothetical multidrug ...	<u>146</u>	3e-34
<u>gb AAD54073.1 </u> (AF132909) efflux pump protein FarA [Neisser...	<u>144</u>	2e-33
<u>gb AAF40763.1 </u> (AE002389) fatty acid efflux system protein ...	<u>142</u>	5e-33
<u>emb CAB85381.1 </u> (AL162758) multidrug resistance translocase...	<u>142</u>	5e-33
<u>dbj BAA16239.1 </u> (D90867) MULTIDRUG RESISTANCE PROTEIN K. [E...	<u>137</u>	2e-31
<u>sp P52599 EMRK_ECOLI</u> MULTIDRUG RESISTANCE PROTEIN K >gi 744...	<u>137</u>	2e-31
<u>sp P27303 EMRA_ECOLI</u> MULTIDRUG RESISTANCE PROTEIN A >gi 744...	<u>136</u>	3e-31
<u>dbj BAA11236.1 </u> (D78168) EmrK [Escherichia coli]	<u>136</u>	3e-31
<u>pir JC1344</u> multidrug resistant protein emrA - Escherichia ...	<u>136</u>	3e-31
<u>gb AAC38085.1 </u> (AF012101) VceA [Vibrio cholerae]	<u>131</u>	9e-30
<u>sp P32716 YJCR_ECOLI</u> HYPOTHETICAL 36.9 KD PROTEIN IN FDHF-A...	<u>129</u>	6e-29
<u>sp P44928 EMRA_HAEIN</u> MULTIDRUG RESISTANCE PROTEIN A HOMOLOG...	<u>126</u>	3e-28
<u>dbj BAA15404.1 </u> (D90807) Fusaric acid resistance protein Fu...	<u>90</u>	4e-17
<u>sp P76185 YDHJ_ECOLI</u> HYPOTHETICAL 33.0 KD PROTEIN IN SLYA-S...	<u>90</u>	4e-17
<u>pir D69821</u> hypothetical protein yhbJ - Bacillus subtilis >...	<u>88</u>	2e-16
<u>pir D70391</u> hypothetical protein aq_1060 - Aquifex aeolicus...	<u>86</u>	5e-16
<u>pir C64816</u> hypothetical protein b0795 precursor - Escheric...	<u>72</u>	1e-11
<u>sp P46482 YHCO_ECOLI</u> HYPOTHETICAL 34.8 KD PROTEIN IN ARGR-C...	<u>69</u>	9e-11
<u>pir S76434</u> hypothetical protein sll0141 - Synechocystis sp...	<u>69</u>	9e-11
<u>sp P37626 YHII_ECOLI</u> HYPOTHETICAL 38.8 KD PROTEIN IN RHSB-P...	<u>67</u>	3e-10
<u>sp P37683 YIAV_ECOLI</u> HYPOTHETICAL 41.8 KD PROTEIN IN AVTA-S...	<u>62</u>	9e-09
<u>gb AAD39494.1 AF145798_1</u> (AF145798) immunoreactive 36 kDa a...	<u>62</u>	9e-09
<u>sp P32107 YIBH_ECOLI</u> HYPOTHETICAL 42.0 KD PROTEIN IN RHSA-M...	<u>55</u>	1e-06
<u>sp P11091 CYAD_BORPE</u> CYAD PROTEIN >gi 69562 pir BVBRCD cya...	<u>53</u>	4e-06
<u>gb AAD51344.1 AF173226_1</u> (AF173226) SmeA [Stenotrophomonas ...	<u>53</u>	6e-06
<u>emb CAB75242.1 </u> (AL139075) putative periplasmic protein [Ca...	<u>52</u>	1e-05
<u>gb AAC25690.1 </u> (AF039653) membrane-fusion protein [Agrobact...	<u>50</u>	3e-05
<u>sp P25196 NOLF_RHIME</u> NODULATION PROTEIN NOLF >gi 95216 pir ...	<u>49</u>	8e-05
<u>pir S77541</u> hypothetical protein slr1207 - Synechocystis sp...	<u>49</u>	8e-05
<u>pir T30829</u> hypothetical protein mexE - Pseudomonas aerugin...	<u>49</u>	8e-05
<u>pir S74497</u> hypothetical protein sll1053 - Synechocystis sp...	<u>48</u>	1e-04
<u>sp P76397 YEGM_ECOLI</u> HYPOTHETICAL 44.5 KD PROTEIN IN ALKA-B...	<u>48</u>	1e-04
<u>dbj BAA15928.1 </u> (D90845) Membrane fusion protein MtrC precu...	<u>48</u>	1e-04
<u>pir A64974</u> hypothetical protein b2074 - Escherichia coli (...)	<u>48</u>	1e-04
<u>pir G64100</u> hypothetical protein HI0894 - Haemophilus influ...	<u>48</u>	2e-04
<u>sp Q57500 Y894_HAEIN</u> HYPOTHETICAL PROTEIN HI0894 >gi 157391...	<u>48</u>	2e-04
<u>dbj BAA12298.1 </u> (D84271) fusaric acid detoxification protei...	<u>47</u>	2e-04
<u>pir T31342</u> ragD protein - Bradyrhizobium japonicum >gi 296...	<u>47</u>	2e-04
<u>pir A72386</u> conserved hypothetical protein - Thermotoga mar...	<u>47</u>	3e-04
<u>emb CAB85190.1 </u> (AL162757) membrane fusion protein [Neisser...	<u>46</u>	4e-04
<u>gb AAF42063.1 </u> (AE002521) membrane fusion protein [Neisseri...	<u>46</u>	4e-04
<u>pir S76581</u> hypothetical protein sll0180 - Synechocystis sp...	<u>46</u>	7e-04
<u>sp P43505 MTRC_NEIGO</u> MEMBRANE FUSION PROTEIN MTRC PRECURSOR...	<u>45</u>	0.001

Fig. 5. Resultado de la búsqueda de secuencias similares a RmrA en el GenBank utilizando el programa BLAST (Altschul et al. 1990). Las proteínas se ordenan de mayor a menor similitud y el valor E indica la probabilidad de que el parecido se deba al azar.

Sequences producing significant alignments:	Score	E Value
<u>pir</u> B71726 multidrug resistance protein B (emrB) RP157 - R...	<u>230</u>	2e-59
<u>gb</u> AAD05187.1 (AF110185) unknown [Burkholderia pseudomallei]	<u>202</u>	8e-51
<u>gb</u> AAC31388.1 (AF047693) multidrug resistance efflux pump ...	<u>199</u>	7e-50
<u>emb</u> CAB85380.1 (AL162758) multidrug resistance translocase...	<u>187</u>	3e-46
<u>gb</u> AAF40764.1 (AE002389) fatty acid efflux system protein ...	<u>187</u>	3e-46
<u>sp</u> P27304 EMRB_ECOLI MULTIDRUG RESISTANCE PROTEIN B >gi 746...	<u>185</u>	8e-46
<u>pir</u> JC1345 multidrug resistant protein emrB - Escherichia ...	<u>182</u>	6e-45
<u>gb</u> AAD54074.1 (AF132910) efflux pump protein FarB [Neisser...	<u>177</u>	2e-43
<u>gb</u> AAC38086.1 (AF012101) VceB [Vibrio cholerae]	<u>173</u>	4e-42
<u>gb</u> AAD03860.1 (AF079317) putative aromatic efflux pump inn...	<u>172</u>	6e-42
<u>sp</u> P52600 EMRY_ECOLI MULTIDRUG RESISTANCE PROTEIN Y >gi 746...	<u>163</u>	4e-39
<u>sp</u> P44927 EMRB_HAEIN MULTIDRUG RESISTANCE PROTEIN B HOMOLOG...	<u>161</u>	2e-38
<u>sp</u> P54585 YHCA_BACSU HYPOTHETICAL 58.3 KD PROTEIN IN GLPD-C...	<u>147</u>	2e-34
<u>pir</u> E70391 major facilitator family transporter - Aquifex ...	<u>117</u>	3e-25
<u>pir</u> B69532 multidrug resistance protein homolog - Archaeog...	<u>114</u>	2e-24
<u>dbj</u> BAA08793.1 (D50098) multidrug transporter [Bacillus su...	<u>113</u>	3e-24
<u>pir</u> F70705 hypothetical protein Rv2333c - Mycobacterium tu...	<u>113</u>	3e-24
<u>gb</u> AAB07864.1 (U51164) membrane-bound transport protein (P...	<u>113</u>	4e-24
<u>emb</u> CAB77415.1 (AL160431) putative transmembrane efflux pr...	<u>113</u>	5e-24
<u>gb</u> AAD29366.1 AF120930.1 (AF120930) putative mitomycin C tr...	<u>111</u>	2e-23
<u>pir</u> F69763 multidrug resistance protein homolog ycnB - Bac...	<u>110</u>	3e-23
<u>gb</u> AAC18101.1 (AF058302) putative antibiotic antiporter (S...	<u>110</u>	4e-23
<u>pir</u> T34995 probable integral membrane efflux protein - Str...	<u>109</u>	5e-23
<u>pir</u> A70022 multidrug-efflux transporter homolog yusP - Bac...	<u>109</u>	6e-23
<u>emb</u> CAB61602.1 (AL133210) putative export protein [Strepto...	<u>109</u>	6e-23
<u>pir</u> B69656 multidrug-efflux transporter (puromycin, nerflo...	<u>107</u>	2e-22
<u>dbj</u> BAA08941.1 (D50453) multidrug resistance protein(EmrB)...	<u>107</u>	2e-22
<u>emb</u> CAB55652.1 (AL117385) putative transmembrane efflux pr...	<u>102</u>	1e-20
<u>pir</u> T36377 probable exporter - Streptomyces coelicolor >gi...	<u>102</u>	1e-20
<u>pir</u> A70954 hypothetical protein Rv1250 - Mycobacterium tub...	<u>101</u>	2e-20
<u>dbj</u> BAA75389.1 (AB013375) YhcA [Bacillus halodurans]	<u>99</u>	9e-20
<u>pir</u> B70709 hypothetical protein Rv0783c - Mycobacterium tu...	<u>98</u>	3e-19
<u>gb</u> AAD56432.1 AF158699.4 (AF158699) major facilitator super...	<u>97</u>	3e-19
<u>sp</u> P36554 YEGB_ECOLI HYPOTHETICAL 50.9 KD PROTEIN IN ALKA-B...	<u>94</u>	3e-18
<u>pir</u> S18539 actVA-1 protein - Streptomyces coelicolor >gi 5...	<u>93</u>	5e-18
<u>pir</u> T35722 probable transport protein - Streptomyces coeli...	<u>92</u>	2e-17
<u>emb</u> CAB62752.1 (AL133424) putative membrane transport prot...	<u>91</u>	3e-17
<u>pir</u> G70042 multidrug-efflux transporter homolog yvka - Bac...	<u>90</u>	3e-17
<u>pir</u> B70515 hypothetical protein Rv1877 - Mycobacterium tub...	<u>89</u>	1e-16
<u>pir</u> B75541 probable multidrug-efflux transporter - Deinoco...	<u>89</u>	1e-16
<u>gb</u> AAD13557.1 (AF080235) LanJ [Streptomyces cyanogenus]	<u>88</u>	2e-16
<u>pir</u> T35130 transmembrane efflux protein - Streptomyces coe...	<u>86</u>	7e-16
<u>pir</u> B70865 probable transmembrane transport protein - Myco...	<u>86</u>	9e-16
<u>pir</u> T35970 probable efflux protein - Streptomyces coelicol...	<u>85</u>	2e-15
<u>dbj</u> BAA78678.1 (AB019519) VarS [Streptomyces virginiae]	<u>85</u>	2e-15
<u>gb</u> AAC01725.1 (AF040570) rifamycin efflux protein [Amycola...	<u>85</u>	2e-15

Fig. 6. Resultado de la búsqueda de secuencias similares a RmrB en el GenBank utilizando el programa BLAST (Altschul et al. 1990). Las proteínas se ordenan de mayor a menor similitud y el valor E indica la probabilidad de que el parecido se deba al azar.

Sequences producing significant alignments:			Score (bits)	E Value	
sp P32398	YIXD_BACSU	HYPOTHETICAL TRANSCRIPTIONAL REGULAT...	101	3.8e-06	1
gi 987091	(X86780)	regulator of antibiotic tra...	96	2.2e-05	1
sp P34000	ACRR_ECOLI	POTENTIAL ACRAE OPERON REPRESSOR >gi...	95	3.2e-05	1
gi 1001205	(D64003)	hypothetical protein [Synec...	92	8.3e-05	1
gi 886037	(U24659)	JadR2 [Streptomyces venezue...	92	8.6e-05	1

Fig. 7. Resultado de la búsqueda de secuencias similares a OrfR en el GenBank utilizando el programa BLAST (Altschul et al. 1990). Las proteínas se ordenan de mayor a menor similitud y el valor E indica la probabilidad de que el parecido se deba al azar.

```

EmrA      215..rtriispmtg yvsravqpg aqispstplm avvatnmwv danfketcia
EmrAHI    215..rtkirspidg yvarnvqvg qavsvggalm avvsneqmwI eanfketqIt
EmrK      208..rtdikspvtg yiaqrsvqvg etvspgqslm avvparqmwv nanfketcIt
VceA      242..rtvirapisg ivakrqvqvg rrvqvmpIm tvvctdhiyv danfkeveIrr
RmrA      259..rpitapvrte pignralrvs qvvaqatqlm svvatsavyv ianyketqIt

```

```

EmrA      nmrigqvtI ttdiygddvk ytgkvvgldm gtgsafslIp aqnatgnwik
EmrAHI    nmrigqvki hfalygknke fdgvingiem gtgnafslIp sqnatgnwik
EmrK      dvrigqsvni isdlygenvv fhgrvtginm gtgnafslIp aqnatgnwik
VceA      dvkvqqvtI tadlygddvt yhgvyagfsg gtgsafsmip aqnatgnwik
RmrA      dvragqvdi evdtyp.grt yrghvdsIap asgqefallp pdnatgnftk

```

```

EmrA      vvqrlpvriE ldqkqleqyp lrhqlstlvs vnttn..350
EmrAHI    vvqrvpvrik ldpqqftetp lrhqlsatak vrisd..350
EmrK      ivqrvpvEvs ldpkelmehp lrhqlsmtat idtkn..343
VceA      vvqrlpvriE ldpkdlqayp lqvqlsmvat idtag..377
RmrA      vvqrvpvrik ldgeaang.d lrhqlsmvqps idtka..392

```

Fig. 8. Alineamiento múltiple de la región C-terminal de secuencias similares a RmrA provenientes de *E. coli* EmrA (no. de acceso 27303), *H. influenzae* EmrAHI (no. de acceso P44928), *E. coli* EmrK (no. de acceso P52599), *V. cholerae* VceA (no. de acceso 2815577). Los aminoácidos conservados en las 5 proteínas están sombreados y aquellos conservados en 4 de las 5 proteínas están recuadrados. Los alineamientos fueron realizados con el programa PileUp. Los nombres de las secuencias se muestran del lado izquierdo. Los números al comienzo y al final de cada secuencia indican la posición del aminoácido en relación al sitio de inicio de cada proteína.

```

EmrB      6..plegaqlvim tialslatfn qvldstianv aiptiagnlg sslsqgtwvi tsfgvanais
EmrBHi   10..piqggalill tlalslatfn qvldstianv aiptiagdlg asfsqgtwvi tsfgvanais
EmrY     10..pltggtlwcv tialslatfn qmldstisnv aiptisgflg astdegtwvi tsfgvanaia
VceB     11..plsgwalffg alclamanfl ailddtianv svsniaagslg tstsqgtyvi tsyavaeais
RmrB     14..prastrdwia vlagmigafn ailniqitna slldieggig tgvdnqawis tsyligeivv

```

```

EmrB      ipltgwlakr vgevklflws tiafaiaswa cgvssslhml iffrviqgiv agpliplsqs
EmrBHi   ipitgwlaqr fgevrflflvs tflfvvsswl cgiadsleal iffrviqgav agpviplsqs
EmrY     ipvtgrlaqr igelrflfls vtffslsslm cslstnlavl iffrvqvglm agpliplsqs
VceB     vpitgwlasr fgsirvfvtc flifgvfsl1 cglansmstl vmfrvllgfv ggpliplsqt
RmrB     ipltayfssv fsfrkyilvn silfplfsma cafaqdigtm illrgfrafa ggvlipmaft

```

```

EmrB      1lllnyppak rsialalwsm tvivapicgp ilggvisdny hgwifffinw pigvavv..182
EmrBHi   1lllnypppek rgmalafwsm tivvapifgp ilggwisdhi hgwifffinw piglsvv..186
EmrY     1lllnypppek rtfalalwsm tviiapicgp ilggycdnf swgwifflinw pmgiivl..186
VceB     lmmrifpknk shaaigiwsm ttlvapimgp ilggvlcdql swpyiffikm pfaiaaa..187
RmrB     mvltklpksq qplglalfal svtfapaigp tiggylteny gwqtiffint apslima..190

```

GxhhGP xiGG

Fig. 9. Alineamiento múltiple de la región N-terminal de secuencias similares a RmrB provenientes de *E. coli* EmrB (no. de acceso 27304), *H. influenzae* EmrBHI (no. de acceso P44927), *E. coli* EmrY (no. de acceso P52600), *V. cholerae* VceB (no. de acceso 2815578). Los aminoácidos conservados en las 5 proteínas están sombreados y aquellos conservados en 4 de las 5 proteínas están recuadrados. Debajo del alineamiento múltiple se muestra el consenso de extrusión. x, cualquier aminoácido; h, hidrofóbico; mayúscula, alta frecuencia de ocurrencia. Los alineamientos fueron realizados con el programa PileUp. Los nombres de las secuencias se muestran del lado izquierdo. Los números al comienzo y al final de cada secuencia indican la posición del aminoácido en relación al sitio de inicio de cada proteína.

```

AcrR      11..etrqhlldva lrlfsqqgvs stslgehaka agvtrgaiyw hfkdkssllfs e..62
YixD      4..drkklileaa tksftqfgyk attmdlvakl anvgkgthyt ffknkeelfd e..55
RmrR     22..dtksvileaa nrcfirdsgva aasiaahagg agvstktlyr lfptkaellfs e..73
          |-----|-----|-----|
          H       V       H

```

Fig. 10. Alineamiento múltiple de la región N-terminal de secuencias similares a OrfR provenientes de *E. coli* AcrR (no. de acceso 34000), *Bacillus subtilis* YixD (no. de acceso P32398). Los aminoácidos conservados en las 3 proteínas están sombreados y aquellos conservados en 2 de las 3 proteínas están recuadrados. Debajo del alineamiento múltiple se muestra el motivo de hélice-vuelta-hélice. Los alineamientos fueron realizados con el programa PileUp. Los nombres de las secuencias se muestran del lado izquierdo. Los números al comienzo y al final de cada secuencia indican la posición del aminoácido en relación al sitio de inicio de cada proteína.

de un complejo transportador de antibióticos de *Streptomyces hygrosopicus*, a un represor de la resistencia a acriflavina en *E. coli*, entre otras (Fig. 7 y 10). Entre las regiones con similitud se destaca un claro motivo de unión a ADN (Fig. 10). Los alineamientos realizados entre la secuencia de este gen y las proteínas citadas permite incluirla dentro de una familia de proteínas reguladoras denominada TetR/AcrR (Hinrichs et al. 1994). Se propone que este gen interviene, al menos en parte, en la regulación del operón *rmrAB*, por lo cual se lo denominó *orfR*. Por los datos obtenidos sobre el operón *rmrAB* y la información existente, el regulador OrfR constituye una especie particular, desconocida hasta el momento.

El resultado obtenido en el análisis de hidrofobicidad realizado con el programa Gene Works package / Psort se describe en el artículo y los gráficos se muestran en las Fig. 11, 12 y 13 de esta tesis.

La expresión de los genes *rmrAB* no dependen de NodD

Con el fin de estudiar si la expresión de los genes *rmrAB* dependen del reconocimiento de NodD, se transfirió el pb::Tn5-B30 de CFNEA31 a una cepa derivada de *R. etli* CFN42 curada del plásmido simbiótico (CFN2001), la cual carece de las tres copias de los genes *nodD* ya que están localizadas en dicho plásmido (Girard et al. 1996). Con esta cepa se ensayo la inducción de la resistencia a Km en cajas con flavonoides. Se observó que la cepa 2001 con el Tn5-B30 en el plásmido es capaz de crecer en presencia de Km en el medio por lo que se deduce que la expresión de *rmrA* no requiere de NodD.

RmrA Graphics

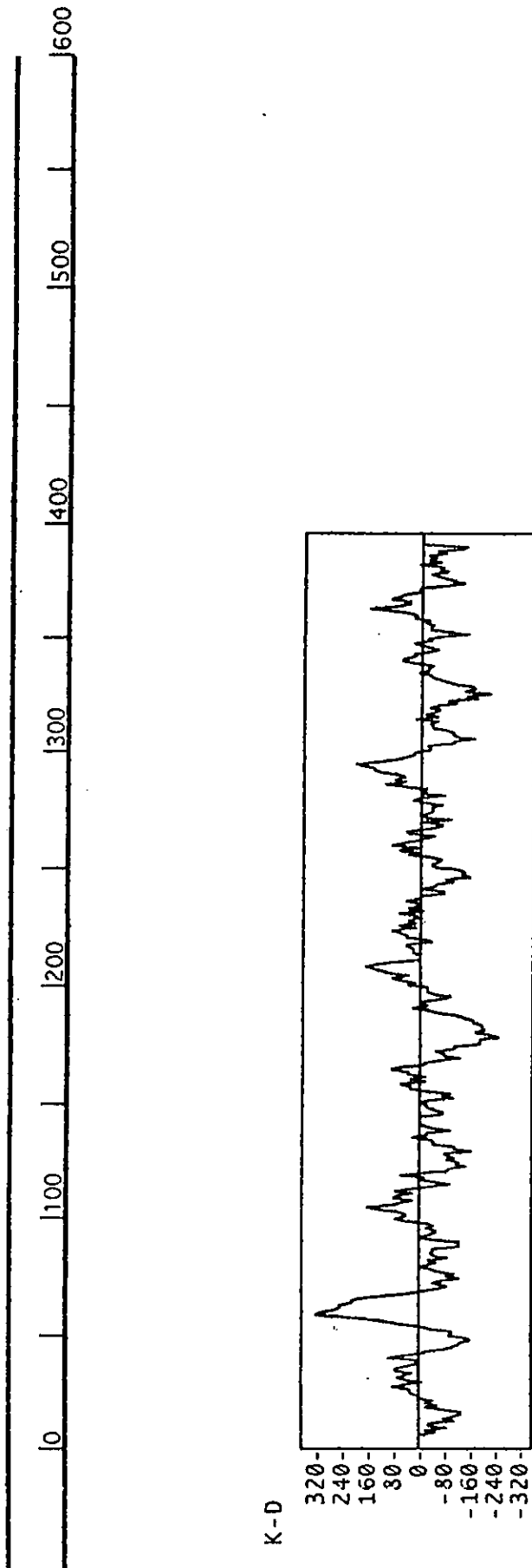


Fig. 11. Perfil de hidrofobicidad (según Kyte y Doolittle 1982) de RmrA. Se observa un pico hidrofóbico próximo al extremo N-terminal que corresponde a una hélice membranal (flecha).

RmrB Graphics

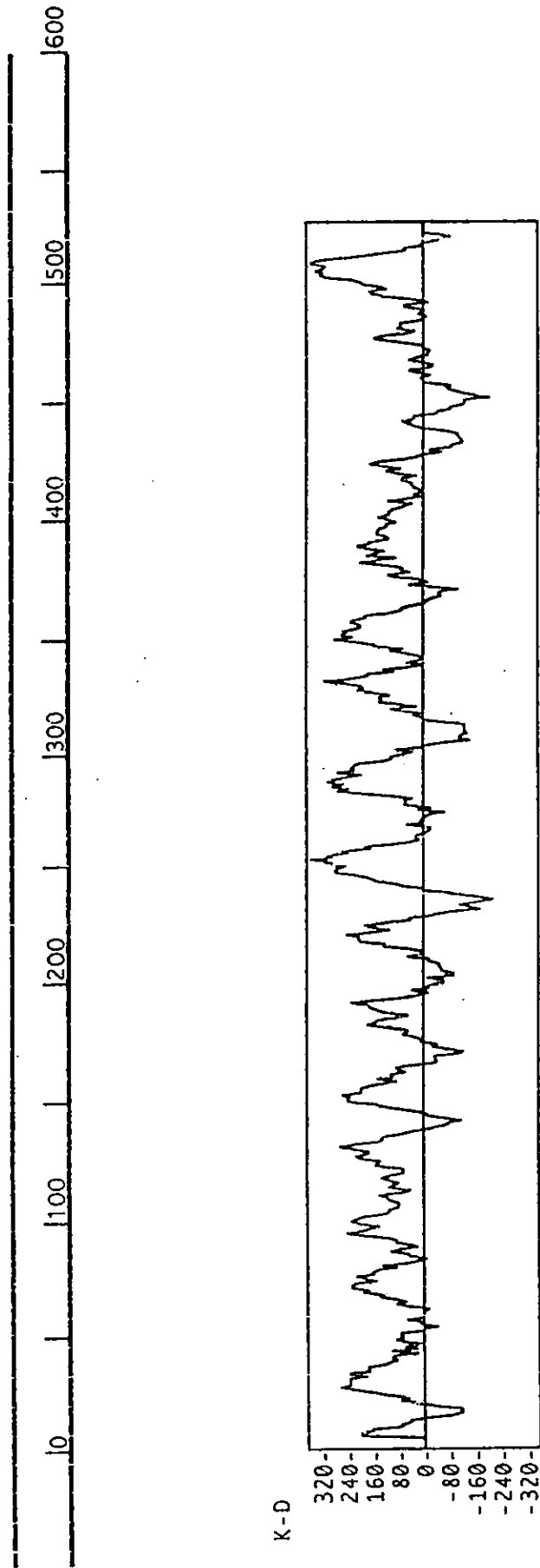


Fig. 12. Perfil de hidrofobicidad (según Kyte y Doolittle 1982) de RmrB. Se observan 14 picos hidrofóbicos que corresponden a 14 hélices transmembranales.

RmrR Graphics

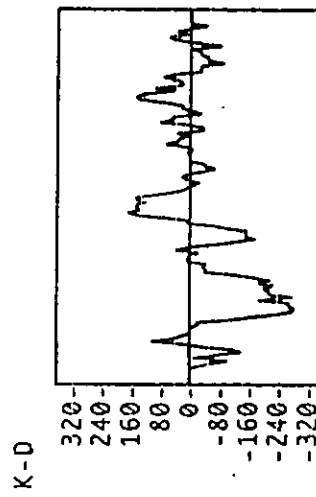
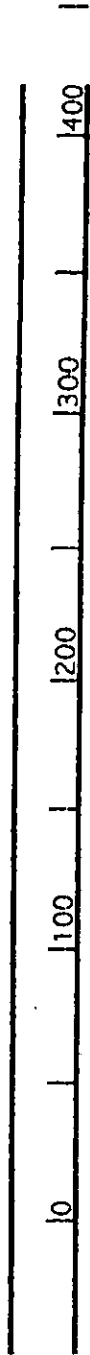


Fig. 13. Perfil de hidrofobicidad (según Kyte y Doolittle 1982) de OrfR.

5-DISCUSSION Y CONCLUSIONES

En este estudio se describen genes de *R. etli* CFN42 regulados por flavonoides exudados por las raíces de frijol. El exudado de las raíces de frijol contiene eriodictiol, naringenina y genisteína en ausencia de rizobios y estos flavonoides actúan como inductores de los genes de nodulación (Hungria et al. 1991b). Se ha observado que un alto nivel de fitoalexinas, como medicarpina en exudado de raíz de alfalfa y cumestrol en exudado de raíz de frijol son liberados en presencia de *S. meliloti* o *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, respectivamente (Dakora et al. 1993a, Dakora et al. 1993b) y además que *B. japonicum* y *Rhizobium* sp son capaces de inducir la acumulación de fitoalexinas en nódulos de soya y haba (Schmidt et al. 1992, Wolff y Werner 1990). La producción de estas fitoalexinas son normalmente estimuladas por patógenos como parte de un mecanismo de defensa de la planta. Esta observación sugiere que, al menos inicialmente, a nivel molecular los rizobios son percibidos como patógenos.

Las bacterias pueden usar dos mecanismos generales para desarrollar resistencia a compuestos tóxicos. Uno es la disminución de la entrada por reducción de la permeabilidad de la membrana y el otro es el transporte activo de los compuestos hacia el exterior de la célula (Nikaido 1994). En rizobios no existe una barrera de permeabilidad, al menos para algunos flavonoides. Recourt et al. (1989) encontraron la naringenina se acumula en la membrana citoplasmática de *R. leguminosarum* bv. *viciae* de forma altamente reversible y dependiente del pH. En el caso de la absorción de luteolina por *S. meliloti*, Hubac et al. (1993) mostraron que la incorporación del flavonoide es específica para dicho inductor de genes *nod*. Primero, la luteolina es acumulada preferencialmente en la membrana externa y una pequeña cantidad siempre fue encontrada en la membrana interna. En un reporte posterior (Hubac et al. 1994), se observó que la incorporación de luteolina es dependiente del pH y aportaron evidencias sobre un proceso activo de extrusión de dicho compuesto en *S. meliloti*. Considerando estos datos, los flavonoides al menos los que actúan como

inductores de los genes *nod*, difunden a través de la membrana externa en un estado noionizado (sin carga) y se acumulan en la membrana citoplásmica. Concentraciones altas de estos compuestos (10-100 μM) inhiben enzimas de la cadena respiratoria (Boydston et al. 1983, Giannini et al. 1988, Hubac et al. 1994, Parniske et al. 1991) localizadas en dicha membrana. Esta inhibición puede ser el efecto primario de actividad antibiótica de los flavonoides. Además, Nikaido (1993) propuso que agentes lipofílicos no cargados atraviesan la membrana citoplásmica y que la única defensa de las bacterias Gram-negativas contra estos compuestos es su inactivación o su extrusión activa. Parniske et al. (1991) encontraron una resistencia a gliceolina (una fitoalexina isoflavonoide de soya) inducible en rizobios capaces de nodular soya; ellos especulan que los cambios en permeabilidad de la membrana externa podrían estar involucrados en la resistencia a gliceolina pero no presentan evidencias experimentales. Por otro lado, se ha propuesto que los EPS y LPS podrían actuar como barrera estructural para evitar la entrada de fitoalexinas ya que mutantes de *R. etli* EPS⁻ o LPS⁻ tienen una reducida tasa de crecimiento en presencia de cumestrol y genistéina y en menor medida en daidzeína (Eisenschenk et al. 1994). Esta sería otra forma de protección frente a ciertos compuestos tóxicos. Además, los rizobios son capaces de catabolizar flavonoides mediante la ruptura del anillo C (Rao y Cooper 1994). Dicho mecanismo reduciría la concentración de flavonoides al llegar a niveles tóxicos. Este mecanismo operaría en *R. etli* CFN42 ya que mutantes *rmrA*⁻ fueron capaces de crecer en exudado de raíz y flavonoides después de una incubación prolongada, aunque este resultado podría también estar relacionado a la relativa inestabilidad observada en los flavonoides.

En bacterias y eucariotas, la extrusión de varios compuestos no relacionados es un proceso común en la resistencia múltiple a drogas que evita la acumulación dentro de la célula de antibióticos, antisépticos y otras drogas a niveles que interfieren con su crecimiento. El eflujo es mediado por un sistema de transporte en la membrana que bombea al exterior un amplio rango de sustancias desde el interior de la célula y confiere protección

contra compuestos tóxicos. En bacterias Gram-negativas, el sistema incluye una proteína en la membrana citoplásmica (transmembranal) que bombea al exterior utilizando energía proveniente de un gradiente de protones (Marger y Saier 1993) y una proteína periplásmica que une la membrana interna con la externa y extruye el sustrato directamente en el medio externo (Nikaido 1994). En algunos casos, una proteína en la membrana externa también forma parte del sistema de transporte formando un poro (Nikaido 1994, Saier et al. 1994) (Fig. 14). Considerando estos datos, la similitud entre las proteínas RmrAB y las proteínas de los sistemas de resistencia múltiple a drogas junto con el fenotipo de las mutantes, las dos proteínas codificadas por los genes *rmrAB* pueden ser incluidas en los sistemas de múltiple resistencia a drogas (Tabla 1). Cabe destacar, que el plásmido pRK*emrAB* con los genes de *E. coli* provee resistencia contra naringenina a la cepa CFNEA31 sugiriendo una similitud funcional. Recientemente, varios sistemas de resistencia múltiple a drogas han sido descritos tanto en bacterias Gram-negativas como en Gram-positivas, incluyendo a *Staphylococcus aureus* (Rouch et al. 1990), *Bacillus subtilis* (Neyfakh et al. 1991), *E. coli* (Lomovskaya y Lewis 1992, Ma et al., Thanassi et al. 1997), *Pseudomonas aeruginosa* (Poole et al. 1993), *Vibrio cholerae* (Colmer et al. 1998) y *Agrobacterium tumefaciens* (Palumbo et al. 1998). En la mayoría de los casos, los sistemas de resistencia múltiple a drogas fueron encontrados en patógenos y aún no han sido descritos en bacterias mutualistas como rizobios. Este hallazgo apoya la idea que los sistemas de resistencia a multidrogas no han surgido recientemente como resultado de la intensa exposición de microorganismos a antibióticos y antisépticos utilizados por el hombre ya que bacterias del suelo como *Rhizobium* difícilmente habrían tenido contacto con dichos compuestos. Estos sistemas de transporte tendrían un papel fisiológico importante en la extrusión de sustancias tóxicas naturales en bacterias con anterioridad al uso de antibióticos por el hombre (Saier et al. 1998).

Las proteínas RmrAB de *R. etli* tendrían un rol en la resistencia a compuestos inhibitorios del crecimiento, al bombearlos al exterior y evitar su acumulación dentro de la

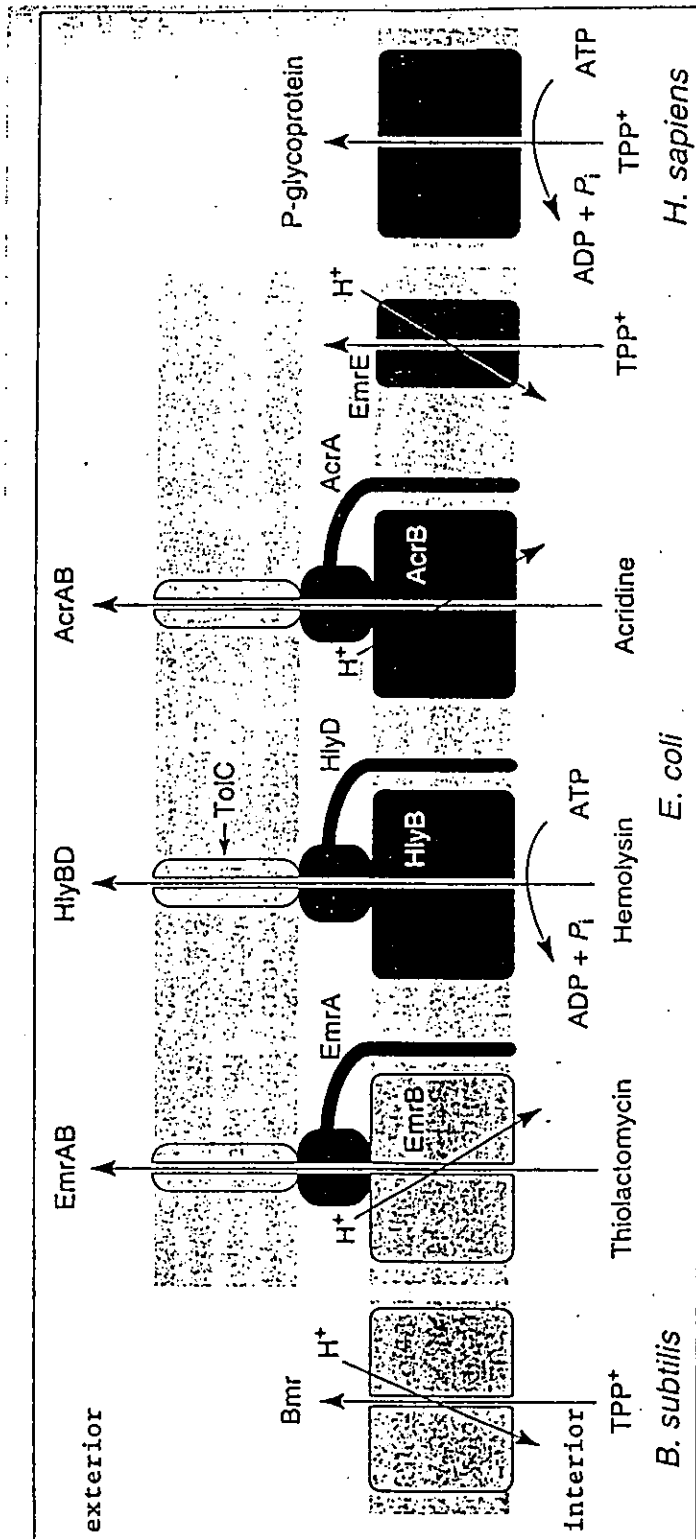


Fig. 14. Modelo topológico de los sistemas de resistencia múltiple a drogas. Las proteínas de fusión de membranas EmrA, AcrA y HlyB consisten en un α -hélice transmembranal y un largo dominio periplásmico. Las proteínas EmrB, AcrB y HlyD son proteínas integrales de membrana. Además, una porina como TolC puede ubicarse a nivel de la membrana externa. En los extremos, los sistemas de resistencia de una bacteria gram-positiva (*Bacillus subtilis*) y un eucariota (*Homo sapiens*) representan sistemas homólogos. Reproducido de Lewis (1994).

Tabla 1. Familias de proteínas de resistencia a multidrogas y sus principales características. Reproducido de Lewis (1994).

	Principales Facilitadores	Smr (<i>Staphylococcus</i> resistencia a multidrogas)	Resistencia, nodulación, división	Fusión de membranas	Cassette de unión ATP
Propiedades	Droga/H ⁺ antiporte y translocasa específica	Droga/H ⁺ antiporte	Droga/H ⁺ antiporte?	Auxiliar de translocasa	Translocasa específica
Topología	12-14 hélices transmembranales	4 hélices transmembranales	12 hélices transmembranales	1 hélice transmembranal resto en periplasma	12 hélices transmembranales
Distribución	Gram negativas y positivas	Gram negativas y positivas	Gram negativas	Gram negativas	Procariones y Eucariotes
Miembros de la Familia	QacA <i>S. aureus</i> QacB <i>S. aureus</i> EmrB <i>E. coli</i> EmrD <i>E. coli</i> Bcr <i>E. coli</i> Bmr <i>B. subtilis</i> NorA <i>S. aureus</i>	Smr <i>S. aureus</i> EmrE/MvrC <i>E. coli</i> QacE	AcrB <i>E. coli</i> AcrE <i>E. coli</i> MexB <i>P. aeruginosa</i>	EmrA (<i>emrAB</i> locus) AcrA (<i>araAB</i> locus) AcrF (<i>acrEF</i> locus) MexA (<i>mexAB, oprK</i> operón)	P-glicoproteína MDR1H. <i>sapiens</i> PFMDR1 <i>P. falciparum</i>

célula. La formación de nódulos requiere de un gran número de células de rizobios (Vincent 1974). Los compuestos tóxicos reducirían el tamaño de las poblaciones en la rizosfera y este efecto puede explicar la reducción de la capacidad de nodulación que fue encontrada en la mutante (Fig. 15). La resistencia a compuestos tóxicos de la planta podría dar una ventaja a rizobios sobre otras bacterias y es potencialmente importante en la nodulación. Como se mencionó en la introducción, la producción y la resistencia a antibióticos podría tener un efecto benéfico al dar ventaja a ciertas cepas capaces de establecer simbiosis efectiva. Los resultados aquí presentados aportan información novedosa sobre la ecología de rizobios en particular en lo relacionado a la comunicación molecular entre rizobios y leguminosas.

Los flavonoides están involucrados en el reconocimiento y especificidad mediante un intercambio de señales en las primeras etapas de la simbiosis. Diferentes leguminosas producen y liberan diferentes tipos de flavonoides (Phillips 1992). La capacidad de reconocer los flavonoides está determinada por la(s) proteína(s) NodD, variantes alélicas con diferente especificidad por los flavonoides (Redmond et al. 1986). En *B. japonicum*, la resistencia inducida por flavonoides a gliceolina no requiere a NodD (Parniske et al. 1991). Esta característica indica que además de NodD, existen otros sistemas regulados por flavonoides, como se ha propuesto en el caso la estimulación del crecimiento (Hartwig et al. 1991), respuesta quimotáctica (Kape et al. 1991) y catabolismo de flavonoides (Rao y Cooper 1994). En *B. japonicum*, las proteínas NodVW constituyen un sistema adicional para detectar flavonoides (Göttfer et al. 1990). Nuestros resultados mostraron que la expresión de *rmrAB* no requiere a los genes de *nodD*, los cuales están localizados en el plásmido simbiótico de *R. etli*. De acuerdo con este resultado, ninguna caja *nod* ni secuencias del tipo de A3 (Mao et al. 1994), secuencias que son reconocidas por NodD fueron encontradas arriba de *rmrAB*. Esta observación coincide con otros reportes sobre genes inducidos por exudados de plantas o flavonoides que tampoco poseen cajas *nod* (Boundy-Mills et al. 1994, Kóvacs et al. 1995, Sadowsky et al. 1988, Stacey et al. 1994). Los genes *rmrAB* podrían estar regulados por un represor potencial, OrfR, el cual codifica

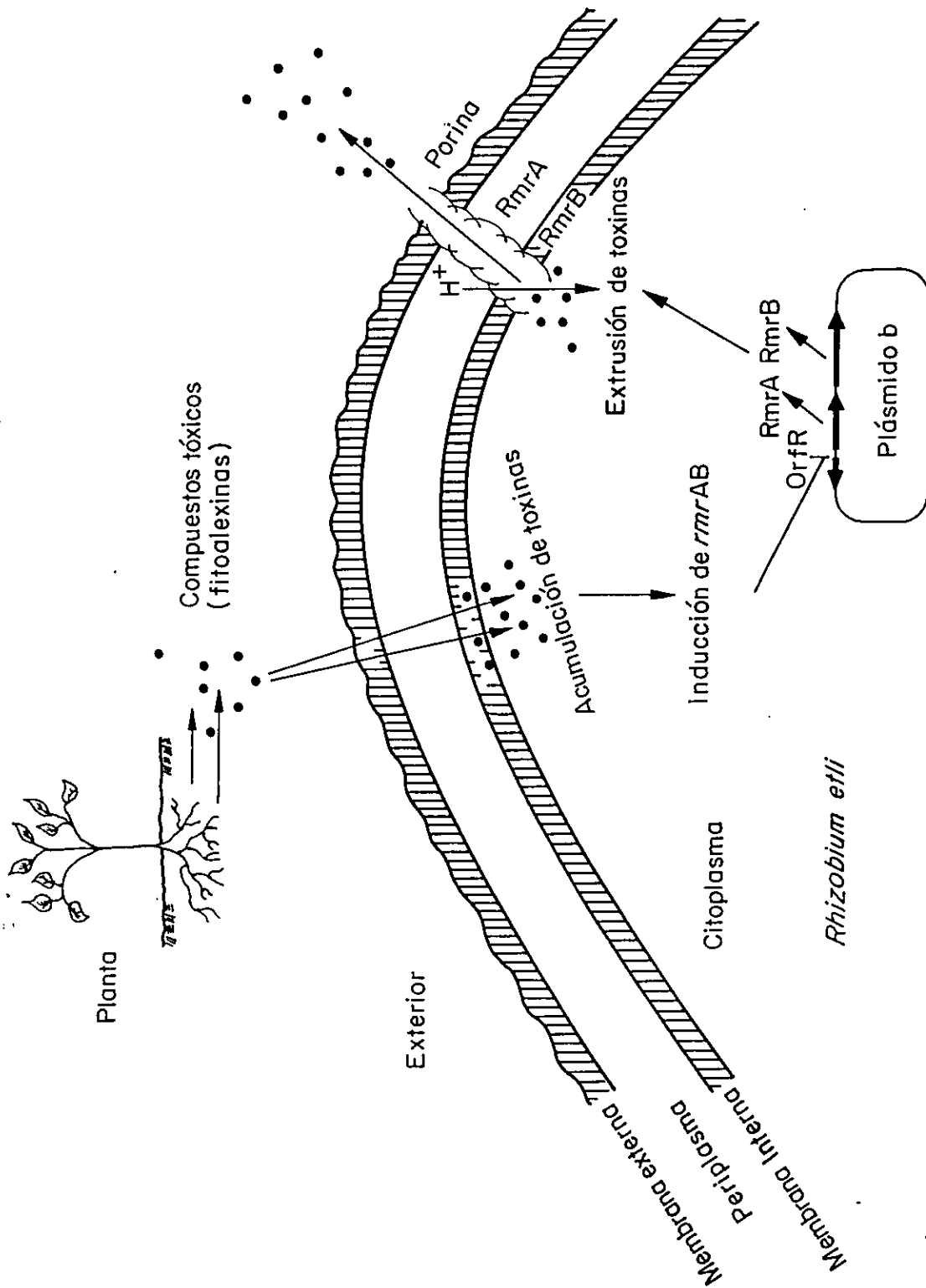


Fig. 15. Modelo propuesto de resistencia a compuestos tóxicos en *R. etli* CFN42.

una pequeña proteína con una hélice-vuelta-hélice y presenta homología con proteínas regulatorias de la familia TetR-AcrR (Hinrichs et al. 1994) en particular represores que se unen a ADN. Dicha hélice-vuelta-hélice en la región amino terminal se ha observado en la mayoría de las proteínas reguladoras con función represora (Perez-Rueda et al. 1998). En el futuro se podría explorar si la proteína OrfR se une directamente a los flavonoides o si es regulada por otra proteína que detecta flavonoides. La derrepresión de *mrAB* ocurre en presencia de diversos flavonoides y compuestos similares que además son sustratos de la bomba. Esta característica en la que un mismo compuesto es inductor del sistema y sustrato de la bomba es común entre varios sistemas de resistencia a multidrogas (Lewis 1994).

6-BIBLIOGRAFIA

- Aguilar, J. M. M., Ashby, A. M., Richards, A. J. M., Loake, G.J., Watson, M.D., Shaw, C.H. 1988. Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* towards flavonoid inducers of the symbiotic nodulation genes. J. Gen. Microbiol. 134:2741-2746.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215:403-410.
- Ambler, A., Jacquesy, J. C., Jambu, P., Joffre, J., Maggi-Churin, R. 1991. Polar lipid fraction in soil: a kerogen-like matter. Organic Geochem. 17:341-349.
- Barnett, M. J., Long, S. R. 1997. Identification and characterization of a gene of *Rhizobium meliloti* pSyma, *syrB*, that negatively affects *syrM* expression. Mol. Plant-Microbe Interact. 10:550-559.
- Baron, C., Zambryski, P. C. 1995. The plant response in pathogenesis, symbiosis, and wounding: variations on a common theme? Annu. Rev. Genetics 29:107-129.
- Battisti, L., Lara, J. C., Leigh, J. A. 1992. A specific oligosaccharide form of the *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide promotes nodule invasion in alfalfa. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5625-5629.
- Bellato, C. M., Balatti, P. A., Pueppke, S. G., Krishnan, H. 1996. Proteins from cells of *Rhizobium fredii* bind to DNA sequences preceding *nolX*, a flavonoid-inducible *nod* gene that is not associated with a *nod box*. Mol. Plant-Microbe Interact. 9:457-463.
- Bhuvaneshwari, T.V., and Bauer, W.D. 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.
- Boivin, C., Barran, L. R., Malpica, C. A., Rosenberg, C. 1991. Genetic analysis of a region of the *Rhizobium meliloti* pSym plasmid specifying catabolism of trigonelline, a secondary metabolite present in legumes. J. Bacteriol. 173:2809-2817.

- Boller, T. 1995. Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 46:189-214.
- Boundy-Mills, K. L., Kossalak, R. M., Tully, R. E., Pueppke, S. G., Lohrke, S., Sadwosky, M. J. 1994. Induction of the *Rhizobium fredii nod* box-independent nodulation gene *noI* requires a functional *nodDI* gene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7:305-308.
- Bowen, G. D. 1961. The toxicity of legume seed diffusates toward rhizobia and other bacteria. *Plant Soil* 15:155-165.
- Boydston, R., Paxton, J. D. 1983. Glyceollin: a site-specific inhibitor of electron transport isolated in soybean mitochondria. *Plant Physiol.* 72:151-155.
- Brom, S., García de los Santos, A., Stepkowsky, T., Flores, M., Dávila, G., Romero, D., Palacios, R. 1992. Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli are required for optimal symbiotic performance. *J. Bacteriol.* 174:5183-5189.
- Caetano-Anollés, G., Crist-Estes, D.K., Bauer, W.D. 1988. Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes. *J. Bacteriol.* 170:31-64-3169.
- Campbell, N. A., Reece, J. B., Mitchell, L. G. 1999. Prokaryotes and the origins of metabolic diversity. In *Biology*, 5th edition. Addison Wesley Longman, Inc. CA. pp. 502-519.
- Cava, J. R., Elias, P. M., Turowski, D. A., Noel, K. D. 1989. *Rhizobium leguminosarum* CFN42 genetic regions encoding lipopolysaccharide structures essential for complete nodule development on bean plants. *J. Bacteriol.* 171:8-15.
- Colmer, J. A., Fralick, J. A., Hamood, A. N. 1998. Isolation and characterization of a putative multidrug resistance pump from *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 27:63-72.
- 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., Joseph, C. M., Phillips, D. A. 1993a. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) root exudates contain isoflavonoids in the presence of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* 101:819-824.
- Dakora, F. D., Joseph, C. M., Phillips, D. A. 1993b. Common bean root exudates contain elevated levels of daidzein and coumestrol in response to *Rhizobium* inoculation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6:665-668.
- D'Arcy-Lameta, A. 1986. Study of soybean and lentil root exudates II. Identification of some polyphenolic compounds, relation with plantlet physiology. *Plant Soil* 92:113-123.
- Dénarié, J., Debelle, F., Rosenberg, C. 1992. Signaling and host range variation in nodulation. *Annu. Rev. Microbiol.* 46:497-531.
- Dharmatilake, A.J., Bauer, W.D. Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* towards nodulation gene-inducing compounds from alfalfa roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1153-1158.
- Dixon, R. A., Lamb, C. J. 1990. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Biol.* 41:339-367.
- Dockendorff, T. C., Sanjuan, J., Groß, P., Stacey, G. 1994. Nola represses *nod* gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Plant-Microbe Interaction.* 7:596-602.
- Dowling, D. N. O'Gara, F. 1994. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends Biotech.* 12:133-141.
- Duelli, D. M., Noel, K. D. 1997. Compounds exuded by *Phaseolus vulgaris* that induce a modification of *Rhizobium etli* lipopolysaccharide. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10:903-910.
- Eisenschenk, L., Diebold, R., Perez-Lesher, J., Peterson, A. C., Peters, N. K., Noel, K. D. 1994. Inhibition of *Rhizobium etli* polysaccharide mutants by *Phaseolus vulgaris* root compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:3315-3322.
- Estabrook, E. M., Sengupta-Gopalan, C. 1991. Differential expression of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase during soybean nodule development. *Plant Cell* 3:299-308.

- Ebel, J., Mithöfer, A. 1998. Early events in the elicitation of plant defence. *Planta* 206:335-348.
- 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.
- Firmin, J. L., Wilson, K. E., Rossen, L., Johnston, A. W. B. 1986. Flavonoid activation of nodulation genes in *Rhizobium* reversed by other compounds present in plants. *Nature* 324:90-92.
- García de los Santos, A., Brom, S. 1997. Characterization of two plasmid-borne *lpsβ* loci of *Rhizobium etli* required for lipopolysaccharide synthesis and for optimal interaction with plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10:891-902.
- Giannini, J. L., Briskin, D. P., Holt, J. S., Paxton, J. D. 1988. Inhibition of plasma membrane and tonoplast H⁺-transporting ATPases by glyceollin. *Phytopathology* 78:1000-1003.
- Girard, L., Valderrama, B., Palacios, R., Romero, D., Dávila, G. 1996. Transcriptional activity of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* is affected by different environmental conditions. *Microbiology.* 142:2847-2856.
- Goldmann, A., C. Boivin, C., V. Fleury, B. Message, L. Lecoeur, M. Maille, and Tepfer, D. 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.
- González-Pasayo, R. 1996. Obtención y caracterización de mutantes de *Rhizobium etli* CFN42 en genes inducibles por exudados de frijol. Tesis de Maestría. CCH-UACPyP, UNAM.
- Görge, E., Werner, D. 1991. Degradation of wyerone, the phytoalexin of faba beans by *Rhizobium leguminosarum*. *Curr. Microbiol.* 23:153-157.

- Göttfert, M., Groß, B., Hennecke, H. 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.
- Graham, T. 1991. Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedlings tissues and in seed and root and root exudates. Plant Physiol. 95:594-603.
- Hanin, M., Jabbouri, S., Broughton, W. J., Fellay, R., Quesada-Vincens, D. 1999. Molecular aspects of host-specific nodulation. Pages 1-37 in Plant-Microbe Interactions 4. G. Stacey and N.T. Keen, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA.
- Hartwig, U. A., Maxwell, C. A., Joseph, C. M., Phillips, D. A. 1990. Chrysoeriol and luteolin released from alfalfa seeds induced *nod* genes in *Rhizobium meliloti*. Plant Physiol. 92:116-122.
- 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.
- Hinrichs, W., Kisker, C., Duvel, M., Muller, A., Tovar, K., Hillen, W., and Saenger, W. 1994. Structure of the Tet repressor-tetracycline complex and regulation of antibiotic resistance. Science 264:418-420.
- Hirsch, A. M. 1992. Developmental biology of legume nodulation. New Phytol. 122:211-237.
- Hirsch, A. M., and Kapulnik, Y. 1998. Signal transduction pathways in mycorrhizal associations: Comparisons with the *Rhizobium*-legume symbiosis. Fungal Genet. Biol. 23:205-212.
- Hubac, C., Ferran, J., Guerrier, D., Trémolières, A., Kondorosi, A. 1993. Luteolin absorption in *Rhizobium meliloti* wild-type and mutant strains. J. Gen. Microbiol. 139:1571-1578.

- Hubac, C., Ferran, J., Trémolières, A., Kondorosi, A. 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 Phillips, D. A. 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 Phillips, D. A. 1991b. *Rhizobium nod* gene inducers exuded naturally from roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiol.* 97:759-764.
- Hynes, M. F., McGregor, N. F. 1990. Two plasmids other than nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol Microbiol.* 4:567-574.
- Jiménez-Zurdo, J. I., García-Rodríguez, F. M., Toro, N. 1997. The *Rhizobium meliloti putA* gene: its role in the establishment of the symbiotic interaction with alfalfa. *Mol. Microbiol.* 23:85-93.
- 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.
- Junghans, H., Dalkin, K., and Dixon, R. A. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) 15. Characterization and expression patterns of members of a subset of the chalcone synthase of multigene family. 1993. *Plant Mol. Biol.* 22:239-253.
- Kado, C. I., Heskett, M. G. 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60: 969-976.
- Kado, C. I. 1991. Molecular mechanisms of crown gall tumorigenesis. *Crit. Rev. Plant Sci.* 10:1-32.

- Kape, R., M. Parniske, and D. Werner. 1991. Chemotaxis and *nod* gene activity of *Bradyrhizobium japonicum* in response to hydroxycinnamic acids and isoflavonoids. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:316-319.
- Kape, R., Wex, K., Parniske, M., Görge, E., Wetzell, A., Werner, D. 1992. Legume root metabolites and va-mycorrhiza development. *J. Plant Physiol.* 141:54-60.
- Kato, K., Arima, Y., Hirata, H. 1997. Effect of exudate released from seeds and seedling roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) on proliferation of *Rhizobium* sp. (Phaseolus). 43:275-283.
- Keen, N. T., Kennedy, B. W. 1974. Hydroxyphaseollin and related isoflavonoids in the hypersensitive resistance reaction of soybeans to *Pseudomonas glycinea*. *Physiol. Plant Pathol.* 4:173-185.
- Kondorosi, E., Pierre, M., Cren, M., Haumann, U., Schell, J., Kondorosi, A. 1991. Identification of *NolR*, a negative transacting factor controlling the *nod* regulon in *Rhizobium meliloti*. *J. Mol. Biol.* 222:885-896.
- Kosslak, R. M., Bookland, R., Barkei, J., Paaren, H. E., Appelbaum, E. R. 1987. Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common *nod* gene by isoflavones isolated from *Glycine max*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7428-7432.
- Kovács, L. G., Balatti, P., Krishnan, H. B., Pueppke, S. G. 1995. Transcriptional organization and expression of *nolXWBTUV*, a locus that regulates cultivar-specific nodulation of soybean by *Rhizobium fredii* USDA257. *Mol. Microbiol.* 17:923-933.
- Krishnan, H. B., Pueppke, S. G. 1993. Flavonoid inducers of nodulation genes stimulate *Rhizobium fredii* USA257 to export proteins into the environment. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6:107-113.
- Kyte, J., Doolittle, R. F. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157:105-132.

- León-Barrios, M., Dakora, F. D., Joseph, C. M., Phillips, D. A. 1993. Isolation of *Rhizobium meliloti nod* gene inducers from alfalfa rhizosphere soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:636-639.
- Lewis, K. 1994. Multidrug resistance pumps in bacteria: variations on a theme. *Trends Biochem. Sci.* 19:119-123.
- Loh, J., García, M., Stacey, G. 1997. NodV and NodW, a second flavonoid recognition system regulating *nod* gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 179:3013-3020.
- Lomovskaya, O., Lewis, K. 1992. *emr*, an *Escherichia coli* locus for multidrug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:8938-8942.
- Ma, D., Cook, D. N., Alberti, M., Pon, N. G., Nikaido, H., Hearst, J. E. 1993. Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175:6299-6313.
- Maier, J. R., Triplett, E. W. 1996. Toward more productive efficient and competitive nitrogen-fixing bacteria. *Crit. Rev. Plant Sci.* 15:191-234.
- Mao, C., Downie, J. A., and Hong, G. 1994. Two inverted repeats in the *nodD* promoter region are involved in *nodD* regulation in *Rhizobium leguminosarum*. *Gene* 145:87-90.
- Marger, M. D., Saier Jr., M. H. 1993. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends Biochem. Sci.* 18:13-20.
- Martínez-Romero, E. 1994. Recent developments in *Rhizobium* taxonomy. *Plant Soil* 161:11-20.
- Martínez-Romero, E., Wang, E. T., López-Merino, A., Caballero-Mellado, J., Rogel, M.A., Gándara, B., Toledo, I., Martínez-Romero, J. 2000. Ribosomal gene based phylogenies on trial: The case of *Rhizobium* and related genera. Pages 59-64 in *Biology or Plant-Microbe Interactions* vol. 2 P.J.G. M. de wit, T. Bisseling, and W. J. Stiekema, eds. International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions, St. Paul, MN, USA.

- Maxwell, C. A., Hartwig, U. A., Joseph, C. M., Phillips, D. A. 1989. A chalcone and two related flavonoids released from alfalfa roots induce *nod* genes in *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* 91:842-847.
- Miller, K. J., Hadley, J. A., and Gustine, D. L. 1994. *Plant Physiol.* 104:917-923.
- Miranda-Ríos J, Morera C., Taboada, H, Dávalos, A., Encarnación, S., Mora, J., and Soberón, M. 1997. Expression of thiamin biosynthetic genes (*thiCOGE*) and production of symbiotic terminal oxidase *cbb3* in *Rhizobium etli*. *J. Bacteriol.* 179:6887-6893.
- Morandi, D., Bailey, J. A., Gianinazzi-Pearson, V. 1984. Isoflavonoid accumulation in soybean roots infected with vesicular-arbuscular micorrhizal fungi. *Physiol. Plant Pathol.* 24:357-364.
- Murphy, P.J., N. Heycke, Z. Banfalvi, M.E. Tate, F. de Bruijn, A. Kondorosi, 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.
- Murphy, P. J., Wexler, M., Grzemski, W., Rao, J. P., Gordon, D. 1995. Rhizopines—their role in symbiosis and competition. *Soil Biol. Biochem.* 27:525-529.
- Nair, M. G., Safir, G. R., Siqueira, J. O. 1991. Isolation and identification of vesicular-arbuscular mycorrhiza-stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:434-439.
- Neyfakh, A. A., Bidnenko, V. E., Chen, L. B. 1991. Efflux mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: Similarities and dissimilarities with the mammalian system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4781-4785.
- Nikaido, H. 1993. Transport across the bacterial outer membrane. *J. Bioenerget. Biomembr.* 25:581-589.
- Nikaido, H. 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* 264:382-388.

- Niehaus, K., Kapp, D., Pühler, A. 1993. Plant defence and delayed infection of alfalfa pseudonodules induced by an exopolysaccharide (EPS I)-deficient *Rhizobium meliloti* mutant. *Planta* 190:415-425.
- Palumbo, J. D., Kado, C. I., Phillips, D. A. 1998. An isoflavonoid-inducible efflux pump in *Agrobacterium tumefaciens* is involved in competitive colonization of roots. *J. Bacteriol.* 180:3107-3113.
- Pankhurst, C. E., Biggs, D. R. 1980. Sensivity of *Rhizobium* to selected isoflavonoids. *Can. J. Microbiol.* 26:542-545.
- Parniske, M., Ahlborn, B., and Werner, D. 1991. Isoflavonoid-inducible resistance to the phytoalexin glyceollin in soybean rhizobia. *J. Bacteriol.* 173:3432-3439.
- Parniske, M., Schmidt, P. E., Kosch, K., Müller, P. 1994. Plant defense responses of host plants with determinate nodules induced by EPS-defective *exoB* mutants of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7:631-638.
- Paulsen, I.T., and Skurray, R. A. 1993. Topology, structure and evolution of two families of proteins involved in antibiotic and antiseptic resistance in eukaryotes and prokaryotes-an analysis. *Gene* 124:1-11.
- Pérez-Rueda, E., Gralla, J. D., Collado-Vides, J. 1998. Genomic position analyses and the transcription machinery. *J. Mol. Biol.* 275:165-170.
- Perret, X., Fellay, R., Bjourson, A.T., Copper, J.E., Brenner, S., and Broughton, W.J. 1994. Subtraction hybridization and shot-gun sequencing: a new approach to identify symbiotic loci. *Nucl. Acids Res.* 22: 1335-1341.
- Peters, N. K., Frost, J. W., Long, S. R. 1986. Plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science* 233:977-980.
- 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. 1992. Flavonoids: Plant signals to soil microbes. *Recent Adv. Phytochem.* 26:201-231.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Phillips, D. A., Joseph, C. M., Maxwell, C. A. 1992. Trigonelline and stachydrine released from alfalfa seeds activate NodD2 protein in *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* 99:1526-1531.
- Phillips, D. A., Dakora, F. D., Sande, E., Joseph C. M. Zon, J. 1994. Synthesis, release and transmission of alfalfa signals to rhizobial symbionts. *Plant Soil* 161:69-80.
- Phillips, D. A., Kapulnik, Y. 1995. Plant isoflavonoids, pathogens and symbionts. *Trends in Microbiol.* 3:58-64.
- Poole, K., Krebs, K., Mc Nally, C., Neshat, S. 1993. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Evidence for involvement of an efflux operon. *J. Bacteriol.* 175:7363-7362.
- 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.
- Rao, J.R., N.D. Sharma, J.T.G. Hamilton, D.R. Boyd, J.E. Cooper. 1991. Biotransformation of the pentahydroxyflavone quercetin by *Rhizobium loti* and *Bradyrhizobium strains* (Lotus). *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1563-1565.
- Rao, J. R., Cooper, J. E. 1994. Rhizobia catabolize *nod* gene-inducing flavonoids via C-ring fission mechanisms. *J. Bacteriol.* 176:5409-5413.
- Rao, J. R., Cooper, J. E. 1995. Soybean nodulating rhizobia modify *nod* gene inducers daidzein and genistein to yield aromatic products that can influence gene-inducing activity. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8:855-862.
- Recourt, K., van Brussel, A. A. H., Driessen, A. J. M., Lugtenberg, B. J. J. 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.
- Recourt, K., Schripsema, J., Kijne, J. W., van Brussel, A. A. N., Lugtenberg, B. J. J. 1991. Inoculation of *Vicia sativa* subsp. *nigra* roots with *Rhizobium leguminosarum*

- biovar *viciae* results in release of *nod* gene activating flavonones and chalcones. *Plant Mol. Biol.* 16:841-852.
- 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.
- Rolfe, B. G., Gresshoff, P. M. 1988. Genetic analysis of legume nodule initiation. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39:297-319.
- Rostas, K, Kondorosi, E., Horvath, B., Simoncsits, A., and Kondorosi, A. 1986. Conservation of extended promoter regions of nodulation genes in *Rhizobium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:1757-1761.
- Rouch, D. A., Cram, D. S., DiBerardino, D., Littlejohn, T. G., and Skurray, R. A. 1990. Efflux-mediated antiseptic resistance gene *qacA* from *Staphylococcus aureus*: common ancestry with tetracycline-and sugar-transport proteins. *Mol. Microbiol.* 4:2051-2062.
- Sadowsky, M.J., Olson, E.R., Foster, V.E., Kosslak, R.M., and Verma, D.P.S. 1988. Two host-inducible genes of *Rhizobium fredii* and characterization of the inducing compound. *J. Bacteriol.* 170: 171-178.
- Sadowsky, M. J. Cregan, P. B., Göttfert, M., Sharma, A., Gerhold, Rodríguez-Quinones, F., Keyser, H. H., Hennecke, H., Stacey, G. 1991. The *Bradyrhizobium japonicum nola* gene and its involvement in the genotype-specific nodulation of soybeans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:637-641.
- Saier, M. H., Tam, R., Reizer, A., Reizer, J. 1994. Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol. Microbiol.* 11:841-847.
- Saier, Jr. M. H., Paulsen, I. T., Sliwinski, M. K., Pao, S. S., Skurray, R. A., Nikaido, H. 1998. Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. *FASEB J.* 12:265-274.

- Schmidt, P. E., Parniske, M., Werner, D. 1992. Production of the phytoalexin glyceolin I by soybean roots in response to symbiotic and pathogenic infections. *Bot. Acta* 105:18-25.
- Schmidt, P. E., Broughton, W. J., Werner, D. 1994. Nod factors of *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium* sp. NGR234 induce flavonoid accumulation in soybean root exudate. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7:384-390.
- Schäfer, W., Straney, D., Ciuffetti, L., van Etten, H. D., Yoder, O. C. 1989. One enzyme makes a fungal pathogen, but not a saprophyte, virulent on a new host plant. *Science* 246:247-249.
- Segovia, L., Piñero, D., Palacios, R., Martínez-Romero, E. 1991. Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:426-433.
- Segovia, L., Young, J. P. W., and Martínez-Romero, E. 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:374-377.
- Simon, R., Quandt, J., and Klipp, W. 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.
- Siqueira, J. O., Nair, M. G., Hammerschmidt, R., Safir, G., R. 1991. Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial systems. *Crit. Rev. Plant Sci.* 10:63-121.
- Soedarjo, M., Hemscheidt, T. K., Borthakur, D. 1994. Mimosine, a toxin present in leguminous trees (*Leucaena* spp.) induces a mimosine-degradating enzyme activity in some *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:4268-4272.
- Soedarjo, M., Borthakur, D. 1996. Mimosine produced by the tree-legume *Leucaena* provides growth advantages to some *Rhizobium* strains that utilize it as a source of carbon and nitrogen. *Plant Soil* 186:87-92.

- Spaink, H. P. 1995. The molecular basis of infection and nodulation by rhizobia: The ins and outs of sympathogenesis. *Ann. Rev. Phytopathol.* 33:345-368.
- Spaink, H. P., Wijfjes, A. H. A., Lugtenberg, B. J. J. 1995. *Rhizobium* NodI and NodJ proteins play a role in the efficiency of secretion of lipochitin oligosaccharides. *J. Bacteriol.* 177:6276-6281.
- Stacey, G., Luka, S., Sanjuan, J., Banfalvi, Z., Nieuwkoop, A. J., Chun J. Y., Forsberg, L. S., Carlson, R. W. 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.
- Streit, W.R., Phillips, D. A. 1997. A biotin-regulated locus, *bioS*, in a possible survival operon of *Rhizobium meliloti*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10:933-937.
- Sutton, J. M., Lea, E. J. A., Downie, J. A. 1994. The nodulation-signaling protein NodO from *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* forms ion channels in membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9990-9994.
- Thanassi, D. G., Cheng, L. W., Nikaido, H. 1997. Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179:2512-2518.
- 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.
- Tiller, S. A., Parry, A. D., and Edwards, R. 1994. Changes in the accumulation of flavonoid and isoflavonoid conjugates associated with plant age and nodulation in alafalfa (*Medicago sativa*). *Physiol. Plant.* 91:27-36.
- Thompson, J. A. 1960. Inhibition of nodule bacteria by an antibiotic from legume seed coats. *Nature* 187:619-620.
- Triplett, E. W. 1990. The molecular genetics of nodulation competitiveness in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3:199-206.

- Triplett, E. W., Sadowsky, M. J. 1992. Genetics of competition for nodulation of legumes. *Ann. Rev. Microbiol.* 46:399-428.
- Tsai, S. M. and Phillips, D. A. 1991. Flavonoids released naturally from alfalfa promote development of symbiotic *Glomus* spores *in vitro*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1485-1488.
- Vande Broek, A., Vanderleyden, J. 1995. Genetics of the *Azospirillum*-plant root association. *Crit. Rev. Plant Sci.* 14:445-466.
- van Egeraat, A. W. S. M. 1975. The growth of *Rhizobium leguminosarum* on the root surface and in the rhizosphere of pea seedlings in relation to roots exudates. *Plant Soil* 42:367-379.
- van Rhijn, P., Vanderleyden, J. 1995. The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol. Rev.* 59:124-142.
- Vázquez, M., Santana, O., Quinto, C. 1993. The NodI and NodJ proteins from *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* strains are similar to capsular polysaccharide secretion proteins from Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* 8:369-377.
- Viprey, V., Del Greco, A., Golinowski, W., Broughton, W.J., Perret, X. 1998. Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. *Mol. Microbiol.* 28:1381-1389.
- Whitman, W. B., Coleman, D. C., Wiebe, W. J. 1998. Prokariotes: The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:6578-6583.
- Wolff, A. B., Werner, D. 1990. Defense reactions in *Rhizobium*-legume symbiosis: phytoalexin concentration in *Vicia faba* nodules is affected by the host genotype. *Z. Naturforsch. C Biosci.* 45:958-962.