

03081 10
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION DE NITROGENO

GENES DE *Rhizobium tropici* INVOLUCRADOS EN EL TRANSPORTE DE UN COMPUESTO ESPECIFICO DE EXUDADO DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA PRESENTA : MONICA TERESA ROSENBLUETH LAGUETTE

CUERNAVACA, MOR.

1998.

TESIS CON FALLA DE CUB

262888



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

PAGINACION

DISCONTINUA

AGRADECIMIENTO

A los Drs. Esperanza Martínez, David Romero y Mario Rocha por su discusión y aportes a la tesis al formar parte del comité tutorial.

A Lucila Lulo por escribir en la computadora gran parte de esta tesis, y por su amistad.

A César Rodríguez por su ayuda en obtener la clona pMR16.

A Julio Martínez por su apoyo en la computadora y en los análisis estadísticos y porque siempre está dispuesto a ayudar.

A Leticia López por obtener y liofilizar los exudados de frijol.

A Patricia Bustos por secuenciar el DNA.

A Alfonso Leija por las fotografías del microscopio.

A Ernesto Pérez Rueda por su ayuda en la computadora, sobre todo en el análisis de la secuencia promotora.

A César por su apoyo, comprensión y sobre todo por sus críticas constructivas.

A César Daniel y Sonia por su afán de conocer este mundo y por darme los momentos más felices.

A mi mamá por su amor y comprensión.

A mi papá por su ejemplo de dedicación.

A mis hermanos David, Javier y Pablo porque siempre que los busco están ahí.

A Esperanza por su apoyo incondicional y por no perder la fe en mi.

A mis compañeros por hacer del laboratorio un lugar agradable para trabajar: Luci, Jorge, Martín, Julio, Ramón, Ernesto, Rocío, En Tao, Lucía, Ivonne, Jesús Caballero, Jesús Muñoz, Paulina, Laura Leticia, Toño y Esperanza.

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Esperanza Martínez Romero, y contó con los apoyos económicos de CONACyT y DGAPA.

INDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCION: Ecología química en la rizósfera y en la simbiosis de plantas (Capítulo)	3
ANTECEDENTES	4
OBJETIVOS	11
ARTICULO: <i>Rhizobium tropici</i> genes involved in specific uptake of <i>Phaseolus vulgaris</i> bean-exudate compounds	
DISCUSION	12
APENDICE I: Detección de la actividad de β -glucuronidasa con X-Gluc	35
APENDICE II: Detección de la actividad de β -glucuronidasa con 4-MUG	36
APENDICE III: Construcción de mutantes <i>lacZ</i>	38
APENDICE IV: Perfiles de hidrofobicidad	40
APENDICE V: "Increased bean (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) nodulation competitiveness of genetically modified <i>Rhizobium</i> strains"	
BIBLIOGRAFIA	43

RESUMEN

Rhizobium tropici nodula y fija nitrógeno en frijol. En la cepa CFN299 de *R. tropici* se identificaron y caracterizaron genes inducidos por exudados de raíz de frijol a los que llamamos *teu* (*tropici* *exudate uptake*). Se identificaron por inserción de un transposón Tn5-*gusA1* sin promotor y se localizaron en un plásmido de alrededor de 185 kb que está conservado en todas las cepas de *R. tropici*. Las proteínas codificadas por los genes *teu* son similares a transportadores ABC, específicamente a proteínas que transportan ribosa. En varias plantas probadas no se obtuvo inducción de los genes *teu* con exudados de raíz, con excepción de *Macroptilium atropurpureum*, la cual también es planta hospedera de *R. tropici*. Aparentemente el compuesto inductor es característico de frijol y de leguminosas cercanas, y está presente en exudados de raíz, y no en semilla ni en nódulo. Este compuesto es removido de los exudados, posiblemente por metabolismo, por la mayoría de los rizobios que nodulan frijol (como *R. etli*, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* y *R. giardinii*). El compuesto inductor principal no se ha identificado, pero cierta inducción se obtuvo con trigonelina. La cepa CFN299 parece tener un sistema de transporte adicional en el plásmido simbiótico, ya que no se observa ningún fenotipo en dos mutantes diferentes y su plásmido simbiótico confiere la capacidad de remover el compuesto a *Agrobacterium tumefaciens*. Por otro lado la cepa CIAT899 de *R. tropici* debe tener solo un sistema de transporte, ya que una mutante con una inserción en los genes *teu* no removió el compuesto de los exudados tan eficientemente como la silvestre y mostró una disminución en la competitividad por nodular.

ABSTRACT

Rhizobium tropici nodulates and fixes nitrogen in bean. In *R. tropici* strain CFN299 we identified and characterized *teu* genes (*tropici* exudate uptake) induced by bean root exudates, localized by an insertion of a promoter-less Tn5-*gusA1* transposon. *teu* genes are present on a plasmid of around 185 kb that is conserved in all *R. tropici* strains. Proteins encoded by *teu* genes show similarity to ABC transporters, specifically to ribose transport proteins. No induction of the *teu* genes was obtained by root exudates from any of several other plants tested, with the exception of *Macroptilium atropurpureum*, which is also a host plant of *R. tropici*. It appears that the inducing compound is characteristic of bean and closely related legumes. It is present in root exudates, but not in seeds or nodules. This compound is removed, presumably by metabolism, from the exudates by the majority of bean-nodulating rhizobia (such as *R. etli*, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* and *R. giardinii*). The principal inducing compound has not been identified but some induction was obtained by trigonelline. The CFN299 strain seems to have an additional uptake system, as no phenotype is observed in two different mutants and its symbiotic plasmid confers to *Agrobacterium tumefaciens* the capacity to remove this compound. *R. tropici* strain CIAT899 must have only one uptake system, since a mutant bearing an insertion in the *teu* genes could not remove the compound from the exudates as efficiently as the wild type, and it showed diminished nodulation competitiveness.

INTRODUCCION

Ecología Química en la Rizósfera y en las Simbiosis de Plantas.
Mónica Rosenblueth, Julio Martínez-Romero y Esperanza Martínez-Romero.

Capítulo (escrito por invitación) enviado para el libro de "Interacciones Químicas entre Organismos. Aspectos Básicos y Perspectivas de su Aplicación". Ana Luisa Anaya, Francisco J. Espinosa-García, Rocío Cruz-Ortega (editores). Editorial Siglo XXI, México.

I. Ecología química en la rizósfera

1. El ambiente rizosférico

2. Las estrategias de competencia de microorganismos

2.1 La competencia por nutrientes

2.1.1 Competencia por carbono y nitrógeno

2.1.2 Competencia por Fe

2.2. Inducción del crecimiento

2.3 Quimiotaxis

2.4 Producción de antibióticos

2.5 La resistencia a compuestos tóxicos de la planta

2.6 Depredación

II. Ecología química de asociaciones y simbiosis

3.1 *Azospirillum*

3.2 Micorriza

3.3 Simbiosis *Rhizobium*-leguminosa

III Conclusiones y perspectivas

Ecología química en la rizósfera y en las simbiosis de plantas

Mónica Rosenblueth, Julio Martínez Romero y Esperanza Martínez-Romero.

Palabras clave: *Rhizobium*, micorriza, supresores de patógenos, flavonoides, fitoalexinas

I. Ecología química en la rizósfera

1. El ambiente rizosférico

Entre las raíces de las plantas existe una riqueza biológica que sólo recientemente se ha comenzado a estudiar. Esta riqueza se sustenta principalmente en los nutrientes de los exudados de las plantas provenientes en última instancia de la fotosíntesis. El entorno influenciado bioquímicamente y biológicamente por las raíces se llama rizósfera y en ella proliferan y compiten los microorganismos. Se asume que la rizósfera se extiende a unos milímetros de la raíz.

Algunos microorganismos en la rizósfera son benéficos a la planta porque le ayudan a transportar nutrientes, producen hormonas o contribuyen al control de patógenos. En cambio otros microorganismos son los patógenos contra los que la planta debe defenderse. Las interacciones entre los microorganismos y las plantas están mediadas por compuestos químicos y éste es el tema que se presentará en este capítulo. Distintos compuestos de los exudados de las raíces inhiben o promueven el crecimiento bacteriano y tienen efectos sobre hongos, áfidos y nemátodos.

Las relaciones entre plantas y microorganismos surgen con las plantas mismas y hasta pueden ser responsables de su existencia. Entre las simbiosis de plantas con microorganismos, una de las más antiguas y de gran importancia en la evolución y colonización del ambiente terrestre por las plantas es la micorriza arbuscular, que es la asociación de hongos zigomicetos con las raíces. La micorriza tal vez funcionó originalmente como una raíz primitiva. La rizósfera de la mayoría de las plantas está en realidad constituida no sólo por las raíces mismas sino también por la micorriza que funciona como una raíz extendida (Bianciotto et al. 1996).

2. Las estrategias de competencia de microorganismos.

Como existe una fuerte competencia entre los microorganismos para colonizar la rizósfera, éstos han desarrollado estrategias como una elevada tasa de crecimiento, movilidad y catabolismo de compuestos específicos excretados por las plantas, resistencia a condiciones particulares del suelo, producción de sustancias que le permitan adherirse o penetrar a la raíz y la síntesis de sideróforos (para competir por el hierro) y de antibióticos.

2.1 La competencia por nutrientes

Las plantas depositan continuamente una variedad de compuestos en la rizósfera. A este proceso se le ha llamado "rizodeposición" (Whipps y Lynch 1985). En experimentos con $^{14}\text{CO}_2$, se encontró que cuando se crecen varias plantas anuales de alrededor de 21 días de edad, entre 30-60% del carbono fijado se transfiere a las raíces, y entre el 20-30% de éste se pierde como rizodeposición, (recopilado por Lynch y Whipps 1990). Esta gran cantidad de carbono secretado por las raíces parecería una pérdida para la planta, pero en términos ecológicos, puede ayudar a que la planta crezca en un lugar donde tal vez de otra forma no pudiera, ya que microorganismos simbióticos y supresores de patógenos pueden proliferar ahí.

Los productos de la rizodeposición han sido clasificados en los siguientes cuatro grupos, dependiendo de la forma en que se depositan (Lynch y Whipps 1990): 1) exudados solubles en agua, como azúcares, aminoácidos, flavonoides, ácidos orgánicos, hormonas y vitaminas, que salen de la raíz sin requerir de energía metabólica; 2) secreciones, como carbohidratos poliméricos y enzimas, que dependen de un proceso metabólico para su deposición; 3) lisados, liberados por autólisis de las células más viejas; 4) gases, como etileno y CO_2 . Dentro de los compuestos secretados por las plantas también hay que considerar a los mucílagos, que consisten principalmente en polisacáridos y son secretados por las vesículas de Golgi de la cófia, células epidérmicas y pelos absorbentes, con la finalidad de facilitar el paso de la raíz por el suelo. También los mucílagos pueden provenir de hidrolizados de los polisacáridos de la pared primaria de las

células (Fitter y Hay 1981). Los mucílagos de las plantas forman parte del mucigel, junto con las células bacterianas y sus productos metabólicos y las partículas coloidales del suelo (Richards 1987).

Además, hay otros materiales que se desprenden de la planta durante su crecimiento como son ápices de raíz, células epidérmicas y pelos radiculares. Estos no comprenden parte de la exudación, sin embargo, son importantes para la actividad microbiana de la rizósfera (Smucker y Saffir 1986, Curl y Truelove 1986).

Los experimentos que han sido más útiles para localizar con precisión los sitios de exudación a lo largo de las raíces, son el marcaje de plantas con materiales radiactivos con la subsiguiente obtención del autorradiograma. De éstos se deduce que la zona meristemática inmediatamente arriba de la cofia es el sitio principal de excreción de los exudados solubles en agua, aunque también se excreta un poco a través de las raíces laterales sin pelos absorbentes (Curl y Truelove 1986) (Fig. 1); otros trabajos apoyan esto. Al trabajar con mutantes de *Neurospora*, con requerimientos nutricionales específicos para ciertos compuestos, se reveló que de la zona meristemática se excretaban treonina y asparagina, mientras que de los pelos absorbentes, leucina, valina, fenilalanina y ácido glutámico (Curl y Truelove 1986). En *Sinorhizobium meliloti* (huésped de alfalfa) con una fusión *nodC-lacZ* (*nodC* es inducido por flavonoides, Fig.2A y ver más adelante), se observó mayor actividad de β -galactosidasa en las bacteria que estaban arriba de la cofia y en los pelos absorbentes (Peters y Long 1988). Los estudios metabólicos realizados con compuestos marcados con el precursor de los flavonoides ^{14}C -fenilalanina (Fig. 3), concuerdan con el concepto de que los flavonoides liberados de la raíz se sintetizan en la misma (Maxwell y Phillips 1990). Técnicas modernas con filtros de absorción situados en diferentes partes de la raíz, permitirán localizar con más certeza, el lugar donde se secretan los exudados.

Las semillas, durante su germinación, también exudan varios compuestos por el hilo, por la parte anterior al ápice y por la testa (Bruehl 1987b). Los flavonoides exudados por las semillas, a diferencia de las raíces, ya existen en éstas antes de la germinación como moléculas preformadas que pueden ser modificadas. Estos compuestos son liberados por la testa (Hartwig y Phillips 1991).

Los factores que afectan la naturaleza y la cantidad de compuestos exudados dependen en cada planta, del estadio de ésta y de factores ambientales como son la cantidad de luz, agua, oxígeno, CO₂, nutrientes, daños a la planta y microorganismos. En general, se observa que cuando la planta es joven, después de la formación de raíces laterales, hay mayor exudación de carbohidratos, aminoácidos y mucigel que cuando es madura, excepto en el caso de árboles, en donde se ha visto que cuando es maduro, sí hay menor exudación de carbohidratos, pero hay mayor secreción de aminoácidos y de ácidos orgánicos (Bruehl 1987a, Richards 1987). Cuando la planta se encuentra por algún período corto bajo condiciones desfavorables como falta de agua, de oxígeno, exceso de CO₂, o si sufre algún daño, la población de microorganismos incrementa, debido más que nada a un aumento en la exudación de carbohidratos y, con excepción de la falta de agua, también a una mayor exudación de aminoácidos y ácidos orgánicos (Hoagland y Williams 1985, Ayers y Thornston 1968). Se ha encontrado que al remover un compuesto de la rizósfera, aumenta la exudación de éste por la planta. El nitrógeno combinado tiene un efecto negativo en la producción de compuestos fenólicos (Kapulnik et al. 1987). El daño a la raíz y hojas ocasiona un aumento en la exudación de compuestos (Ayers y Thornston, 1968). La presencia de microorganismos provoca en general una mayor exudación. Esto se debe, en parte porque están removiendo diferentes compuestos al catabolizarlos, porque pueden lisar directamente células de la raíz, por la producción de hormonas y de antibióticos que afectan la permeabilidad de la membrana y porque inducen la síntesis de diversos compuestos (Hale y Moore 1979). Este último es el caso de *Rhizobium leguminosarum* en presencia de su planta hospedera, que provoca un incremento en la producción de flavonoides (Phillips et al. 1992).

Los compuestos liberados por las raíces y semillas pueden ser usados como sustratos de crecimiento, por esta razón, el suelo de la rizósfera tiene una densidad de bacterias 10-200 veces mayor a la del suelo adyacente (Whipp y Lynch 1985).

2.1.1. Competencia por carbono y nitrógeno.

Todas las plantas depositan compuestos no específicos que sirven como sustratos para el crecimiento de los microorganismos en la rizósfera.

Entre los azúcares identificados en una gran variedad de plantas, están la glucosa y la fructuosa como los más abundantes y en menor cantidad xilosa, ribosa, arabinosa, sacarosa y maltosa (Richards 1987). Las vitaminas que se han encontrado en los exudados de varias plantas son biotina y tiamina (Richards 1987). En alfalfa se exuda biotina, tiamina y riboflavina y éstas promueven el crecimiento de *S. meliloti* en la rizósfera. A pesar de que la misma bacteria las sintetiza, se ha demostrado que su concentración en la rizósfera no es suficiente, ya que si se añade cualquiera de éstas aumenta el crecimiento bacteriano. El efecto de la biotina en el crecimiento se debe a que es un cofactor para carboxilar enzimas como la acetil-CoA carboxilasa y la piruvato carboxilasa. La acetil-CoA carboxilasa cataliza la síntesis de ácidos grasos (Streit et al. 1996). La piruvato carboxilasa cataliza la carboxilación de piruvato para formar oxaloacetato, el cual se usa para suministrar intermediarios del ciclo de ácidos tricarbóxicos utilizados para la generación de energía y en biosíntesis (Dunn et al. 1996). No se sabe si el aumento de crecimiento de las bacterias de la rizósfera como respuesta a las vitaminas externas es un fenómeno general; de no ser así, las que puedan hacerlo tendrán una ventaja selectiva sobre las demás.

Desde hace algunas décadas ya se había observado que en varias especies de leguminosas (alfalfa, trébol, chícharo, frijol, soya y lupino) se favorecía el crecimiento de su propia bacteria noduladora durante los primeros 10-12 días después de la germinación (Tschailachjan y Megrabjan 1958 citado en van Egeraat 1975). Esta especificidad se pierde en plantas maduras, ya que en éstas los exudados promueven el crecimiento de otros grupos de bacterias. La estimulación inicial selectiva podría deberse a una exudación de compuestos particulares a cada especie de plantas o a cierto balance de compuestos, que le darían una ventaja competitiva a las bacterias del huésped. Posteriormente, se han encontrado algunos de estos compuestos específicos a ciertas plantas y se ha demostrado su utilización sólo por ciertas especies o cepas de microorganismos.

El tipo y la cantidad de aminoácidos secretados por cada especie de planta varía mucho (Richards 1987). Se ha observado que en plántulas de chícharo, del total de aminoácidos secretados, el 70% corresponde a la homoserina, el cual no se encuentra en otras especies. Se encontró que las

cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* que nodula chícharo, podían crecer en homoserina como única fuente de carbono (C) y nitrógeno (N), en cambio, *S. meliloti* sólo la podía usar como fuente de N, e incluso era tóxica para *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (huésped de trébol) y bv. *phaseoli* (huésped de frijol) (van Egeraat 1975, Hynes y O'Connel 1990).

La mimosina es una tóxica encontrada en grandes cantidades en las hojas, raíces y semillas de *Leucaena*. Esta inhibe el crecimiento y la síntesis de proteínas en microorganismos y tiene actividad antimetabólica en animales. La *Leucaena* es una fuente importante de proteínas para los rumiantes que viven donde éstas crecen siendo esto posible por la presencia en el rúmen de microorganismos que la degradan (Allison et al. 1992). De 92 aislados de nódulos de varias especies de *Leucaena*, 37 fueron capaces de usar mimosina como fuente de carbono y nitrógeno. Incluso en estas bacterias, el crecimiento final (D.O. a 600 nm) fue directamente proporcional a la concentración de mimosina en el medio. Ninguna cepa de *Rhizobium* aislada de nódulos de siete especies de leguminosas taxonómicamente cercanas pudo utilizarla (Soedarjo et al. 1994). Claramente, la incapacidad para utilizar mimosina no es un impedimento para nodular efectivamente a *Leucaena*, sin embargo, sí se ha visto una ventaja competitiva en las cepas que la degradan (Soedarjo y Borthakur 1996).

Otros metabolitos secundarios producidos más abundantemente por leguminosas y encontrados en semillas y exudados de plantas jóvenes son las betaínas (Tramontano et al. 1986). Estas son compuestos N-metilados derivados de aminoácidos. Entre éstas están la trigonelina, staquidrina, carnitina y colina (ver Fig. 2B). Se ha encontrado que algunas especies de *Rhizobium* y algunas otras bacterias de la rizósfera, pueden catabolizarlas, utilizándolos como única fuente de nitrógeno y carbono (Goldmann et al. 1991). En *S. meliloti* se ha visto que los genes esenciales para el catabolismo de todas las betaínas se encuentran en el plásmido simbiótico (Boivin et al. 1991, Goldmann et al. 1991). Los genes para el catabolismo de la trigonelina se encuentran inducidos en todos los pasos simbióticos, lo que sugiere que la trigonelina es una fuente de energía durante todo el proceso simbiótico (Boivin et al. 1990).

Las betaínas tienen además otras funciones. La trigonelina es un inductor débil de NodD2 (ver más adelante) en *S. meliloti*, el cual regula

los primeros genes necesarios para nodular (Phillips et al. 1992). La trigonelina también detiene la mitosis en la fase G2 en células de raíz en leguminosas (Evans y Tramontano 1984). Estaquidrina, carnitina y colina son osmoprotectores esenciales en condiciones de estrés osmótico, e incluso el catabolismo de colina está osmoregulado (Goldmann 1991). El significado de estas funciones no se ha comprendido totalmente, aunque todo indica que las betainas tienen un papel en simbiosis. Sin embargo, mutantes en *S. meliloti* en los genes *trc*, incapaces de degradar trigonelina, nodulan igual que la cepa silvestre (Boivin et al. 1991).

Otra clase de compuestos altamente específicos juegan un papel en la interacción patogénica de cepas de *Agrobacterium* con plantas superiores. Las opinas son aminoácidos raros o derivados de azúcares, producidas por las plantas en las agallas, después de que *Agrobacterium* ha transferido los genes para la síntesis de opina al genoma de la planta. La naturaleza de las opinas y su utilización por *Agrobacterium* como fuente de nitrógeno o de carbono, es específica de la cepa. Por esto se ha sugerido que la producción de opina por la planta provee al patógeno de un sustrato de crecimiento selectivo, favoreciendo su propagación y sobrevivencia en el suelo. Las opinas en baja concentración inducen los genes de virulencia de *Agrobacterium* cuando se encuentran en presencia de acetosiringona y en alta concentración reprimen su expresión. Estos genes también pueden ser inducidos por compuestos fenólicos como la acetosiringona que se produce en las heridas de las plantas, pudiéndose incrementar su inducción por algunos azúcares como la glucosa y la galactosa, especialmente cuando la acetosiringona es limitante (Dessaux et al. 1992).

Tratando de buscar compuestos similares a la opina en la relación simbiótica *S. meliloti* - alfalfa, se encontró una cepa (L5-30) que producía nódulos con un compuesto parecido (Murphy et al. 1987). Este es la rizopina L-3-O-metil-scylo-inosamina. Se ha demostrado que puede ser utilizada como única fuente de nitrógeno y carbono por la cepa L5-30, induciendo su catabolismo (Murphy et al. 1987). Los genes para la síntesis (*mos*) y catabolismo (*moc*) de la rizopina están ligados y localizados en el plásmido simbiótico (Murphy et al. 1987). Los genes *mos* sólo se expresan en nódulo y son regulados por el mismo sistema regulatorio que los genes de fijación de nitrógeno NifA-NtrA. Los genes *moc* se expresan en vida libre y permiten

a las cepas crecer en la rizopina sintetizada por los bacteroides (Murphy et al. 1988). Recientemente se ha descubierto otra rizopina, scylloinosamina. Se ha encontrado que 10% de las cepas de *S. meliloti* y 14% de las de *R. leguminosarum* bv. *viceae* son capaces de catabolizar las dos rizopinas, y no así cepas del biovar *phaseoli*, *trifolii* o de *R. etli*. En *S. meliloti* las mutantes deficientes en la habilidad para catabolizar rizopinas son menos competitivas para la nodulación formando menos del 5% de los nódulos al competir 1:1 con la silvestre. Se ha sugerido que las rizopinas podrían proveer de una nueva estrategia para incrementar la competencia y la persistencia de inoculantes de rhizobia en el suelo (O'Connell et al. 1996) al transferir los genes del catabolismo de estas rizopinas a las bacterias deseadas y los genes de la biosíntesis a las plantas (Murphy et al. 1995).

En *Rhizobium tropici* (que nodula frijol y otras leguminosas), encontramos una región genética inducida por exudados de raíz de frijol y de *Macroptilium atropurpureum* (leguminosas pertenecientes a la subtribu *Phaseolinae* de la subfamilia *Papilionoideae*) pero no de otras plantas. No se encontró inducción por extractos de nódulo ni en exudados de semillas. El compuesto inductor es transportado por la mayoría de las especies de *Rhizobium* que nodulan frijol. Esta región se encuentra en un plásmido que no tiene los genes esenciales para la nodulación, sin embargo, en otras especies como *R. etli* y *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, se encontró que los genes para transportar el compuesto se encuentran en el plásmido simbiótico. Los productos de los genes involucrados son similares a proteínas necesarias para el transporte de azúcares. El principal compuesto inductor no se ha identificado, pero cierta inducción se obtuvo con trigonelina, en la misma concentración con la que activa a NodD2 en *S. meliloti* (1mM). Algunas bacterias de *R. tropici* parecen tener un sistema adicional de transporte, ya que diferentes mutantes en esta región no pierden la capacidad de catabolizar el compuesto (Rosenblueth et al. aceptado) (Fig. 4). Este parece ser un caso similar al de la homoserina, que es sintetizada específicamente por una especie de planta y catabolizado por bacterias noduladoras de ésta.

Otras sustancias producidas por las raíces de las plantas y que pueden ser catabolizadas por bacterias específicas de la rizósfera, son las

calisteginas. Se detectaron solamente en 3 de 105 especies de plantas superiores examinadas: *Calystegia sepium*, *Convolvulus arvensis* (las dos de la familia *Convolvulaceae*) y *Atropa belladonna* (*Solanacea*). Las calisteginas son abundantes en las raíces y sólo hay pequeñas cantidades en la parte aérea. De 42 bacterias rizosféricas probadas sólo una (*S. meliloti* Rme41) fue capaz de catabolizar calisteginas y de usarlas como única fuente de carbono y de nitrógeno. Los genes para su catabolismo (*cac*) se localizaron en un plásmido autotransferible que no es esencial para la simbiosis. Este plásmido tiene homología con otros no simbióticos de otras cepas de *S. meliloti*. Rme41 curada de este plásmido no es capaz de catabolizar las calisteginas, pero la simbiosis la realiza en forma normal (Tepfer 1988). Aparentemente el catabolismo de calisteginas es independiente de la simbiosis y representa una forma para que las bacterias sobrevivan en la rizósfera de plantas no hospederas.

2.1.2. Competencia por Fe.

En la lucha por los nutrientes que se da en la rizósfera, el hierro es uno de los más requeridos, tanto por los microorganismos como por las plantas mismas. Unos y otras liberan sideróforos, moléculas con gran afinidad por el metal, para capturarlo. Mientras más eficientes son sus sideróforos, más acaparan el hierro; privando así a sus competidores de dicho elemento e impidiendo su crecimiento. El complejo Fe-sideróforo es asimilado por medio de receptores y transportadores específicos (Jurkevitch et al. 1992). Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular y aunque varían grandemente en su estructura química la mayoría tiene grupos catecol o hidroxamato (Neilands 1981). Así, por ejemplo *Pseudomonas* sintetiza sideróforos como la pioquelina y las pioverdinas. La constante de estabilidad del complejo Fe(III)-pioverdina es 10^{32} , mientras que la pioquelina es un sideróforo activo pero de baja afinidad con una constante de estabilidad de 10^5 . La pioquelina también es quelante de los iones de Zn(II), Cu(II), Co(II), Mo(II), y Ni(II), por lo que se piensa que una de sus funciones puede ser movilizar estos iones para introducirlos en la célula. Un precursor en la biosíntesis de la pioquelina es el ácido salicílico, que también actúa como sideróforo y es sintetizado por *pseudomonas* y micobacterias en respuesta a escasez de Fe(III). Se sabe que el salicilato

genera complejos Fe(III)-salicilato con constantes de estabilidad altas (10^{35}), a pesar de que se ha cuestionado su habilidad de secuestrar Fe(III) en presencia de ligandos competidores. Se ha especulado que la traslocación del complejo Fe(III)-salicilato al interior de la bacteria se lleva a cabo por receptores específicos y que tal vez el salicilato induzca la expresión de proteínas de membrana relacionadas con el ingreso de ferrisideróforos (Visca et al. 1993, Serino et al. 1997). Otras bacterias rizosféricas como *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* producen sideróforos de baja afinidad como el citrato (Guerinot et al. 1990, Lesueur et al. 1993). Cuando un organismo libera sideróforos, los complejos fierro-sideróforo pueden ser accesibles para otros organismos a menos de que los ligandos del organismo que liberó el sideróforo tengan constantes de formación más altas que los de sus competidores. La habilidad para robar los sideróforos producidos por otros organismos es también una estrategia adaptativa. La competencia por fierro se da en estos dos niveles, la competencia por el fierro entre los sideróforos excretados y la captura de los complejos fierro-sideróforo por los microorganismos. Por otra parte, aún cuando el acaparar fierro elimina a los competidores, existen mecanismos de regulación, ya que en altas concentraciones este metal es tóxico como consecuencia de su papel catalítico en la síntesis de radicales oxidantes (Flitter et al. 1983).

Por otra parte, se han observado tres estrategias en plantas para asimilar fierro. Las monocotiledóneas no gramíneas y todas las dicotiledóneas, acidifican la rizósfera aumentando la solubilidad del fierro. Otra estrategia, observada en las monocotiledóneas gramíneas, consiste en la secreción de fitosideróforos de la familia del ácido mugineico. Finalmente, las plantas también asimilan los sideróforos de los microorganismos (Loper y Buyer 1991).

2.2 Inducción del crecimiento.

Se ha encontrado que sustancias específicas de ciertas plantas pueden inducir el crecimiento bacteriano, dándole una ventaja competitiva en la rizósfera. Concentraciones micromolares de flavonoides estimulan el crecimiento de los rizobios (Phillips 1992, Dénarié et al. 1992). Esto se ha observado en *S. meliloti*, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* y *Pseudomonas putida*, pero no en *Bacillus subtilis* ni en *Agrobacterium tumefaciens*, con

crisina, luteolina y quercitina pero no con las flavonas 5-hidroxi flavona y 7-hidroxi flavona. Aparentemente el patrón de sustitución 5,7-dihidroxi es requerido para el efecto observado (Fig. 5). El tiempo de duplicación se llegó a reducir de tres a cinco veces. Como no hay evidencia de que el compuesto se metabolice, se ha concluido que los flavonoides probablemente incrementan el crecimiento a través de un evento regulatorio.

2.3 Quimiotaxis

La mayoría de las bacterias de la rizósfera pueden tener movilidad y quimiotaxis. La importancia de estos fenómenos en la competencia depende de las condiciones ambientales como son la textura y la humedad del suelo. La quimiotaxis puede realizarse mejor en suelos con mayor cantidad de arcilla y casi saturados de agua. Experimentos con mutantes en quimiotaxis muestran que bajo estas condiciones la quimiotaxis sí provee una ventaja competitiva. Muchas sustancias de los exudados de las raíces se han identificado como quimioatrayentes, como son azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos y compuestos aromáticos. En *Rhizobium* y en *Agrobacterium* se ha reportado quimiotaxis tanto a compuestos que inducen los genes para la nodulación o para la virulencia respectivamente, como a otros que pueden ser catabolizados o que sólo le indican a la bacteria la presencia de cierta planta (Vande Broek y Vanderleyden 1995).

En *B. japonicum* los inductores de la transcripción de los genes de nodulación (*nod*), como las isoflavonas, son atrayentes débiles, los principales son los ácidos dicarboxílicos y los aminoácidos glutamato y aspartato. Las mutantes en los genes de nodulación no tienen decremento en la quimiotaxis hacia ninguno de estos compuestos (Barbour et al. 1991). En cambio, en *S. meliloti* la luteolina, uno de los principales inductores de los genes *nod*, es un quimioatrayente fuerte y a su vez, mutantes en *nodD*, *nodA* o *nodC* se ven afectados en la quimiotaxis de este elemento. En forma similar en *R. leguminosarum* bv. *viciae*, cepas curadas del plásmido simbiótico tienen una respuesta menor a atrayentes fuertes que son los mismos que inducen la transcripción de genes *nod* (apigenina y naringenina), pero la quimiotaxis a homoserina no es afectada (Armitage et al. 1988).

2.4 Producción de antibióticos

La presencia de patógenos en el suelo impone una presión selectiva sobre las plantas. Esto favorece la sobrevivencia de las plantas que albergan en su rizósfera microorganismos antagónicos a los patógenos. Esta estrategia natural de asociarse con los enemigos del patógeno ha sido aprovechado en los cultivos. En el trigo se ha conseguido un incremento en la productividad de 33% aplicando en los cultivos de trigo *Pseudomonas* contra plagas del hongo *Gaeumannomyces graminis* var tritici. Este es un caso, como muchos otros, en el que plantas y animales se mantienen libres de infecciones por patógenos virulentos debido a las floras microbianas naturales que albergan (Cook et al. 1995).

La producción de antibióticos para eliminar competidores requiere de un alto suministro de carbono. En la rizósfera se conjugan dicho suministro, un ambiente de alta interacción y actividad microbianas y una gran competencia, por lo que es un sitio en donde la síntesis de antibióticos puede ser ventajosa en la colonización.

En el caso de *Pseudomonas*, la síntesis del antibiótico fenazina tiene mayor importancia para que la *Pseudomonas* sobreviva cuando la raíz está sana que si está infectada por el hongo *Gaeumannomyces graminis* var tritici. Las raíces infectadas tienen una población bacteriana mayor, probablemente debido a que los nutrientes se escapan por las lesiones producidas por la infección. En cambio, la restricción de nutrientes en las raíces sanas hace que la competencia por nutrientes sea más intensa y que la síntesis de antibióticos para eliminar a los competidores sea más valiosa (Mazzola et al. 1992).

Algunos de los mecanismos de la síntesis de antibióticos por rizobacterias han comenzado a entenderse. Por ejemplo se sabe que los genes tienden a estar agrupados y que algunos genes regulatorios están ligados. En *Pseudomonas fluorescens* la síntesis de oomicina A requiere de al menos ocho genes. Aparentemente existen tres niveles de regulación de síntesis del antibiótico. El primero está influido por las condiciones ambientales, el segundo por procesos metabólicos y el tercero por la concentración de antibiótico alcanzada (Cook et al. 1995).

La producción de antibióticos contra patógenos por microorganismos

en su competencia por espacio en la rizósfera es análoga a la síntesis de fitoalexinas por la planta para defenderse. Banger et al. encontraron que la proteína codificada por un cierto locus en *Pseudomona* muestra similitud con la chalcona-sintasa/stilbena sintasa del fenil-propano. Estas enzimas han sido encontradas exclusivamente en plantas en donde tienen una función en la síntesis de flavonoides y fitoalexinas (Banger et al. 1994). Esto sugiere que pudo haber ocurrido una transferencia genética entre planta y microorganismo o que ambos mecanismos pudieron haber tenido un origen evolutivo común (Cook et al. 1995). Probablemente los microorganismos produzcan compuestos como salicilato que induce mecanismos de defensa en las plantas, de modo que también la participación de las plantas en su propia defensa puede ser más activa que nada más ofrecer un sitio para la competencia entre microorganismos.

La trifolitoxina (TFX) es el sistema de producción de antibióticos más caracterizado en *Rhizobium*. Es un péptido modificado después de su traducción, producido por una sola cepa de *R. leguminosarum* bv. trifolii inhibe distintas α -proteobacterias, incluyendo todas las especies de *Rhizobium* probadas y dos de tres especies de *Agrobacterium*. Otras especies inhibidas son *Mycoplana*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium* y *Brucella*. Un operón de 7 genes está involucrado en la producción de TFX y en la resistencia a la misma. La producción de TFX aumenta la capacidad competitiva del *Rhizobium* (Maier y Triplett 1996). Muchas cepas producen bacteriocinas que sólo son activas sobre un limitado espectro de cepas de *Rhizobium*. Estas bacteriocinas no se han caracterizado.

El conocer las características que hacen a un microorganismo un buen defensor de la planta contra patógenos, puede ayudar en la selección de cepas mejoradas y la aplicación de éstas para controlar patógenos de plantas ayudaría a reducir la contaminación causada por el uso de pesticidas. Sin embargo, un antibiótico que no actúe sobre todos los genotipos de un patógeno puede seleccionar variedades resistentes del mismo, difíciles de combatir.

2.5 La resistencia a compuestos tóxicos de la planta.

A través de la vía de biosíntesis conocida como del fenilpropanoide, las plantas producen una gran diversidad de compuestos como precursores

de lignina, flavonoides e isoflavonoides (Hahlbrock y Scheel 1989). La lignificación de las paredes de las plantas tiene lugar en respuesta a la invasión de los patógenos. Muchos de los flavonoides e isoflavonoides designados colectivamente como fitoalexinas tienen actividad antibacteriana y fungicida.

Como otros microorganismos (Gnanamanickam y Smith 1980), *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (bacterias fijadoras de nitrógeno que se asocian con leguminosas) son sensibles a las fitoalexinas (Pankhurst y Biggs 1980). Sin embargo, en estas bacterias existen mecanismos de resistencia (Parniske et al. 1991). Uno de estos, en *Rhizobium*, consiste en un sistema de transporte (inducible por los exudados de la planta) que bombea al exterior las fitoalexinas que entran a las bacterias. Una cepa de *R. etli*, simbiote del frijol, mutante en este sistema, tiene un crecimiento disminuido en presencia de la raíz y forma menos nódulos (González-Pasayo y Martínez-Romero datos no publicados) (Fig. 6). Estos defectos son más dramáticos en condiciones donde las plantas producen más fitoalexinas por estar infectadas por un hongo patógeno. En *Rhizobium* también se han descrito las vías que catabolizan distintos flavonoides (Rao y Cooper 1994). Además, los exopolisacáridos y lipo-polisacáridos de *Rhizobium*, que pueden servir para que el *Rhizobium* se adhiera a la raíz, parecen actuar como una barrera que impide que las fitoalexinas penetren dentro de las células (Eisenschenk et al. 1994). Es de preguntarse cuáles de estos mecanismos existen en otros microorganismos de la rizósfera.

2.6 Depredación.

Además de la competencia entre los microorganismos de la rizósfera, otro factor biótico que afecta la dinámica de las poblaciones es la depredación. En cada gramo de suelo viven millones de protozoarios que se alimentan principalmente de bacterias y de hongos (Ekelund y Ronn 1994, Rodríguez-Zaragoza 1994). Pueden moverse por pequeños poros del suelo gracias a su flexibilidad y a su pequeño tamaño. Con frecuencia las bacterias modificadas genéticamente e introducidas en el suelo con diferentes fines son depredadas por los protozoarios nativos. Las interacciones bioquímicas entre bacterias y protozoarios en la rizósfera y los mecanismos utilizados por las bacterias para evadir a sus depredadores, han sido poco estudiados.

Los micropredadores forman parte importante de los ciclos bioquímicos del suelo, ya que la degradación que hacen de las bacterias aumenta la fertilidad del suelo. La microfauna (protozoarios y nemátodos) contribuye a la mineralización del fósforo y en el caso del nitrógeno, se calcula que el 30% de la mineralización total de este elemento proviene de la fauna, principalmente de la microfauna (Barker y Brown 1994, Griffiths 1994, Kajak 1995).

II. Ecología química de asociaciones y simbiosis.

3.1. *Azospirillum*

Especies de bacterias del género *Azospirillum* que habitan en las rizósferas de plantas tienen efectos benéficos por promover el crecimiento y desarrollo de la raíz al producir concentraciones elevadas de auxinas (revisado en Costacurta et al. 1994). En un principio se pensó que los efectos benéficos de *Azospirillum* pudieran deberse a la fijación de nitrógeno, pero esto no fue el caso ya que *Azospirillum* prácticamente no proporciona el nitrógeno fijado a la planta (Michiels et al. 1989, Kapulnik et al. 1985). Se sabe poco de qué depende que existan poblaciones de *Azospirillum* en suelo o qué rizósferas son más propicias para su desarrollo, ya que no es muy frecuente en condiciones naturales. Ha resultado bastante exitosa su inoculación en muy diversas plantas: maíz, trigo, cactus (Mascarúa-Esparza et al. 1988) y otras. El análisis de los resultados de 20 años de inoculación en campo muestra que, a pesar de cierta variabilidad y del requerimiento de una cantidad de bacterias óptima en el inóculo, *Azospirillum* es un adecuado promotor del crecimiento en plantas (Okon y Labandera-González 1994). Se ha observado que distintos azúcares de la raíz tienen un efecto quimiotáctico sobre la bacteria. Se ha reportado que el pegado de *Azospirillum* a la raíz requiere de polisacáridos de la bacteria (Vande Broek y Vanderleyden 1995) y se han estudiado las vías de biosíntesis de auxinas por *Azospirillum* (Costacurta et al. 1994). Llama la atención que prácticamente todas las especies de bacterias que se asocian de una u otra manera con plantas, producen hormonas vegetales, auxinas o citocininas. Los niveles de producción son variables y tal vez están en relación con los tipos de efectos que tienen las bacterias sobre las plantas mediados por hormonas en conjunto con otros efectores.

3.2 Micorriza

La micorriza arbuscular es la simbiosis más frecuente entre las plantas superiores. Alrededor del 80% de las plantas participan de esta simbiosis (Bianciotto 1996). Los hongos seguramente producen sustancias de crecimiento que inducen alteraciones morfológicas (vesículas) en las raíces (Holley y Peterson 1979). Se ha encontrado acumulación de citocininas en las raíces con micorriza (van Rhijn et al. 1997). El micelio del hongo aumenta la superficie de absorción, de modo que las plantas en simbiosis absorben nutrientes del suelo más eficientemente. La micorriza transporta fósforo, agua y otros nutrientes a las plantas. Se ha reportado que se incrementan los azúcares y los aminoácidos en las plantas crecidas en bajos niveles de fósforo y esto se correlaciona con una mayor colonización del hongo (Graham et al. 1981). Ambos organismos efectúan un intercambio; la planta cede compuestos de carbono mientras que recibe un suministro de nutrientes minerales (Smith y Gianinazzi-Pearson 1988). La interdependencia es tan grande que a muchos hongos micorrízicos no se les puede cultivar en ausencia de la planta y muchas plantas no son capaces de crecer sin la micorriza. Las plantas también son más resistentes a patógenos gracias a la presencia de micorriza.

Aún cuando no se conocen los mecanismos precisos del establecimiento de esta simbiosis, se sabe que algunos compuestos secundarios tienen un papel en esta interacción entre la planta y el hongo. Existe evidencia de que algunos exudados y extractos de plantas favorecen la germinación de las esporas de los hongos de micorriza arbuscular. Muchas especies de leguminosas establecen simbiosis tanto con bacterias fijadoras de nitrógeno como con hongos de micorriza. En condiciones *in vitro* algunos flavonoides de las semillas y raíces de la alfalfa favorecen la germinación de las esporas de hongos micorrízicos. Como consecuencia de la aplicación de quercitina, flavonoide producido normalmente por la alfalfa, el hongo *Glomus*, aumentó la germinación de las esporas y la elongación y ramificación de las hifas del hongo (Tsai y Phillips 1991). Sin embargo, no se sabe si estos dos últimos resultados sean realmente efecto de la aplicación del flavonoide o una consecuencia del aumento en la germinación de las esporas. Los hongos micorrízicos arbusculares también tienen un efecto en el

metabolismo de flavonoides de las plantas y estos compuestos a su vez promueven la diferenciación del hongo (Blee y Anderson 1996) aunque no son necesarios para el establecimiento de las vesículas (Becard et al. 1995).

En el caso de la cebada, durante las fases iniciales de la colonización de las raíces, la planta acumula metabolitos secundarios, aparentemente como respuesta defensiva ante el hongo. Posteriormente esta defensa se suspende, tal vez por acción del hongo mismo, de modo que no se produce reforzamiento de las paredes para impedir la entrada de las hifas ni producción de fitoalexinas que pudieran inhibir a la micorriza (Peipp et al. 1997).

La micorriza ofrece también un ejemplo de la complejidad de las interacciones que se llevan a cabo en la rizósfera. Ella misma alberga dentro de su citoplasma una gran población de organismos: bacterias (aún no cultivables en laboratorio) que se multiplican y se desplazan de la espora hacia el micelio y a la raíz de la planta. Estas bacterias simbiotes están presentes en todas las fases del ciclo del hongo y su participación dentro de la micorriza se desconoce por ser muy reciente este hallazgo (Bianciotto 1996).

Parece que las plantas no tienen funciones exclusivas para su interacción con un tipo de microorganismos. Hay plantas en las que algunas mutantes, incapaces de establecer simbiosis con la micorriza (mic⁻), también son incapaces de establecer simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Rhizobium* (Bradbury et al. 1993, Duc et al. 1989). También se ha visto que plantas que se han seleccionado como resistentes a patógenos son mic⁻. Se han identificado maíces con diferentes capacidades para establecer simbiosis con micorriza.

Recientemente han despertado interés las llamadas células de frontera (border cells), que son liberadas por la raíces en el ambiente inmediato y que extienden el área de influencia de la rizósfera. Estas células son metabólicamente activas, al separarse de la raíz siguen patrones de expresión genética particulares y muestran diferenciación. Aparentemente existe una correlación entre la existencia y cantidad de células de frontera y el establecimiento de la micorriza. Las células de frontera se distribuyen principalmente en la misma área de penetración de los hongos (patógenos o

micorrízicos) a la raíz. Parece ser que las células de frontera atraen químicamente a algunos hongos y pueden influir en el comportamiento de la micorriza (Niemira et al. 1996).

3.3. Simbiosis *Rhizobium*-leguminosa

Flavonoides e isoflavonoides (Fig. 4) estimulan las simbiosis benéficas, que culminan en la formación de nódulos fijadores de nitrógeno. No sólo incrementan la germinación de la micorriza (como ya se mencionó), sino también son los principales responsables para la activación de los genes de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (genes *nod*) necesarios para la nodulación (revisado en Rolfe 1988) (Fig. 7 y 8). Los tipos de flavonoides producidos por cada especie de leguminosa no son idénticos (Fig. 7). Diferentes clases de flavonoides surgieron secuencialmente en la evolución de las plantas (Koes et al. 1993). Se ha propuesto una quimiotaxonomía de las tribus dentro de las leguminosas en base a las diferentes sustituciones químicas de los flavonoides (Perrino et al. 1989). Los flavonoides exudados por las raíces de algunas plantas se han identificado. En frijol se producen, por ejemplo, eriodictiol, naringenina y genisteina (Hungria et al. 1991, 1991a), en soya, daidzeina y genisteina (Arcy-Lameta 1986) y en el trébol diferentes hidroxiflavonas (Redmond et al. 1986) (Fig. 5).

Una proteína de la membrana del *Rhizobium*, NodD, reconoce al flavonoide (Schlaman et al. 1989) (Fig. 7). Sustituyendo los genes *nodD* entre diferentes especies de *Rhizobium* se puede alterar la capacidad de nodular de estas bacterias, adquiriéndose la determinada por el NodD (Spaink et al. 1987). Además mediante manipulaciones genéticas se construyó un NodD independiente de flavonoides que está en forma activa, que estimula de manera autónoma y continúa la expresión de los genes *nod* (Spaink et al. 1989). NodD funciona como activador de la transcripción de los genes al pegarse a la región regulatoria en secuencias específicas de DNA (con afinidad por NodD) conocidas como cajas *nod* (Rostas et al. 1986) (Fig. 8). Los genes *nod* adyacentes, ya activos sintetizan la maquinaria que produce un tipo peculiar de compuestos (tal vez un nuevo tipo de hormona vegetal) que constituye una señal para que la planta inicie la formación de nódulos (Lerouge et al. 1990). Estos compuestos son variantes de una estructura básica de oligoquitina con un lípido pequeño en el extremo no reductor

(Lerouge et al. 1990, Schultze et al. 1992, y otros citados en Dénarié et al. 1992) (Fig. 10).

Se han identificado alrededor de 15 genes (*nod*, *noi* y *noe*) que participan en la síntesis de factores Nod (Carlson et al. 1994). Llama la atención que el número de otros genes también llamados *nod* y con función desconocida, es mucho mayor (Pueppke 1996). Estos últimos han sido identificados porque al interrumpirlos mediante mutaciones, se interfiere en cierta medida el proceso de nodulación. En otros casos se les ha atribuido el título de "*nod*" por estar en cercanía con otros genes *nod* o en operones adyacentes a cajas *nod*.

Diferentes modificaciones químicas de la molécula del factor Nod se asocian a la capacidad de producir nódulos en distintas plantas (Dénarié et al. 1992, Dénarié et al. 1996). Así se requiere un tamaño específico de molécula, un sulfato y un lípido poli-insaturado para que se formen nódulos en la alfalfa (Truchet et al. 1991), la presencia de un grupo acetilo en un sitio específico, mejora la nodulación. Los factores Nod añadidos a la planta en ausencia de la bacteria son capaces de promover la producción de nódulos (Truchet et al. 1991). Tienen actividad mitogénica (Van Brussel et al. 1992) y estimulan por lo tanto la división celular (Maier y Triplet, 1996). En dos casos (en *Vigna unguiculata* y en *Glycine max*), se ha podido complementar a una mutante incapaz de nodular añadiendo los Factores Nod al mismo tiempo que la bacteria a la planta, obteniéndose nódulos fijadores de nitrógeno (Relic et al. 1994). Se desconoce por qué no ha funcionado este tipo de experimentos en alfalfa, en frijol y en chícharo.

El código de comunicación entre plantas y bacterias basado en los factores Nod no está descifrado completamente y pudiera abarcar a otro tipo de moléculas. Los lipopolisacáridos (componentes de membrana externa) en *R. meliloti* también se sulfatan en forma dependiente de los genes *nod*. En otros casos, donde se sobreexpresan unos genes *nod*, se ha encontrado que los ácidos grasos de las membranas de *Rhizobium* son del mismo tipo que los factores Nod. Se ha encontrado que una misma bacteria produce una diversidad de moléculas de factores Nod (Schultze et al. 1992, Stokkermans et al. 1996), las cuales parecen tener en la raíz efectos sinérgicos entre ellas (Stacey et al. 1997) ya que mezclas de factores Nod en soya producen un proceso de diferenciación más completo (en ausencia de la

bacteria). En otro caso más extremo, el *Rhizobium* (*R. fredii* NGR234) con el rango de nodulación más amplio, produce una familia compleja de moléculas que se asocian a la capacidad extendida para formar nódulos en muchas leguminosas (Price et al. 1992, Relic et al. 1994). En frijol, factores Nod con características diferentes son capaces de formar nódulos en sus raíces. Correlacionado con esto, distintas especies de *Rhizobium* (*R. etlii* y *R. tropici*), que nodulan y fijan nitrógeno en frijol, producen factores Nod con diferentes sustituyentes químicos (Poupot et al. 1993, 1995). Parecería que las distintas especies y aun distintas variedades dentro de una especie de leguminosas tienen requerimientos diversos de estructura específica de los factores Nod. Así, encontramos que cepas de *R. tropici* que no producen factor Nod sulfatados, incrementan su capacidad de nodulación en una variedad de frijol pero tienen una capacidad disminuida en otra (Laeremans et al. 1996). Una hipótesis atractiva que se ha planteado es que en uno de los linajes evolutivos que dio origen a las leguminosas templadas (consideradas más recientes, ya que a la familia Leguminosae se le atribuye un origen tropical) surgió un tipo de receptor que reconoce enlaces dobles (insaturaciones) en el lípido del factor Nod (Ardourel et al. 1994). Las bacterias de *Rhizobium* que no producen este lípido en su factor Nod son incapaces de penetrar a su planta específica. Este pudiera constituir parte del mecanismo de especificidad que limita la entrada de otras muchas especies de *Rhizobium* o *Bradyrhizobium*. Las leguminosas tropicales son en general muy promiscuas estableciendo simbiosis con un gran número de especies de *Rhizobium* o *Bradyrhizobium* y tal vez no tuvieran este tipo de receptor.

Compuestos semejantes a los Factores Nod pudieran existir naturalmente en plantas en otros procesos de diferenciación. Lipo-oligosacáridos sintetizados *in vitro* (semejantes a los factores Nod) estimularon el crecimiento de protoplastos de tabaco (Röhrig et al. 1995). Los factores Nod de *Rhizobium* permitieron el desarrollo normal de embriones mutantes de zanahoria obtenidos previamente por mutagénesis química (De Jong et al. 1993). Estos mutantes de zanahoria carecen de una endoquitinasa y no pueden formar masas proembriogénicas y embriones globulares a partir de una suspensión de células a una temperatura específica (llamada no-permisiva). Debido a que la adición de una endoquitinasa restablece el

proceso embrionario, se supuso que algún producto de esta quitinasa (la quitinasa degrada quitina que está formada por n-acetil-glucosamina) también pudiera complementar el defecto genético. De todos los compuestos oligoméricos de acetilglucosamina probados sólo los factores Nod de *Rhizobium* suplieron la función para que los embriones se desarrollaran normalmente (De Jong et al. 1993).

Estos resultados han promovido la búsqueda de este tipo de moléculas en procesos de diferenciación y en el sapo *Xenopus* se encontró que la proteína de desarrollo DG42 que tiene parecido con NodC encargada de la síntesis del oligómero de quitina del Factor Nod, produce también oligosacáridos de quitina en el desarrollo embriogénico del sapo (Semino y Robbins 1995). La proteína del desarrollo DG42 se expresa transitoriamente entre el estadio medio de la blástula y la gástrula en la embriogénesis de *Xenopus* y del pez cebra (Bakkers et al. 1997). Cuando se micro-inyectaron huevos fertilizados de pez cebra con anticuerpos anti DG42 o con la enzima NodZ de *Bradyrhizobium*, se interrumpió el desarrollo normal y se ocasionaron defectos severos en la formación de la cola y del tronco (Bakkers et al. 1997). La enzima NodZ de *Bradyrhizobium* modifica químicamente a oligosacáridos de quitina en los factores Nod, al incorporarles una fucosa en el extremo reductor. NodZ no incorpora fucosa en sustratos relacionados como quitosan o hialuronan, por lo que es una buena prueba de que el compuesto producido por estos organismos tiene una estructura semejante a los factores Nod. De hecho, se ha demostrado la producción de oligosacáridos *in vitro* en extractos de embriones de estos peces (Bakkers et al. 1997). En el ratón se ha descrito una proteína con 97% de identidad con DG42. Todos los datos presentados apuntan que estas señales moleculares como factores Nod no son peculiaridades exclusivas de la interacción *Rhizobium*-leguminosa, sino son un tipo de morfógenos (que regulan procesos de diferenciación) extendidos en diferentes seres vivos.

Existe un gran interés en aislar los receptores a los factores Nod en las plantas e identificar las vías de transducción de estas señales. Se ha visto que los Factores Nod producen despolarización de las membranas (Kurkdijan 1995) y movimientos de calcio en las células vegetales (Ehrhardt et al. 1996, Gehring et al. 1997). De *Dolichos biflorus* se aisló una lectina

de la raíz cuyo ligando de mayor afinidad es un Factor Nod (Etzler y Murphy 1996). Esta lectina tiene actividad de apirasa incrementada por el pegado de su ligando, su concentración se inhibe en presencia de amonio (que también inhibe la nodulación por la bacteria) y se localiza en la superficie de los pelos de la raíz. Se propone que esta lectina es uno de los receptores de los factores Nod. En otras leguminosas se han identificado homólogos a este gene. En otros casos se ha descrito que el receptor se encuentra en una muy baja concentración en las células vegetales (Bono et al. 1995), y se han identificado receptores de alta y baja afinidad.

El diálogo molecular entre plantas y bacterias para la nodulación es seguramente sólo una parte de todo el proceso simbiótico. Otro tipo de señales, por ejemplo la limitación de oxígeno dentro del nódulo, es responsable de que la bacteria se diferencie a bacteroide, que es la forma activa que fija el nitrógeno dentro de los nódulos de las raíces (Reyrat et al. 1993).

Además de las leguminosas, existen otras 7 familias de plantas que son capaces de establecer nódulos en sus raíces. De todas estas especies sólo *Parasponia* también establece simbiosis con bacterias de la especie *Rhizobium*, mientras que todas las otras tienen en sus nódulos bacterias actinomicéticas del tipo *Frankia*. En analogía con la investigación en *Rhizobium*, se están buscando los equivalentes a factores Nod en estas bacterias.

Las plantas que por albergar *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* en los nódulos de sus raíces fijan nitrógeno, tienen una clara ventaja sobre otras plantas cuando los suelos son pobres en nutrientes nitrogenados. Con frecuencia son las que colonizan dichas regiones y una vez que la cubierta vegetal se ha establecido y el suelo se ha enriquecido de nitrógeno, su ventaja disminuye y con frecuencia son desplazadas por otras. La necesidad de nitrógeno es el segundo factor limitante más importante, después del agua, para el establecimiento de cultivos. Una de las contribuciones prácticas de la investigación en fijación de nitrógeno ha sido la de proveer inóculos de *Rhizobium* para la agricultura. Recientemente se ha visto que la inoculación conjunta de *Azospirillum* y *Rhizobium* tienen efectos positivos sobre la nodulación, por lo que en el futuro los inóculos conteniendo diferentes especies pudieran tener aplicación práctica.

III. Conclusiones y perspectivas.

Pese a ser un sitio propicio para la proliferación de microorganismos, la rizósfera no es homogénea. En grandes superficies de raíz no hay suficientes nutrientes y es en los sitios preferenciales de excreción de éstos donde la competencia entre microorganismos tiene lugar. Entre los habitantes de la rizósfera se encuentran los rhizobia y géneros relacionados, las distintas especies de *Azospirillum*, micorriza, *Pseudomonas*, *Klebsiellas*, entre otras. Sus estrategias para sobrevivir allí y proliferar son diversas. Sin embargo, del análisis de las interacciones entre microorganismos y plantas comienzan a emerger mecanismos comunes, destacándose la existencia de señales que median la comunicación química entre plantas y bacterias.

Por su importancia agrícola, la simbiosis mejor estudiada es la de *Rhizobium*-leguminosa y se ha vuelto un modelo para el estudio de otras interacciones planta-bacteria. El descubrimiento de los factores de nodulación ha sido uno de los avances más sobresalientes en este campo. Sin embargo, el contexto ecológico de esta simbiosis no se ha explorado aún lo suficiente, v. g. los efectos simultáneos de la micorriza con *Rhizobium*.

Mucho del trabajo acerca de la interacción entre las plantas y los microorganismos de la rizósfera se ha realizado con especies determinadas; en cambio, se sabe poco de las comunidades de microorganismos y sus interacciones en las raíces de las plantas. El descubrimiento, por análisis de DNA, de que la mayor parte de los microorganismos del suelo son desconocidos y no cultivables, ha aumentado el interés en el estudio de comunidades, incluyendo las de rizósfera; sin embargo, hay todavía muy pocos reportes al respecto. No deberá sorprendernos si algún tipo bacteriano que juegue un papel clave en la ecología de la rizósfera y que no haya sido aislada a la fecha en medios de cultivo convencionales, sea identificada en un futuro cercano.

El interés en los microorganismos del suelo y la rizósfera tiene además aplicaciones reales, por ejemplo, la industria farmacéutica ha comenzado a investigar el papel de antibióticos naturales e incluso se

Bibliografía

Allison, M. J., W. R. Mayberry, C. S. Mcweeney, and D. A. Stahl. 1992. *Synergistes jonesii*, gen. nov., sp. nov.: a rumen bacterium that degrades toxic pyridinediols. *Systematics Applied Microbiology* 15:522-529.

Arcy-Lameta, A. 1986. Study of soybean and lentil root exudates. *Plant and Soil* 92:113-123.

Ardourel, M., Demont, N., Debellé, F., Maillet, F., de Billy, F., Promé, J.-C., Dénarié, J. and G. Truchet. 1994. *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide nodulation factors: different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic developmental responses. *The Plant Cell* 6:1357-1374.

Armitage, J. P., A. Gallagher, and A. W. B. Johnston. 1988. Comparison of the chemotactic behavior of *Rhizobium leguminosarum* with and without the nodulation plasmid. *Molecular Microbiology* 2:743-748.

Ayers, W. A. and R. H. Thornston. 1968. Exudation of Amino acids by intact and damaged roots of wheat and peas. *Plant and Soil* 28:193-207.

Bakkers, J., C. E. Semino, H. Stroband, J. W. Kijne, P. W. Robbins, and H. P. Spaink. 1997. An important developmental role for oligosaccharides during early embryogenesis of cyprinid fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 94:7982-7986.

Bangera, M. G., D. M. Weller, and L. S. Thomashow. 1994. Genetic analysis of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic locus from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. In Daniels, M. J., J. A. Downie, and A. E. Osbourn (eds.) *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, vol. 3, pp 383-386.

Barbour W. M., D. R. Hattermann, and G. Stacey. 1991. Chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean exudates. *Applied and Environmental Microbiology* 57:2635-2639.

- Barker, J. and M. R. W. Brown. 1994. Trojan horses of the microbial world: Protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology* 140:1253-1259.
- Becard, G., L. P. Taylor, D. D. Douds, P. E. Pfeffer, L. W. Doner. 1995. Flavonoids are not necessary plant signal compounds in arbuscular mycorrhizal symbioses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8:252-258.
- Bianciotto, V., C. Bandi, D. Minerdi, M. Sironi, H. Volker Tichy, and P. Bonfante. 1996. An obligately endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligately intracellular bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 62:3005-3010.
- Blee, K. A. and A. J. Anderson. 1996. Defense-related transcript accumulation in *Phaseolus vulgaris* L. colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* Schenck and Smith. *Plant Physiology* 110:675-688.
- Boivin, C., S. Camut, C. A. Malpica, G. Truchet, and C. Rosenberg. 1990. *Rhizobium meliloti* genes encoding catabolism of trigonelline are induced under symbiotic conditions. *Plant Cell* 2:1157-1170.
- Boivin C., L. R. Barran, C. A. Malpica, C. Rosenberg. 1991. Genetic analysis of a region of the *Rhizobium meliloti* pSym plasmid specifying catabolism of trigonelline, a secondary metabolite present in legumes. *Journal of Bacteriology* 173:2809-2817.
- Bono, J.-J., J. Rioud, K. C. Nicolaou, N. J. Bockovich, V. A. Estevez, J. V. Cullimore, and R. Ranjeva. 1995. Characterization of a binding site for chemically synthesized lipo-oligosaccharidic NodRm factors in particulate fractions prepared from roots. *The Plant Journal*, 7:253-260.
- Bradbury, S. M., R. L. Peterson, and S. R. Bowley. 1993. Further evidence for a correlation between nodulation genotypes in alfalfa (*Medicago sativa* L.) and mycorrhiza formation. *New Phytology* 124:665-673.
- Bruehl, G. W. 1987a. The rhizosphere. In *Soil Borne Plant Pathogens*. Mac Millan Publishing Company, New York, Capítulo 7, pp. 105-116.

Bruehl, G. W. 1987b. Spermosphere. In Soil Borne Plant Pathogens. Mac Millan Publishing Company, New York, Capitulo 8, pp. 117-124.

Van Brussel, A. A. N., R. Bakhuizen, P. C. van Spronsen, H. P. Spaink, T. Tak, B. J. J. Lugtenberg, J. W. Kijne. 1992. Induction of pre-infection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipo-oligosaccharides of *Rhizobium*. *Science* 257:70-72.

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

Cook, R. J., L. S. Thomashow, D. M. Weller, D. Fujimoto, M. Mazzola, G. Banger, and D. -S. Kim. 1995. Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *Proceedures of the National Academy of Sciences U.S.A.* 92:4197-4201.

Costacurta, A., V. Keijers, and J. Vanderleyden. 1994. Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene. *Molecular and General Genetics* 243:463-472.

Curl, E. A. and B. Truelove. 1986. *The Rhizosphere*. Springer-Verlag (Berlin).

Dénarié, J., F. Debellé, and C. Rosenberg, C. 1992. Signaling and host range variation in nodulation. *Annual Reviews of Microbiology* 46, 497-531.

Dénarié, J., F. Debellé, and J.-C. Promé. 1996. *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual Reviews of Biochemistry* 65, 503-535.

Dessaux, Y., A. Petit, J. Tempe. 1992. Opines in *Agrobacterium* biology. In Verma D. P. S. (ed) *Molecular signals in plant-microbe communications*. CRC Press, Boca Raton Fla. pp. 109-136.

- Duc, G., A. Trouvelot, V. Gianinazzi-Pearson, and S. Gianinazzi. 1989. First report of non-mycorrhizal plant mutants (*Myc super(-)*) obtained in pea (*Pisum sativum* L.) and faba bean (*Vicia faba* L.). *Plant Sciences* 60:215-222.
- Dunn, M. F., S. Encarnación, G. Araíza, M. C. Vargas, A. Dávalos, H. Peralta, Y. Mora, and J. Mora. 1996. Pyruvate carboxylase from *Rhizobium etli*: mutant characterization, nucleotide sequence, and physiological role. *Journal of Bacteriology* 178:5960-5970.
- Van Egeraat A. W. S. M. 1975. The possible role of homoserine in the development of *Rhizobium leguminosarum* in the rhizosphere of pea seedlings. *Plant and Soil* 42:381-386.
- Ehrhardt, D. W., R. Wais, and S. R. Long. 1996. Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Cell* 85:673-681.
- Eisenschenk, L., R. Diebold, J. Perez-Lesher, A. C. Peterson, N. K. Peters, and K. D. Noel. 1994. Inhibition of *Rhizobium etli* polysaccharide mutants by *Phaseolus vulgaris* root compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 60:3315-3322.
- Ekelund, F., and R. Ronn. 1994. Notes on protozoa in agricultural soil with emphasis on heterotrophic flagellates and naked amoebae and their ecology. *FEMS Microbiology Reviews* 15:321-353.
- Etzler, M. E., and J. B. Murphy. 1996. Do legume vegetative tissue lectins play roles in plant-microbial interactions? In Stacey, G., B. Mullin, and P. M. Gresshoff (eds.). *Biology of Plant-Microbe Interactions. Proceedings of the 8th International Symposium on Molecular Plant-Microbe Interactions*. International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions, St. Paul, Minnesota, U. S. A. pp 105-110.
- Evans, L. S. and W. A. Tramontano. 1984. Trigonelline and promotion of cell arrest in G2 of various legumes. *Phytochemistry* 23:1837-1840.
- Fitter, A. H., and R. K. Hay. 1981. *Environmental Physiology of Plants*. Academic Press, London, pp 107-110.

Flitter, W., D. A. Rowley, and B. Halliwell. 1983. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts. *FEBS Letters* 158:310-312.

Gehring, C. A., H. R. Irving, A. A. Kabbara, R. W. Parish, N. M. Boukli, and W. J. Broughton. 1997. Rapid, plateau-like increases in intracellular free calcium are associated with Nod-factor-induced-root-hair deformation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10:791-802.

Gnanamanickam, S. S. and D. A. Smith. 1980. Selective toxicity of isoflavonoid phytoalexins to gram-positive bacteria. *Phytopathology* 70:894-896.

Goldmann, A., C. Boivin, V. Fleury, B. Message, L. Lecour, M. Maille, and D. Tepfer. 1991. Betaine use by rhizosphere bacteria: genes essential for trigonelline, stachydrine, and carnitine catabolism in *Rhizobium meliloti* are located on pSym in symbiotic region. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4:571-578.

Graham, J. H., R. T. Leonard, J. A. Menge. 1981. Membrane-mediated decrease in root exudation responsible for phosphorus inhibition of vesicular-arbuscular mycorrhizal formation. *Plant Physiology* 68:548-552.

Griffiths, B. S. 1994. Microbial-feeding nematodes and protozoa in soil: their effects on microbial activity and nitrogen mineralization in decomposition hotspots and the rhizosphere. *Plant and Soil* 164:25-33.

Guerinot, M. L., E. J. Meidl, and O. Plessner. 1990. Citrate as a siderophore in *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of Bacteriology* 172:3298-3303.

Hahlbrock, K. 1981. Flavonoids. In *The Biochemistry of Plants*, vol. 7. Academic Press, Inc. pp 425-455.

Hahlbrock, K. and D. Scheel, D. 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40:347-369.

- Hale, M. G., and L. D. Moore. 1979. Factors affecting root exudation II: 1970-1978. *Advances in Agronomy*. Academic Press, Inc. 31:93-124.
- Hartwig, U. A., and D. A. Phillips. 1991. Release and modification of *nod*-gene-inducing flavonoids from alfalfa seeds. *Plant Physiology* 95:804-807.
- Hoagland, R. E., and R. D. Williams. 1985. The influence of secondary plant compounds on the associations of soil microorganisms and plant roots. In Thompson, A. C. (ed.). *The Chemistry of Allelopathy. Biochemical Interactions among Plants*. American Scientific Society, pp 301-325.
- Holley, J. D., and R. L. Peterson. (1979) Development of a vesicular-arbuscular mycorrhiza in bean roots. *Canadian Journal of Botany* 57:1960-1978.
- Hungria, M., C. M. Joseph, and D. A. Phillips. 1991. Anthocyanidins and flavonoids, major *nod* gene inducers from seeds of a black-seeded common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiology* 97:751-758.
- Hungria, M., C. M. Joseph, and D. A. Phillips. 1991a. *Rhizobium nod* -gene inducers exuded naturally from roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiology* 97:759-764.
- Hutchinson, C. R. 1994. Drug synthesis by genetically engineered microorganisms. *Bio/technology* 12:375-380.
- Hynes M. F., and M. P. O'Connell. 1990. Host plant effect on competition among strains of *Rhizobium leguminosarum*. *Canadian Journal of Microbiology* 36:864-869.
- De Jong, A. J., R. Heidstra, H. P. Spaink, M. V. Hartog, E. A. Meijer, T. Hendriks, F. Lo Schiavo, M. Terzi, T. Bisseling, A. Van Kammen, and S. C. de Vries. 1993. *Rhizobium* lipooligosaccharides rescue a carrot somatic embryo mutant. *The Plant Cell* 5:615-620.
- Jurkevitch E., Y. Hadar, and Y. Chen. 1992. Differential siderophore utilization and iron uptake by soil and rhizosphere bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 58:119-124.

- Kajak, A. 1995. The role of soil predators in decomposition processes. *European Journal of Entomology* 92:573-580.
- Kapulnik, Y., M. Feldman, Y. Okon, and Y. Henis. 1985. Contribution of nitrogen fixed by *Azospirillum* to the N nutrition of spring wheat in Israel. *Soil Biological Biochemistry* 17:509-515.
- Kapulnik, Y., C. M. Joseph, and D. A. Phillips. 1987. Flavone limitations to root nodulation and symbiotic nitrogen fixation in alfalfa. *Plant Physiology* 84:1193-1196.
- Koes, R. E., F. Quattrocchio, and J. N. M. Mol. 1993. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. *Bioessays* 16:123-132.
- Kurkdjian, A. C. 1995. Role of the differentiation of root epidermal cells in Nod factor (from *Rhizobium meliloti*)- induced root-hair depolarization of *Medicago sativa*. *Plant Physiology* 107:783-790.
- Laeremans, T., I. Caluwaerts, C. Verreth, M. A. Rogel, J. Vanderleyden, and E. Martínez Romero. 1996. Isolation and characterization of the *Rhizobium tropici* nod factor sulfation genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9:492-500.
- Lerouge, P., P. Roche, C. Faucher, F. Maillet, G. Truchet, J. C. Promé, and J. Dénarié. 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 344:781-784.
- Lesueur, D., H. G. Diem, and J. M. Meyer. 1993. Iron requirement and siderophore production in *Bradyrhizobium* strains isolated from *Acacia mangium*. *Journal of Applied Microbiology* 74:675-682.
- Long, S. R. 1989. *Rhizobium*-legume nodulation: life together in the underground. *Cell* 56, 203-214.

- Loper, J. E., and J. S. Buyer. 1991. Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4:5-13.
- Lynch, J. M., and J. M. Whipps. 1990. Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil* 129:1-10.
- Maier, R. J., and E. W. Triplett. 1996. Toward more productive, efficient, and competitive nitrogen-fixing symbiotic bacteria. *Critical Reviews in Plant Sciences* 15:191-234.
- Mascarúa-Esparza, M. A., R. Villa-González, and J. Caballero-Mellado. 1988. Acetylene reduction and indoleacetic acid production by *Azospirillum* isolates from Cactaceous plants. *Plant and Soil* 106:91-95.
- Maxwell, C. A., and D. A. Phillips. 1990. Concurrent synthesis and release of *nod*-gene-inducing flavonoids from alfalfa seeds. *Plant Physiology* 93:1552-1558.
- Mazzola, M., R. J. Cook, L. S. Thomashow, D. M. Weller, and L. S. Pierson III. 1992. Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats. *Applied and Environmental Microbiology* 58:2116-2624.
- Michiels, K., J. Vanderleyden, and A. van Gool. 1989. *Azospirillum*-plant root associations: A review. *Soils* 8:356-368.
- Murphy, P.J., N. Heycke, Z. Banfalvi, M. E. Tate, F. J. de Bruijn, A. Kondorosi, J. Tempe, and J. Schell. 1987. Genes for the catabolism and synthesis of an opine-like compound in *Rhizobium meliloti* are closely linked and on the Sym plasmid. *Proceedures of the National Academy of Sciences U.S.A.* 84:493-497.
- Murphy, P. J., N. Heycke, S. P. Trenz, P. Ratet, F. J. de Bruijn, and J. Schell. 1988. Synthesis of an opine-like compound, a rhizopine, in alfalfa nodules is symbiotically regulated. *Proceedures of the National Academy of Sciences U.S.A.* 85:9133-9137.

- Murphy, P. J., W. Wexler, W. Grzemeski, J. P. Rao, and D. Gordon. 1995. Rhizopines - their role in symbiosis and competition. *Soil Biology and Biochemistry* 27:525-529.
- Neilands, J. B. 1981. Microbial iron compounds. *Annual Reviews of Biochemistry* 50:715-731.
- Niemira, B., A., G. R. Safir, and M. C. Hawes. 1996. Arbuscular mycorrhizal colonization and border cell production: a possible correlation. *Phytopathology* 86:563-565.
- O'Connell, K. P., R. M. Goodman, and J. Handelsman, J. 1996. Engineering the rhizosphere: expressing a bias. *Tibtechnology* 14:83-88.
- Okon, Y., and C. A. Labandera-González. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry* 12:1591-1601.
- Pankhurst, C. E. and D. R. Biggs. 1980. Sensitivity of *Rhizobium* to selected isoflavonoids. *Canadian Journal of Microbiology* 26:542-545.
- Parniske, M., B. Ahlborn, and D. Werner. 1991. Isoflavonoid-inducible resistance to the phytoalexin glyceollin in soybean rhizobia. *Journal of Bacteriology* 173:3432-3439.
- Peipp, H., W. Maier, J. Schmidt, V. Wray, and D. Strack. 1997. Arbuscular mycorrhizal fungus-induced changes in the accumulation of secondary compounds in barley roots. *Phytochemistry* 44:581-587.
- Perrino, P., G. Maruca, V. Linsalata, V. V. Bianco, R. N. Lester, and V. Lattanzio. 1989. Flavonoid taxonomic analysis of *Vicia* species of section *Faba*. *Canadian Journal of Botany* 67:3529-3533.
- Peters, N. K., and S. R. Long. 1988. Alfalfa root exudates and compounds which promote or inhibit induction of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Plant Physiology* 88:396-400.

- Phillips, D. A. 1992. Flavonoids: plant signals to soil microbes. *Recent Advances in Phytochemistry* 26:201-231.
- Phillips, D. A., C. M. Joseph, and C. A. Maxwell. 1992. Trigonelline and stachydrine released from alfalfa seeds activate NodD2 protein in *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiology* 99:1526-1531.
- Poupot, R., E. Martínez-Romero, and J. C. Promé. 1993. Nodulation factors from *Rhizobium tropici* are sulfated or nonsulfated chitopentassaccharides containing an *N*-methyl-*N*-acetylglucosaminyl terminus. *Biochemistry* 32:10430-10435.
- Poupot, R., E. Martínez-Romero, N. Gautier and J.-C. Promé. 1995. Wild type *Rhizobium etli*, a bean symbiont, produces acetyl-fucosylated, *N*-methylated, and carbamoylated nodulation factors. *The Journal of Biological Chemistry* 270:6050-6055.
- Price, N. P. J., B. Relic, F. Talmont, A. Lewin, D. Promé, S. G. Pueppke, F. Maillet, J. Dénarié, J.-C. Promé, and W. J. Broughton. 1992. Broad-host-range *Rhizobium* species strain NGR234 secretes a family of carbamoylated, and fucosylated, nodulation signals that are *O*-acetylated or sulphated. *Molecular Microbiology* 6:3575-3584.
- Pueppke, S. G. 1996. The genetic and biochemical basis for nodulation of legumes by rhizobia. *Critical Reviews in Biotechnology* 16:1-51.
- Rao, J. R. and J. E. Cooper. 1994. Rhizobia catabolize *nod* gene-inducing flavonoids via C-ring fission mechanisms. *Journal of Bacteriology* 176:5409-5413.
- Redmond, J. W., M. Batley, 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.
- Relic, B., X. Perret, M. T. Estrada-García, J. Kopcinska, W. Golinowski, H. B. Krishnan, S. G. Pueppke, and W. J. Broughton. 1994. Nod factors of *Rhizobium* are a key to the legume door. *Molecular Microbiology* 13:171-178.

- Reyrat, J.- M., M. David, C. Blonski, P. Boistard, and J. Batut. 1993. Oxygen-regulated in vitro transcription of *Rhizobium meliloti nifA* and *nifK* genes. *Journal of Bacteriology* 175:6867-6872.
- Richards, B. N. 1987. The microbiology of the rhizosphere. In *The Microbiology of Terrestrial Ecosystems*. Longman Scientific and Technical (Essex). Capítulo 6, pp. 222-254.
- Rodríguez-Zaragoza, S. 1994. Ecology of free-living amoebae. *Critical Reviews in Microbiology* 20:225-241.
- Röhrig, H., J. Schmidt, R., Walden, I. Czaja, E. Miklasevics, U. Wieneke, J. Schell, and M. John. 1995. Growth of tobacco protoplasts stimulated by synthetic lipo-chitooligosaccharides. *Science* 269:841-843.
- Rolfe, B. G. 1988. Flavones and isoflavones as inducing substances of legume nodulation. *Biofactors* 1:3-10.
- Rostas, K., E., B. Kondorosi, A. Horvath, Simoncsits, and A. Kondorosi. 1986. Conservation of extended promoter regions of nodulation genes in *Rhizobium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 83:1757-1761.
- Rovira, A. D. 1969. Plant root exudates. *Botanic Reviews* 35, 35-57.
- Schlaman, H. R. M., H. P. Spaink, R. J. H. Okker, and J. J. Ben Lugtenberg. 1989. Subcellular localization of the *nodD* gene product in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of Bacteriology* 171:4686-4693.
- Schultze, M., B. Quiclet-Sire, E. Kondorosi, H. Virelizier, J. N. Glushka, G. Endre, S.D. Géro, and A. Kondorosi. 1992. *Rhizobium meliloti* produces a family of sulfated lipooligosaccharides exhibiting different degrees of plant host specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 89:192-196.

Semino, C. E., and P. W. Robbins. 1995. Synthesis of "Nod"-like chitin oligosaccharides by the *Xenopus* developmental protein DG42. 1995. *Proceedures of the National Academy of Sciences U.S.A.* 92:3498-3501.

Serino, L., C. Reimmann, P. Visca, M. Beyeler, V. della Chiesa, and D. Haas. 1997. Biosynthesis of pyochelin and dihydroaeruginic acid requires the iron-regulated *pchDCBA* operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 179:248-257.

Smith, S. E., and V. Gianinazzi-Pearson. 1988. Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39:221-244.

Smucker, A. J. M. and G. R. Safir. 1986. Root and soil microbial interactions which influence the availability of photoassimilate carbon to the rhizosphere. In Mitchell, M. J., and J. P. Nakas (eds.) *Microbial and Faunal Interactions in Natural and Agroecosystems. Developments in Biogeochemistry.* Martinus Nijhoff /Dr. Junk Publ. Podrecht. pp. 203-244.

Soedarjo, M., T. K. Hemscheidt, and D. Borthakur. 1994. Mimosine, a toxin present in leguminous trees (*Leucaena* spp.), induces a mimosine-degrading enzyme activity in some *Rhizobium* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 60:4268-4272.

Soedarjo, M., and D. Borthakur. 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 and Soil*, 186:87-92.

Spaink, H. P., C. A. Wijffelman, E. Pees, R. J. H. Okker, and B. J. J. Lugtenberg. 1987. *Rhizobium* nodulation gene *nodD* as a determinant of host specificity. *Nature* 328: 337-340.

Spaink, H. P., C. A. Wijffelman, R. J. H. Okker, and B. E. J. Lugtenberg, . 1989. Localization of functional regions of the *Rhizobium nodD* product using hybrid *nod* genes. *Plant Molecular Biology* 12:59-73.

Stacey, G., J. Cohn, B. Day, J. Loh, M. Garcia, J. Paik, and J. Yuen. 1997. The complex interaction between *Bradyrhizobium japonicum* and its symbiotic host plants. In Legocki, A., H. Bothe and A. Pülher (eds.) Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg, Alemania pp: 29-36.

Stokkermans, T. J. W., R. Orlando, V. S. Kumar Kolli, R. W. Carlson, and N. K. Peters. 1996. Biological activities and structures of *Bradyrhizobium elkanii* low abundance lipo chitin-oligosaccharides. Molecular Plant-Microbe Interactions 9:298-304.

Streit, W. R., C. M. Joseph, and D. A. Phillips. 1996. Biotin and other water-soluble vitamins are key growth factors for alfalfa root colonization by *Rhizobium meliloti* 1021. Molecular Plant-Microbe Interactions 9:330-338.

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

Tramontano, W. A., P. A. McGinley, E. F. Ciancaglini, and L. S. Evans. 1986. A survey of trigonelline concentrations in dry seeds of the Dicotyledoneae. Environmental and Experimental Botany 26:197-205.

Truchet, G., P. Roche, P. Lerouge, J. Vasse, S. Camut, F. de Billy, J.-C. Promé, and J. Dénarié. 1991. Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. Nature 351:670-673.

Tsai, S. M., D. A. Phillips. 1991. Flavonoids released naturally from alfalfa promote development of symbiotic *Glomus* spores *in vitro*. Applied and Environmental Microbiology 57:1485-1488.

Tschailachjan, M. Ch., and A. A. Megrabjan. 1958. Einfluss der Wurzelausscheidungen von Leguminosen auf das Wachstum der Knöllchenbakterien. Nach. Akad. Wiss. ArmenSSR. Biol. Landwirtschaft. Wiss. 11:3-11.

Vande Broek, A. and J. Vanderleyden. 1995. The role of bacterial motility, chemotaxis, and attachment in bacteria-plant interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 6:800-810.

Van Rhijn, P., Y. Fang, S. Galili, O. Shaul, N. Atzmon, S. Winer, Y. Eshed, M. Lum, Y. Li, V. To., N. Fujishige, Y. Kapulnik, and A. M. Hirsch. 1997. Expression of early nodulin genes in alfalfa mycorrhizae indicates that signal transduction pathways used in forming arbuscular mycorrhizae and *Rhizobium*-induced nodules may be conserved. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 94:5467-5472.

Visca, P., A. Ciervo, V. Sanfilippo, and N. Orsi. 1993. Iron-regulated salicylate synthesis by *Pseudomonas* spp. *Journal of General Microbiology* 139:1995-2001.

Whipps, J. M., and J. M. Lynch. 1985. Energy losses by the plant in rhizodeposition. *Annual Proceedings of the Phytochemistry Society, Europe* 26:59-71.

Figura 1. Diagrama de la raíz mostrando la naturaleza y el origen de algunos materiales orgánicos de la rizósfera.

Figura 2. A) Estructura básica de los flavonoides. Está basada en un esqueleto de 15 carbonos con tres anillos. En algunos casos el anillo C puede presentar una forma isomérica abierta o es reemplazado por un anillo de 5 miembros (Hahlbrock 1981). B) Estructura de la trigonelina. Todas las betaínas tienen una amina cuaternaria N⁺.

Figura 3. Pasos en la biosíntesis de flavonoides. El esqueleto de Carbono de todos los flavonoides se deriva de acetato y fenilalanina. El anillo A se forma de tres unidades de acetato (malonato) y la fenilalanina forma el anillo B, y los C-2, C-3 y C-4 del anillo heterocíclico C. Un intermediario central en la formación de los flavonoides es la chalcona o flavona isomérica (Hahlbrock 1981).

Figura 4. En *R. tropici* se ha identificado la información genética (genes *teuA*, *teuB*, *teuC1*, *teuC2* y tal vez *xyIB2*) para el transporte de un compuesto producido por el frijol. La ubicación y función hipotética del producto de estos genes se dedujo por la similitud en la secuencia a otros transportadores de azúcares y por el perfil de hidrofobicidad.

TeuB: Proteína de unión al compuesto específico localizado en el periplasma.

TeuC1 y TeuC2: Proteínas Transmembranales que interactúan con TeuA, dirigiendo el transporte hacia dentro de la célula.

TeuA: Proteína con dos dominios de unión a ATP, que hidroliza el ATP para utilizar la energía en el transporte del compuesto.

Figura 5. Ejemplos de los seis subgrupos mayores de flavonoides. Para la clasificación se considera el estado de oxidación del anillo heterocíclico C y la posición del anillo B. También hay cientos de flavonoides que se presentan en forma de glucósidos con diferentes combinaciones de azúcares unidos a los grupos hidroxilo. (Hahlbrock 1981).

Fig. 6. Una de las formas de sobrevivir en la rizósfera, es poseer mecanismos de resistencia a los compuestos tóxicos (fitoalexinas) que producen las

plantas en respuesta a patógenos. En la bacteria *Rhizobium etli* (muy amplificada en el diagrama) descubrimos una bomba de extrusión que postulamos saca al exterior estos compuestos. Las mutantes incapaces de realizar este proceso tienen una capacidad de nodulación disminuída.

Fig. 7. Distintas plantas producen diferentes compuestos flavonoides (m, o, *). Las bacterias de *Rhizobium* capaces de nodular a cada planta, tienen proteínas específicas (m, o, *) para el reconocimiento de esos flavonoides. El modelo actual supone que NodD, al pegar al flavonoide se despegga de la membrana y es capaz de unirse entonces al ADN.

Fig. 8. La proteína NodD, una vez unido al ADN, promueve la expresión de los genes *nod*, los cuales producen las enzimas que sintetizan los factores Nod que desencadenan la formación de nódulos en las raíces de las leguminosas. En los nódulos se albergan las bacterias.

Fig. 9. Nódulos en las raíces del frijol. Cada nódulo mide unos milímetros. Debido a la leghemoglobina son de color rosado o rojo y esto es indicativo de que el nódulo es activo en fijación de nitrógeno.

Fig. 10. El factor de nodulación de *Sinorhizobium meliloti*, que establece simbiosis con alfalfa, fue el primero en ser descrito. Las variantes de una estructura general están relacionadas con la capacidad de nodular diferentes plantas.

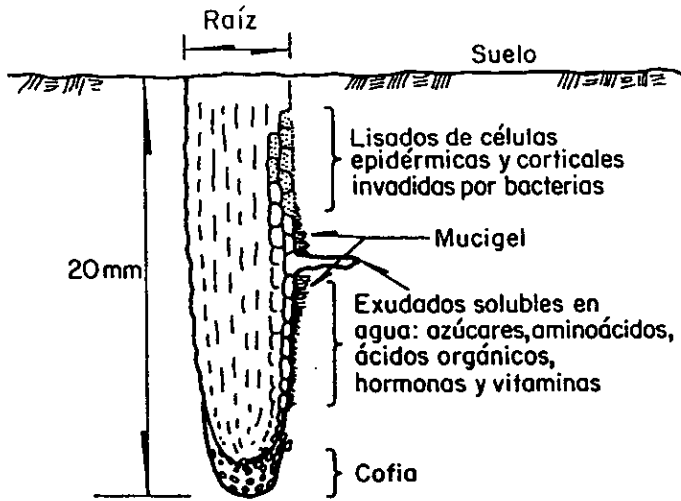


Fig. 1

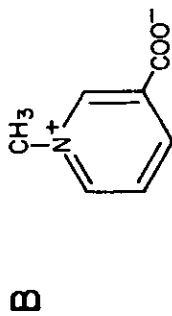
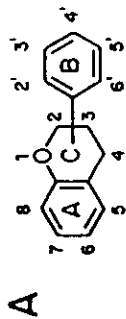
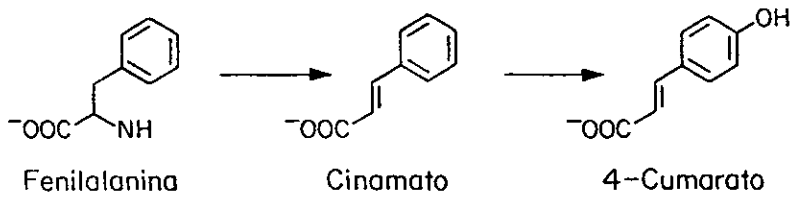
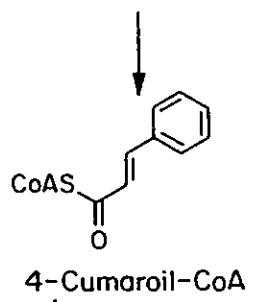


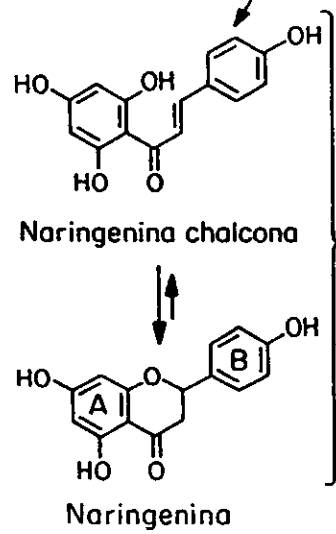
Fig. 2



**Metabolismo general
fenil propanoide**



**Vía
flavonoide**



- Flavonas
- Flavonoles
- Antocianinas
- Isoflavonoides, etc.

Fig. 3

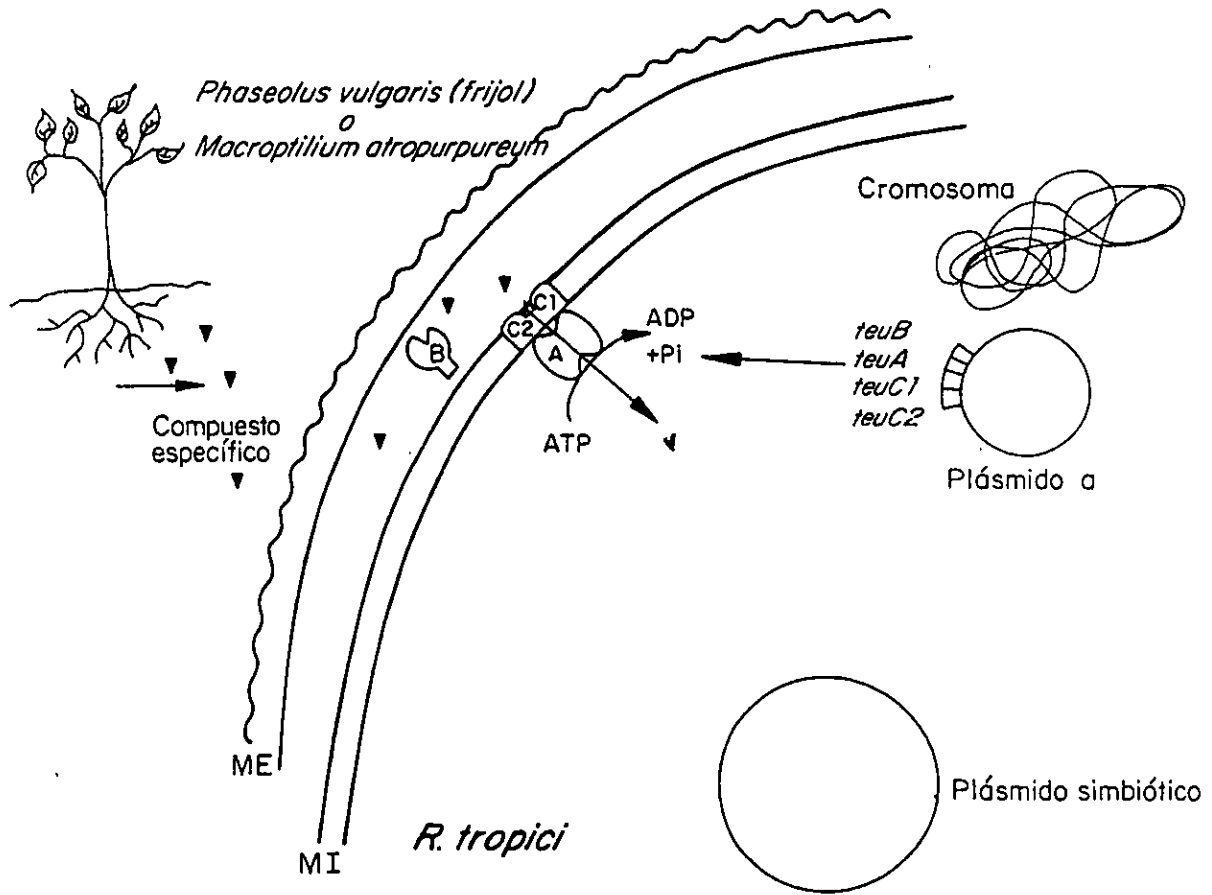
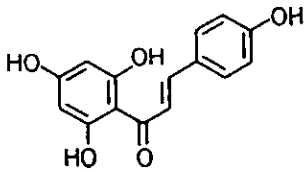
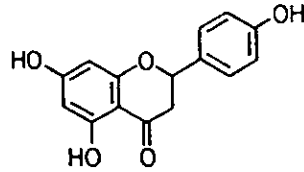


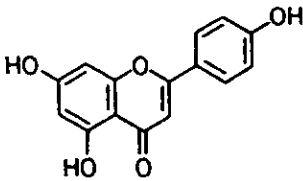
Fig. 4



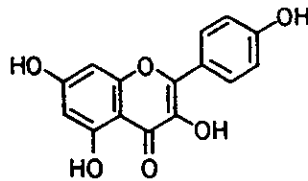
I Chalconas
Naringenina chalcona



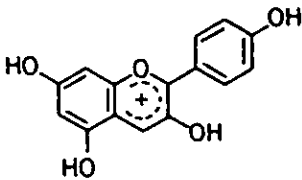
II Flavononas
Naringenina



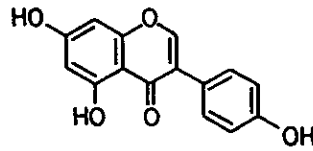
III Flavonas
Apigenina



IV Flavonoles
Caempferol



V Antocianidinas
Pelargonidina



VI Isoflavonas
Genisteina

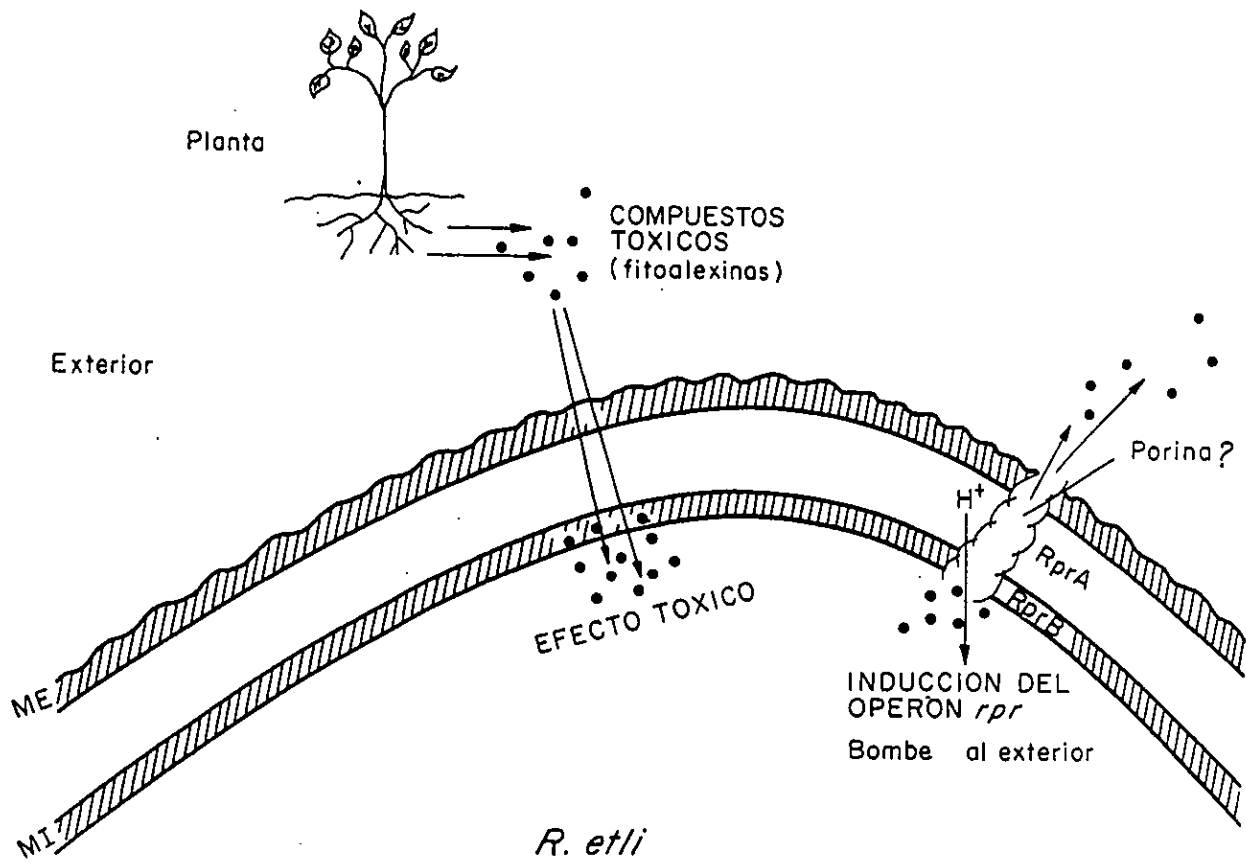


Fig. 6

Plantas

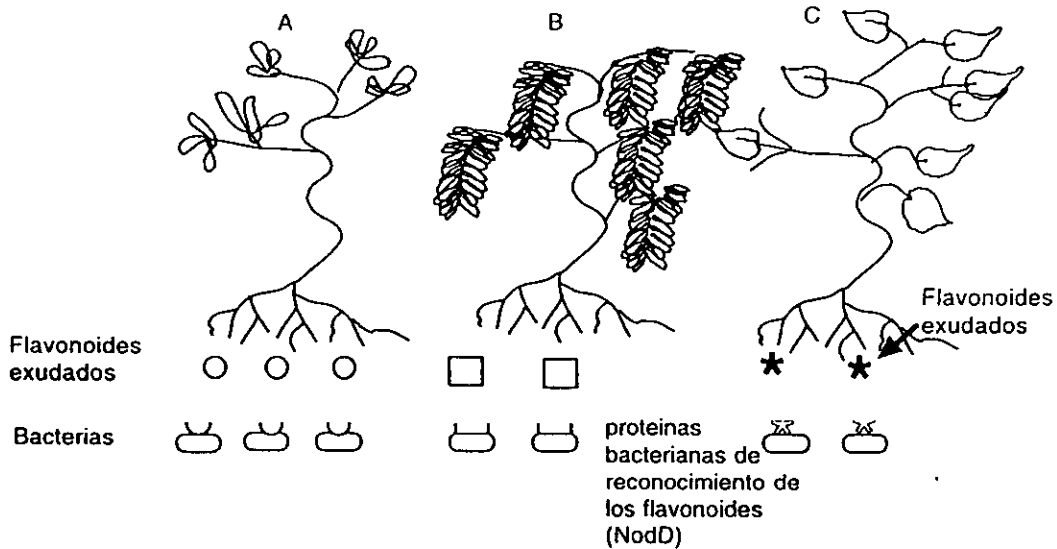


Fig. 7

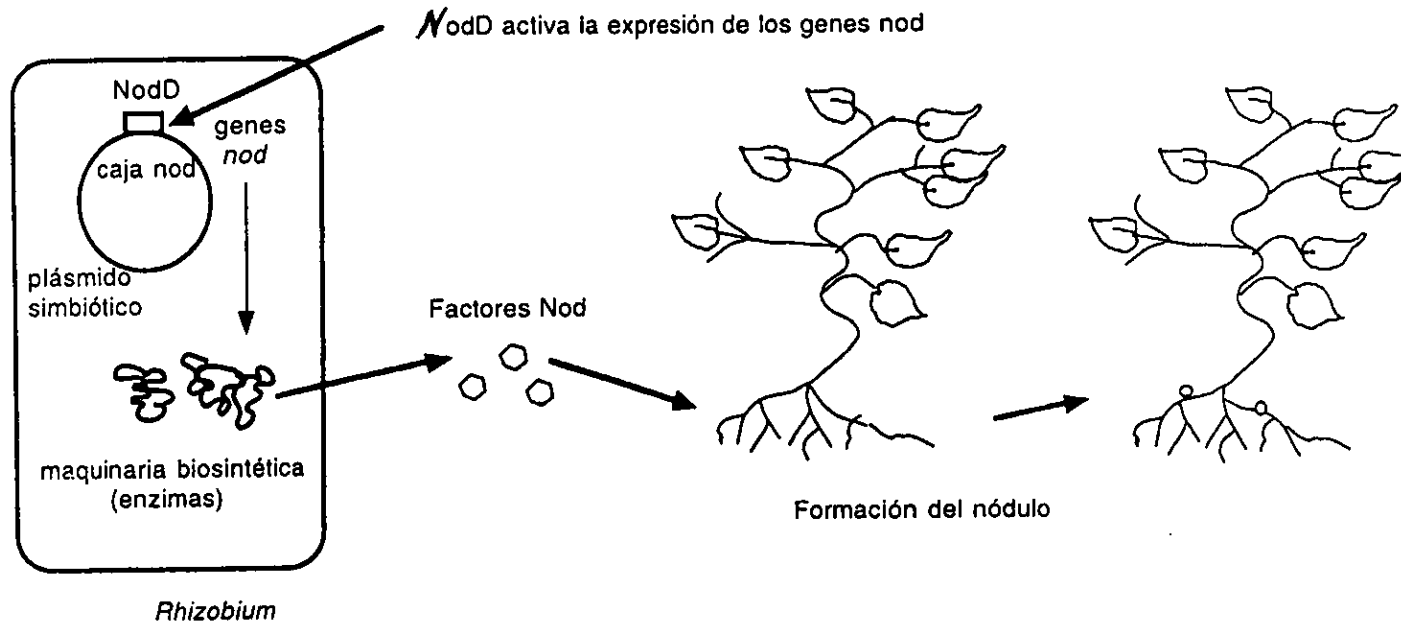


Fig. 8



Fig. 9

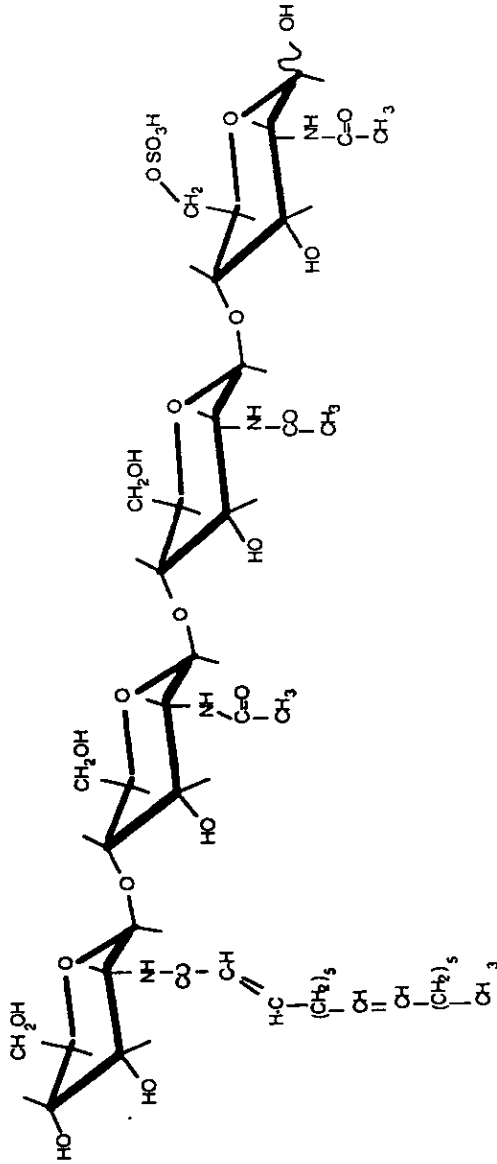


Fig 10

ANTECEDENTES

Phaseolus vulgaris es la leguminosa que más se consume en México, sus sitios de diversificación se identifican en este país y en la región Andina (Koeinig y Gepts, 1989). Se han aislado una gran diversidad de cepas de *Rhizobium* capaces de nodular frijol (Martínez et al., 1988; Martínez-Romero y Caballero-Mellado, 1996). Entre ellas están *R. etli* (Segovia et al., 1993), *R. tropici* (Martínez-Romero et al., 1991), *R. leguminosarum* bv phaseoli (Jordan, 1984), *R. gallicum* (bv phaseoli y bv gallicum) y *R. giardini* (bv phaseoli y bv giardinii) (Amarger et al., 1997). También hay otras cepas de *Rhizobium* que nodulan y fijan nitrógeno en frijol pero que aun no han sido clasificadas, entre éstas está la NGR234 (van Rhijn et al., 1994). La especie que con mas frecuencia se ha aislado de nódulos de frijol en México es *R. etli*, y en Sudamérica es *R. tropici*, utilizándose esta última incluso como inoculante en estas regiones (Martínez-Romero et al., 1991).

R. tropici es una bacteria aeróbica, gram negativa, que no forma esporas, flagelada, de 0.5-0.7 por 1.5-2.0 μm y crece en medio PY (ver p. 6 del artículo) y YM (Vincent, 1970). El pH óptimo para su crecimiento es de 5 a 7. Son resistentes a ácido nalidíxico. Estas cepas se han aislado de zonas tropicales (Martínez-Romero et al., 1991). Nodulan y fijan nitrógeno en una serie de leguminosas además del frijol: *Leucaena esculenta*, *Leucaena leucocephala*, *Lotus corniculatus*, *Sesbania exaltata*, *Gliricidia maculata*, *Desmodium canadense*, *Desmanthus illinoensis* y *Cliathus formosus* (Hernández-Lucas, et al., 1995).

Se han identificado dos tipos de *R. tropici*: A y B. Las cepas tipo A, requieren calcio para crecer en PY, y no crecen en LB. Forman colonias blancas opacas en medio YM y no son mótils en agar al 0.3%. Su máxima temperatura de crecimiento es de 35 a 37°C. En cambio las cepas tipo B no requieren calcio en

PY, sí crecen en LB, forman colonias translúcidas en YM, son mótils en agar al 0.3%, y su temperatura máxima de crecimiento es de 40°C. Las cepas tipo B a diferencia de las tipo A crecen en arginina, hipoxantina y sorbitol como fuentes de carbono; son resistentes a cloramfenicol, carbenicilina, spectinomocina, rifampicina y a los metales Ni, Pb, Co, Cu, Ag y Cr. Las tipo A son susceptibles tanto a los antibióticos como a los metales (Martínez-Romero et al., 1991).

La cepa tipo del grupo A es la CFN299 y de la B es la CIAT899. Estas dos se utilizaron en este trabajo. Los dos tipos (A y B) comparten un plásmido simbiótico (pSim) muy similar (Martínez-Romero, 1996), pero tienen diferentes megaplásmidos (Geniaux et al., 1995). La cepa CFN299 tiene 4 plásmidos (Fig. 2 del artículo). El plásmido a (pa) de alrededor de 185 kb también está conservado en los dos tipos de *R. tropici*.

Se encontró que *R. tropici* era más estable genéticamente y más resistente a condiciones del estrés que *R. etli* (Martínez-Romero et al., 1991) por lo que se consideró que era un modelo interesante para analizar sus mecanismos de interacción con frijol y compararlos con las funciones en *R. etli*. Sin embargo encontramos que *R. etli* tiene mayor capacidad competitiva para nodular frijol que *R. tropici*, formando el 90% de los nódulos cuando se inocula en una proporción de 1:1. No obstante, al transferir el pRtrCFN299b de *R. tropici* a *R. etli*, ésta aumenta su competitividad para la nodulación de frijol en un 40% (Martínez-Romero y Rosenblueth, 1990, ver apéndice V). *R. etli* y *R. tropici* difieren mucho genéticamente tanto a nivel de cromosoma como de plásmidos, y deben tener diferentes estrategias para interactuar con la planta, y esto se refleja en los diferentes tipos de factores de nodulación que producen. *R. tropici* produce una mezcla de factores de nodulación quitopentaméricos sulfatados y no sulfatados

(Poupot, et al. 1993). La sulfatación del factor es similar a la de *R. meliloti*, en cuyo caso se requiere para la nodulación de alfalfa (Roche et al., 1991). En el caso de *R. tropici* la sulfatación mejora la nodulación en frijol en algunos cultivares pero no en otros (Laeremans et al., 1996). El factor de nodulación de *R. etli* es diferente, es un compuesto quitopentamérico *N*-metil-*N*-vaccenoilado en el extremo no reductor y en la posición 6 de la *N*-acetil-D-glucosamina reducida está 4-*O*-acetil-L-fucosilado. Sin embargo, los dos factores de nodulación purificados son capaces de producir la formación de nódulos (Poupot et al., 1995).

Existe aún desconocimiento de los mecanismos moleculares que determinan el inicio de la relación entre las plantas y las poblaciones bacterianas asociadas a la rizósfera. El proyecto de buscar genes de *Rhizobium* cuya transcripción se induzca por exudados de frijol, está encaminado a resolver estos aspectos.

Se han descrito varios efectos causados por los exudados de plantas sobre las bacterias que interactúan con ellas. A continuación se mencionan algunas funciones bacterianas que se expresan en presencia de exudados de plantas:

A) Para sensar la presencia de la planta y acercarse a ella:

Quimiotaxis hacia varias sustancias (van Bastelaere, 1996).

B) En la rizósfera para sobrevivir y competir con otros microorganismos:

Transporte de fuentes de carbono y nitrógeno (Armitage et al., 1988; van Basteleare et al., 1996; Borthakur y Soedarjo, 1998). Catabolismo de fuentes de carbono y nitrógeno (van Egeraat, 1975; Murphy et al., 1995; Soedarjo y Borthakur, 1996). Crecimiento (Hartwig et al., 1991). Transferencia de plásmidos (Martínez-Romero, datos no publicados).

C) Para contrarrestar o suprimir mecanismos de defensa:

Secresión de exopolisacáridos y producción de lipopolisacáridos en la

membrana externa, actuando como un factor de protección de la bacteria evitando la entrada de compuestos tóxicos (Djordjevic et al., 1987). Transporte al exterior de fitoalexinas de la planta que entraron a la bacteria (Hubac et al., 1994).

D) Para facilitar la entrada a la planta:

Modificación de la superficie de las células de la planta (Djordjevic et al., 1987).

E) Para iniciar el proceso de entrada a la planta:

Producción de ácido indolacético (Prinsen et al., 1991). Producción del factor de nodulación e inducción de otros genes también relacionados con el inicio de la nodulación (Schultze y Kondorosi, 1996; Phillips et al., 1992). Inducción de genes relacionados con el inicio de la virulencia (Dessaux et al., 1992).

También se han encontrado genes inducidos por exudados de plantas cuya función biológica es desconocida ya que no presentan homología con genes conocidos, y en algunos de estos casos se ha encontrado que provocan un aumento en la capacidad competitiva para formar nódulos (Sadowsky et al., 1988; Bhagwat y Keister, 1992).

En fechas recientes se han desarrollado varias técnicas para identificar y estudiar genes de microorganismos que se expresan en forma diferente en presencia de la planta hospedera. Estas pueden ser de tres tipos:

1) Construcción de fusiones con genes reporteros para analizar la expresión de genes.

En las fusiones, la secuencia de interés antecede a la secuencia codificada por el gen reportero, el cual no tiene promotor. La expresión del gen puede ser monitoreada al medir la actividad del producto del gen reportero. Las fusiones pueden hacerse con transposones que se integran al azar o con vectores. Los genes reporteros más usados son:

- *lacZ*. Proviene de *E. coli* y codifica para β -galactosidasa. Se han usado derivados de Mu con *lacZ* en *R. fredii* para encontrar genes inducidos en presencia de extractos de nódulo (Sadowsky et al., 1988) e inducidos por ciertos polisacáridos encontrados en exudados de raíz de zanahoria en *A. tumefaciens* (Rong et al., 1991).
- *gusA*. Aislado de *E. coli* y codifica para β -glucuronidasa (GUS). Una ventaja de usar este gen reportero es que no se ha encontrado actividad GUS en muchas bacterias de importancia agronómica, incluyendo *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Azospirillum* y *Pseudomonas* y en plantas (Wilson et al., 1995), por lo que es útil para estudiar la expresión de genes de bacterias dentro de la planta. Sharma y Signer (1990) usaron Tn5-*gusA1* en genes *nod* y *fix* de *R. meliloti* para estudiar su expresión durante el desarrollo de la nodulación. Wilson et al. (1995) ha construido otros transposones *gusA*.
- Marcadores de resistencia a antibióticos. Entre éstos está el Tn5-B30 un derivado del Tn5 que posee el gen *npt* (neomicina fosfotransferasa) como gen reportero. En *R. meliloti* se ha usado para encontrar mutantes inducidas por biotina (Streit y Phillips, 1997) y en *R. etli* para encontrar genes inducidos por exudados de raíz de frijol (González-Pasayo et al., datos no publicados).
- *lux*. Los genes de la luciferasa se han aislado de diferentes organismos, entre otros de *Vibrio fischeri*. Una ventaja de este gen reportero es que se puede medir directamente en células vivas, pudiéndose observar la expresión de los genes en el tiempo real. Sin embargo su actividad depende de la presencia de oxígeno y de la disponibilidad de ATP. Se ha usado el Tn5-*lux* en *R. meliloti* para encontrar mutantes inducidas por staquidrina (Phillips et al., 1996), y por limitaciones de

nitrógeno, carbono y oxígeno (Milcamps et al., 1998).

2) Identificación de cambios en el contenido del RNA mensajero (RNAm) bajo diferentes condiciones y caracterización subsecuente de los mensajeros inducidos.

Se clonaron 310 kb del pSim de *R. meliloti*, para aislar DNA e hibridizar con RNA de la bacteria crecida en vida libre y en simbiosis y de una mutante *nifA* en simbiosis; la comparación de los patrones de hibridización permitió identificar nuevas secuencias que se expresan en los nódulos y que no son dependientes de NifA, el regulador transcripcional de los genes de la nitrogenasa (David et al., 1987). Después Scott-Craig et al. (1991), sintetizando cDNA de RNA total aislado de bacteroides purificados o de células en vida libre, encontraron secuencias de DNA que son transcritas a altos niveles en bacteroides.

Chuang et al. (1993), describió la detección de la actividad transcripcional en regiones genómicas específicas basado en el mapa físico del DNA. Para esto se utilizó el pSim de *Rhizobium* sp. NGR234, preparando sondas de RNA de cultivos de la NGR234 crecidos en presencia de daidzeína con la silvestre y con una mutante en *nodD1* a diferentes tiempos desde 10 min. hasta 24 horas (Fellay et al., 1995). También Girard et al. (1996) usando esta técnica en el pSim de *R. etli* CFN42, encontró regiones cuya expresión depende de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, de genisteína y en condiciones de microaerobiosis y aerobiosis. Actualmente se está realizando el mapa de expresión del pSim de NGR234 basado en la secuencia nucleotídica del plásmido completo (Xavier Perret, comunicación personal).

3) Caracterización de proteínas inducidas o reprimidas bajo condiciones específicas (análisis del proteoma).

Con esta técnica, las proteínas de cultivos inducidos y no inducidos se extraen y son usadas en geles de electroforesis de SDS-poliacrilamida. Las proteínas se pueden separar en geles de una dimensión de acuerdo a su peso molecular, o de dos dimensiones, de acuerdo al peso molecular y su punto isoeléctrico. Las proteínas se pueden marcar con metionina-³⁵S. Después de la electroforesis, los geles se autoradiografían y se comparan los patrones de proteínas de bacterias u otros organismos crecidos en diferentes condiciones. Las proteínas de interés pueden ser purificadas para que se determine la secuencia de aminoácidos N-terminal y una vez sintetizados los oligonucleótidos correspondientes, éstos se usan para hibridizar en Southern el DNA del organismo, permitiendo el aislamiento de los genes correspondientes (James, 1997). Esta técnica se usó en *A. tumefaciens* para encontrar proteínas producidas en presencia de acetosiringona (Stachel y Nester, 1986) y en presencia de extractos de zanahoria (Rong et al., 1990). En *R. leguminosarum* bv. *viciae* se estudiaron proteínas inducidas en presencia de inductores de los genes *nod* (de Maagd et al., 1988). Krishnan y Pueppke (1993) encontraron que *R. fredii* en presencia de genisteína exporta al exterior cinco proteínas. En *Azospirillum* también se buscaron proteínas inducidas en presencia de exudados de raíz de varias especies (van Bastelaere et al., 1993). También esta técnica está siendo usada por Guerreiro et al. (1997) para analizar proteínas de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* inducidas en presencia de flavonoides y por Encarnación et al. (1998) para analizar proteínas de *R. etli* (CFN42) bajo metabolismo aeróbico y fermentativo.

Para encontrar genes de *R. tropici* inducidos por exudados de frijol optamos por utilizar la estrategia descrita en primer lugar con el gen reportero de β -glucuronidasa.

OBJETIVOS

En este trabajo se identificaron los genes de *R. tropici* inducidos por exudados de frijol para poder encontrar nuevas funciones involucradas en el inicio de la relación planta-bacteria. Para esto se utilizó la cepa CFN299 generando una serie de mutantes Tn5-*gusA1* en sus plásmidos.

Una vez que por secuencia de DNA se encontró que la mutante elegida para trabajar tenía la inserción Tn5-*gusA1* en los genes que nosotros designamos *teu* (*tropici exudate uptake*), nos planteamos el objetivo de crear otra mutante al inicio del operón en la misma cepa y en otra cepa de *R. tropici*, la CIAT899, para estudiar su fenotipo en simbiosis con frijol y en la capacidad de utilizar el compuesto. Posteriormente quisimos averiguar qué otras bacterias son capaces de utilizarlo y qué especies de plantas lo exudan.

ORIGINAL PAPER

M. Rosenblueth · M. F. Hynes · E. Martínez-Romero

Rhizobium tropici teu genes involved in specific uptake of Phaseolus vulgaris bean-exudate compounds

Received: 21 November 1997 / Accepted: 18 March 1998

Abstract *Rhizobium tropici* nodulates and fixes nitrogen in bean. In the *R. tropici* strain CFN299 we identified and characterized *teu* genes (*tropici* exudate uptake) induced by bean root exudates, localized by insertion of a promoter-less Tn5-gusA1 transposon. *teu* genes are present on a plasmid of around 185 kb that is conserved in all *R. tropici* strains. Proteins encoded by *teu* genes show similarity to ABC transporters, specifically to ribose transport proteins. No induction of the *teu* genes was obtained by treatment with root exudates from any of several other plants tested, with the exception of *Macroptilium utropurpureum*, which is also a host plant for *R. tropici*. It appears that the inducing compound is characteristic of bean and closely related legumes. It is present in root exudates, but not in seeds. This compound is removed, presumably by metabolism, from the exudates by the majority of bean-nodulating rhizobia (such as *R. etli*, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* and *R. giardinii*). The principal inducing compound has not been identified, but some induction was obtained using trigonelline. The CFN299 strain seems to have an additional uptake system, as no phenotype is observed in two different mutants. *R. tropici* strain CIAT899, on the other hand, must have only one uptake system, since a mutant bearing an insertion in the *teu* genes could not remove the compound from the exudates as efficiently as the wild type, and it showed diminished nodulation competitiveness.

Key words Nodulation · Rhizosphere · Root exudates · Trigonelline · ABC transporters

Introduction


The capacity to use a variety of carbon sources seems to be advantageous for soil bacteria. A number of sugars, as well as flavonoids, amino acids and vitamins are exuded into the rhizosphere by plants (Phillips et al. 1990; Rovira 1969). In some cases, the production of a specific carbon source by a plant may favor the growth of a particular bacterial population. For example, homoserine secreted by pea plants is assimilated by the pea symbiont *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Van Egeraat 1975; Johnston et al. 1988; Hynes and O'Connell 1990). Mimosine, found in *Leucaena* plants, is a carbon and nitrogen source for around 40% of bacterial isolates from *Leucaena* (Soedarjo et al. 1994). *Agrobacterium* spp. transform plant cells to make them produce unusual amino acid derivatives, opines, that can be metabolized specifically by strains of *A. tumefaciens* (Scott et al. 1979). Similarly, rhizopines synthesized in nodules are catabolized by other rhizobia in the soil. Rhizopines are usable only by a limited number of *R. meliloti* and *R. leguminosarum* bv. *viciae* strains. It has been suggested that rhizopines could provide a new strategy for increasing the competitiveness and persistence of rhizobia in the soil, if the catabolic genes were transferred to the desired bacteria and the biosynthetic genes to the plant (Rossbach et al. 1995).

In *R. leguminosarum* and *R. etli*, the ability to utilize different carbon sources, such as adonitol, arabinose, catechol, glycerol, inositol, lactose, malate, rhamnose, sorbitol, dulcitol and melibiose, is encoded on different plasmids, and these genes could contribute to the symbiotic and saprophytic competence of rhizobia (Baldani et al. 1992; Brom et al. unpublished; Orenik et al. unpublished). Sugar transporters belonging to the ABC superfamily are encoded on the symbiotic plasmid of NGR234 (Freiberg et al. 1997). Charles and Finan

Communicated by A. Kondorosí

M. Rosenblueth · E. Martínez-Romero (✉)
Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno,
Universidad Nacional Autónoma de México,
Ap. 565-A, Cuernavaca, Av. Universidad 5/N, Col. Chamilpa,
Cuernavaca, Morelos, México.
Fax: + 52-73-175561; e-mail: emartine@ciqn.unam.mx

M. F. Hynes
Department of Biological Sciences, University of Calgary,
2500 University Drive NW, Calgary, AB T2N 1N4, Canada

	4	3	8	1	8	4	7	8	Dispatch: 5.5.1998	Journal: Mol Gen Genet		
	Journal number	Manuscript number							Author Received:	No. of pages: 12		
									Author's disk received <input type="checkbox"/>	Not used <input type="checkbox"/>	Computed <input type="checkbox"/>	Mismatch <input type="checkbox"/>

(1991) have also shown that the *R. meliloti* megaplasmid pRMEU47b carries genes involved in dulcitol, lactose, raffinose, melibiose, quinate and protocatechuate catabolism, so it appears that the presence of a wide variety of plasmid-encoded transport and catabolic genes may be a general feature of the fast-growing rhizobia.

The symbiotic capacity of *Rhizobium* is determined largely by *nod*, *nif* and *fix* genes, which are generally located on plasmids (Kondorosi et al. 1984). The expression of *nod* genes is inducible by plant-exuded flavonoids (reviewed by Phillips et al. 1994) or, in some cases, betaines (Phillips et al. 1992), and this constitutes one of the first steps in plant-*Rhizobium* signal exchange (Long 1989). *Rhizobium nod* genes are involved in the synthesis of Nod factors (lipochitooligosaccharides) that are triggers of the nodulation process (reviewed in Dénarié et al. 1992 and Schulze and Kondorosi 1996).

Other *Rhizobium* loci related to nodulation but not involved in Nod factor production have been described (Phillips et al. 1996; Freiberg et al. 1997) and recently reviewed (Pueppke 1996; Vlassak and Vanderleyden 1997). Some of these may act to ensure the survival of the bacteria in the rhizosphere or in other signaling processes between bacteria and plants that determine the colonization and infection of the root.

We have studied different *Rhizobium* populations that establish symbioses with *Phaseolus vulgaris* bean (Martínez et al. 1985; Martínez-Romero 1994; Piñero et al. 1988). *R. tropici*, one of the bean symbionts (Martínez-Romero et al. 1991), is capable of nodulating and fixing nitrogen in bean and in other legumes such as *Leucaena* and *Macroptilium* (Hernández-Lucas et al. 1995; Mavingui et al. 1997). *R. tropici* was originally isolated from acid tropical soils in South America, where it is successfully used as an inoculant for bean crops. Based on genetic and phenotypic characteristics, two types have been recognized among *R. tropici* strains. Other bean-nodulating species are *R. etli* (Segovia et al. 1993), *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *R. gallicum* and *R. giardinii* (Amarger et al. 1997; Sessitsch et al. 1997).

With the aim of identifying and characterizing new *R. tropici* functions involved in the early interaction with the plant, we searched for genes that are inducible by bean exudates in a library of *R. tropici* CFN299 mutants obtained by the insertion of a promoter-less *Tn5-gusA1* transposon. We analyzed one of these mutants which is affected in the *teu* genes, which appear to be inducible by bean-exudated sugars.

Materials and methods

Bacterial strains, plasmids and media

Bacterial strains and plasmids are listed in Table 1. *Rhizobium* strains were grown in PY medium (per liter: 5 g peptone, 3 g yeast extract, and 1 g CaCl₂ · 2H₂O). *E. coli* and *Agrobacterium* strains were grown in Luria-Bertani (LB) medium (Miller 1972). When required, antibiotics were used at the following concentrations for *Rhizobium tropici* CFN299: kanamycin, 25 mg/l; nalidixic acid,

10 mg/l; for CIAT899: kanamycin, 40 mg/l; nalidixic acid, 20 mg/l; tetracycline, 10 mg/l; for *E. coli*: ampicillin, 100 mg/l; tetracycline, 10 mg/l; gentamicin, 30 mg/l; for *A. tumefaciens*: rifampicin 100 mg/l.

Nodulation assays

Nodulation assays in *P. vulgaris* plants were performed as described (Martínez-Romero and Rosenblueth 1990) and followed up to 15 or 25 days after inoculation. Thin slices of nodules were stained and observed in the microscope as described (Martínez et al. 1987).

Genetic manipulations and hybridization

CFN299 derivatives carrying *Tn5-gusA1* were obtained from matings between strains pSB387 and CFN299. The transconjugants were selected for nalidixic acid and kanamycin resistance. Transfer frequencies were estimated with reference to the recipient cell number. Genomic DNA was isolated, digested with various restriction enzymes, electrophoresed in 1% agarose gels, blotted onto nylon membranes and hybridized with a random-primer labelled probe (Rediprime and Rapid-hyb buffer from Amersham Life Science, Little Chalfont, Bucks, England) under conditions of moderately high stringency (hybridization at 65°C, and washing at 55°C). Plasmid patterns were visualized by the Eckhardt (1978) technique, as modified by Hynes and McGregor (1990), blotted into nylon membranes and hybridized. To obtain the mutants carrying a *lacZ* cassette inserted in *teu* genes, pMR16-3 (an *XbaI-XhoI* subclone from pMR16) was inserted in the suicide plasmid pJQ2005K. An interposon containing the promoter-less structural gene for β -galactosidase and a kanamycin resistance gene (Kokotek and Lotz 1989) was inserted into one of the *teuB* internal *BglII* sites of pMR16-3 (Fig. 1). CFN299-191 and CIAT899-191 were obtained as double recombinants. The localization and orientation of the insert was checked by hybridization using as a probe an internal DNA fragment and the *lacZ* cassette.

DNA manipulations and sequencing

A clone (pcosMR11) carrying the entire *teu* operon was obtained by hybridizing a 2.6-kb *EcoRI-HindIII* fragment (pMR19) to a cosmid library of total DNA from CFN299 in pSUP205 (Lacremans et al. 1996). Two *EcoRI* fragments from this cosmid were cloned into the Bluescript II SK(-) vector (Stratagene, La Jolla, Calif.) and transformed into *E. coli* DH5 α , yielding pMR16 and pMR34 (Fig. 1). For sequencing, smaller subclones were obtained by recloning with a variety of enzymes into the same vector. Double-stranded DNA was isolated with the Wizard Miniprep DNA purification system (Promega, Madison, Wis.). Universal oligonucleotide primers and some synthesized oligonucleotides were used with an automatic 373A DNA Sequencing System (Applied Biosystems, Foster City, Calif.). DNA was sequenced at least twice on both strands.

Sequence analysis

Identification of ORFs and motifs was performed with the GCG package (Gelascombe, Map and Motifs programs). Sequence similarities were searched with the BLAST network service from GCG (in the databases of the National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Md.), using the peptide sequence databases of nr (non-redundant GenBank CDS translations + PDB + Swiss Prot + PIR). To predict intracellular location and transmembrane regions of predicted proteins, the programs Psort (Nakai and Kanehisa 1991) and TMpred were used (Hofmann and Stoffel 1993). Hydrophathy profiles were performed also with TMpred and the Gene Works package (Kyte and Doolittle 1982), with a window

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strain	Relevant characteristics	Reference/source
<i>Rhizobium tropici</i>		
CFN299	Type A, wild type	CFN ^a
CFN299-19	CFN299 <i>tenC1</i> :Tn5 <i>gusA1</i> , Km ^r	This study
CFN299-191	CFN299 <i>tenB::lacZ</i> , Km ^r	This study
CFN299 pb ⁻	CFN299 cured of pb	This study
BR864	Type B, wild type	CFN ^a
CIAT899	Type B, wild type	Graham et al. (1982)
CIAT899-191	CIAT899 <i>tenB::lacZ</i> , Km ^r	This study
<i>Rhizobium etli</i>		
CFN42	Wild type	CFN ^a
CFNX184	CFN42 cured of <i>pe</i>	Brom et al. (1992)
CFNX89	CFN42 cured of <i>pd</i>	Brom et al. (1992)
BRA-5	Wild type	CFN ^a
F8	Wild type	CFN ^a
<i>Rhizobium leguminosarum</i>		
bv. <i>phaseoli</i>		
4292	8002, Rif ^r	Lamb et al. (1982)
8401	8002, Str ^r cured of <i>pSym</i>	Lamb et al. (1982)
<i>Rhizobium leguminosarum</i>		
bv. <i>viciae</i>		
VF39SM	VF39, Sm ^r	Priefer (1989)
<i>Rhizobium leguminosarum</i>		
bv. <i>trifolii</i>		
ANU 843	Wild type	B. G. Roffe ^b
W14-2	Wild type	Baklani et al. (1992)
<i>Rhizobium giardinii</i>		
bv. <i>phaseoli</i>		
Ro84	Wild type	Amarger et al. (1997)
bv. <i>giardinii</i>		
H152	Wild type	Amarger et al. (1997)
<i>Rhizobium gallicum</i>		
bv. <i>gallican</i>		
FL27	Wild type	Piñero et al. (1988) Sessitsch et al. (1997)
<i>Rhizobium</i> spp		
Ch80	Wild type	CFN ^a
CFN234	Wild type	CFN ^a
CFN265	Wild type	CFN ^a
<i>Rhizobium meliloti</i>		
2011	Wild type	Casse et al. (1979)
Rm41	Wild type	Bánfalvi et al. (1981)
<i>Rhizobium</i> sp.		
NGR234	Wild type	Trinick (1980)
<i>Agrobacterium</i> spp		
KAg-3	Wild type	Sawada and Ieki (1992)
ChAg-4	Wild type	Sawada and Ieki (1992)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		
GM19023	C-58 cured of its native plasmids	Rosenberg and Huguet (1984)
Apa	GM19023 harboring pRtrCFN299a	This study
Apb	GM19023 harboring pRtrCFN299b::Tn5- <i>mob</i> , Km ^r	CFN ^a
Apc	GM19023 harboring pRtrCFN299c::Tn5- <i>mob</i> , Km ^r	CFN ^a
Apa19	GM19023 harboring pRtrCFN299-19a, Km ^r	This study
Apa191	GM19023 harboring pRtrCFN299-191a, Km ^r	This study
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>recA</i> ⁻ , Nal ^r	Bethesda Research Laboratories
DH5 α (pcosMR11)	DH5 α harboring pcosMR11	This study
Plasmids		
pUC18	Cloning vector Ap ^r , <i>lacZ</i> ⁺	Norlander et al. (1983)
pJQ200SK	<i>B. subtilis</i> <i>SADB</i> containing suicide vector, Gm ^r	Quandt and Hynes (1993)
pRK2013	Helper plasmid for triparental mating, Km ^r	Figurski and Helinski (1979)
pSB387	pRK606 Ω ::Tn5- <i>gusA1</i> , Km ^r Tc ^r	Sharma and Signer (1990)

Table 1 (contd.)

Strain	Relevant characteristics	Reference/source
pMR19	2.6-kb <i>EcoRI-HindIII</i> insert derived from <i>EcoRI</i> fragment cloned from CFN299-19 in pUC18, Ap ^r (<i>HindIII</i> site is from <i>Tn5-gusA1</i>)	This study
pcosMR11	40-kb cosmid from a library in pSUP205 of total DNA from CFN299 containing the wild type <i>teu</i> locus, Tc ^r	This study
pMR16	4.0-kb <i>EcoRV</i> fragment of pcosMR11 in pBluescript II SK ⁻ , Cb ^r	This study
pMR16-3	2.65-kb <i>XbaI-XhoI</i> fragment of pMR16 in pBluescript II SK ⁻ , Cb ^r (<i>XbaI</i> site is from the vector)	This study
pMR34	5.2-kb <i>EcoRV</i> fragment of pcosMR11 in pBluescript II SK ⁻ , Cb ^r	This study
pKOK6	<i>lacZ-Km^r</i> cassette in pKOK4, Km ^r , Cb ^r	Kokotek and Lotz (1989)

^aCentro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. P. 565-A, Cuernavaca, Mor. México

^bCenter for Genetic Research (Plant Microbe Interactions Group),

Research School of Biological Sciences, Institute of Advanced Studies, Australian National University, P.O. Box 475, Canberra City, ACT 2601, Australia

of 20 amino acids. Identification of promoter regions was done using Promoter Prediction by Neural Network (Reese et al. 1996).

Induction of gene expression by plant exudates

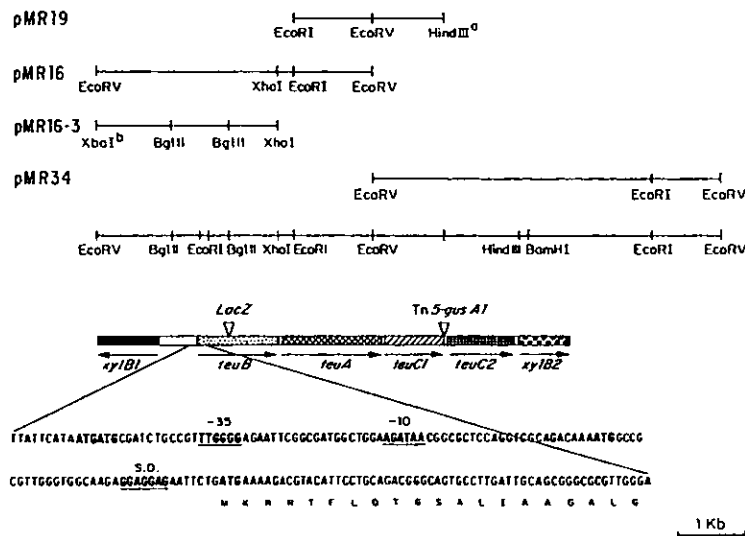
Induction studies were done with seed and root exudates from bean (*P. vulgaris* cv. Negro Xamapa, N-8-116, Peruano, Bronco, L-3-1-1-1, Bat 47 and wild type), *Clitoria ternatea*, *Leucaena leucocephala*, *Mucropitium atropurpureum*, soybean (*Glycine max* cv. Peking), alfalfa (*Medicago sativa* cv. Valenciana), pea (*Pisum sativum* cv. Trapper), and maize (*Zea mays* cv. Piedra blanca). All seeds were sterilized for 1 min in ethanol and 15 min in 1.25% (w/v) sodium hypochlorite, and rinsed five times with sterile water. To obtain seed exudates, the seeds were imbedded in water for 6 h in darkness at 28°C and drained. The amount of water used was four times the volume of the seeds for the smaller seeds (wild-type bean, *L. leucocephala*, *M. atropurpureum*, soybean and alfalfa) and two seeds

per ml of water for the large ones (bean, *C. ternatea*, pea and maize). Root exudates were obtained from plants grown for 5 days in Fahraeus (1957) solution without nitrogen. Three milliliters per plant (or 1.5 ml in the case of alfalfa) of exudate were obtained. Exudates were tested for the presence of bacteria or fungi by plating on PY medium. The exudates were kept at -20°C, if not used immediately.

Bean nodule extracts from plants nodulated by CFN299 were obtained 15 days after inoculation. The nodules were sterilized for 2 min in 1.25% (w/v) sodium hypochlorite and rinsed five times with sterile water. Ten nodules of average size were crushed per ml of water and filtered through Millipore 0.45 µm filters.

β-Glucuronidase (GUS) activity was detected with X-Gluc or with MUG as described (Gallagher 1992; Jefferson 1987). For the first screening, in order to identify genes inducible by bean exudates, all mutants were grown overnight in minimal medium (MM) (0.05% K₂HPO₄, 0.95% KH₂PO₄, 0.02% MgSO₄ · 7H₂O, 0.02% CaCl₂, 0.001% ferric citrate, 0.2% glutamic acid, 10 mM mannitol,

Fig. 1 Diagram of the organization of the *teu* operon and adjacent genes. Some restriction sites are indicated and fragments contained in clones pMR19, pMR16, pMR16-3, and pMR34 are shown. *HindIII*^a is from *Tn5-gusA*; *XbaI*^b is from the pSK(-) vector. The vertical arrowheads indicate insertion sites in the independent mutants obtained. The upstream regulatory sequence is shown at the bottom, including different possible ATG initiation sites, -35 and -10 motifs and a putative Shine-Dalgarno sequence. The arrows show the orientation of transcription



and Fabraeus trace minerals) and diluted 1:1 with bean-root exudates. GUS activity was detected with X-Gluc using 50 μ l of each culture.

Other assays were performed with CFN299-19 cultures (inoculated at a concentration of 0.2 OD₆₀₀ units) and grown for 3, 5 and 20 h in MM plus exudates or nodule extracts, using MUG as a substrate. GUS activity in the nodules was observed by incubating sterilized nodules with X-Gluc or with MUG in the presence of unfiltered bean-nodule extracts.

Induction of gene expression by different compounds

Induction of CFN299-19 (measured using MUG) was tested in microplates (Biolog, Hayward, Calif.) which contained 95 different carbon sources. Compounds which gave detectable fluorescence were further tested at 1, 10, 20 and 50 mM, along with other available compounds, performing the induction assays after 3 h of growth (initial OD of 0.2) in liquid MM without mannitol. The compounds tested were the following: α -D-glucose, maltose, D-fructose, α -D-lactose, ribose, sucrose, L-arabinose, melibiose, D-raffinose, L-rhamnose, stachyose, xylose, uridine, inosine, glucosamine hydrochloride, N-acetyl-D-glucosamine, D-galactose, galactosamine hydrochloride, N-acetyl-D-galactosamine, N,N-diacetylchitobiose, N,N-N-triacetylchitotriose, trigonelline, carnitine, stachydrine, polygalacturonic acid, nicotinic acid, D-galacturonic acid, D-mannitol, adonitol, erythritol, myo-inositol, xylitol, dulcitol, D-sorbitol, trehalose, and 2-amino ethanol. The following flavonoids were also tested for induction activity: naringenin, genistein, apigenin, quercetin and luteolin. The induction assays with exudates and carbon compounds were repeated at least five times, and a single representative experiment is reported.

HPLC analysis

The polar fraction of bean root exudates was separated on an HPLC system equipped first with a reverse-phase C-18 column following the conditions used by Hungria et al. (1991). Compounds were also separated on the basis of molecular weight on a Waters Ultrahydrogel 120 column (Millipore, Milford, Mass.), eluting with water at 1.125 ml/min and monitoring at 195 nm.

Results

Selection of Tn5-*gusA1* mutants

Out of 2000 Tn5-*gusA1* *R. tropici* mutants, 270 were selected because they had insertions in plasmids pa, pb and pc. These mutants were identified by their ability to transfer kanamycin resistance to *A. tumefaciens* recipient strains in plate matings. When these mutants were assayed for the expression of β -glucuronidase, we found eight that expressed GUS activity in the presence of bean root exudates.

Single Tn5-*gusA1* insertions were present in each mutant. Insertions were either located on the Sym plasmid (pc) (in three mutants) or on a smaller plasmid (pa) (in five mutants). *E. coli* clones containing pUC18 with *EcoRI* DNA fragments derived from the CFN299 mutants were selected by their resistance to kanamycin. The sequence analysis, starting from a primer within Tn5, showed that an insertion on the Sym plasmid was in the *nodB* gene of *R. tropici* (not shown). Other sequences, with the exception of pMR19 (derived from CFN299-19) were not clearly related to known genes.

Due to the instability of the Tn5-*gusA1* inserts in the majority of the cases, we were unable to recover the original mutants from which the mutations had been cloned. By hybridizing with Tn5 as a probe, we found a very high frequency of rearrangements of the Tn5-*gusA1* during subculture of the mutant strains (not shown). We also became aware that the version of Tn5-*gusA1* that we were using has been observed to be unstable in other laboratories. Nonetheless, we decided to continue the work with CFN299-19 since it proved to be very stable, even after 4 years of repeated subculturing. The 2.6-kb *EcoRI-HindIII* fragment in pUC18, pMR19 (Fig. 1), was used as a probe to select a cosmid clone (pcosMR11) carrying the wild-type locus from a library of CFN299. The location of the cloned fragment is on pRTrCFN299pa, a 185-kb plasmid that is conserved in the two *R. tropici* types (Fig. 2). This plasmid is auto-transferable to *A. tumefaciens* at very high frequencies (around 1×10^{-1}).

DNA sequence analysis

A 6936-bp DNA region flanking the site of insertion of Tn5-*gusA1* in the original mutant CFN299-19 was completely sequenced. The sequence has been deposited in GenBank under accession number AF036920. The transposon insertion in CFN299-19 is in a genetic region whose deduced protein products show similarity to ABC transporters, specially with sugar transport proteins from a family which includes Ara (arabinose), Mgl (galactose), and Rbs (ribose) proteins (Table 2). The best homology was with Rbs proteins from *E. coli*.

Four ORFs were found on the same strand (Fig. 1). The predicted products of these ORFs are the following. The first, TeuB (362 amino acids, encoded from nucleotides 1556-2641) has homology, albeit low (60% at the C-terminal end), to RbsB, the periplasmic protein precursor (Table 2). The second, TeuA (508 amino acids,

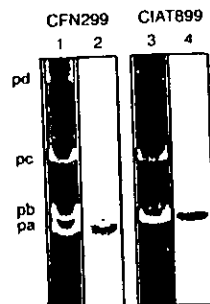


Fig. 2 Ethidium bromide-stained plasmid profiles (odd-numbered lanes) and Southern blots of each plasmid profile hybridized to pMR19 containing an internal fragment of *teuA* and *teuC1* (even-numbered lanes). The *R. tropici* strain CFN299 has four plasmids, pd of 1500 kb, pc of 450 kb (pSym), pb of 220 kb and pa of 185 kb.

Table 2 Comparisons of Teu and Xyl proteins with their closest relatives

Protein	Best score homology ^a	Identity ^b	Similarity ^b	Probability ^c	Motifs	Amino acids ^d
<u>XylB1</u>	XylB P39849 Aryl-alcohol dehydrogenase <i>P. putida</i>	163/299 (54%)	211/299 (70%)	2.2×10^{-114}		
TeuB	RbsB P02925 D-ribose binding periplasmic protein precursor <i>E. coli</i>	49/230 (21%)	102/230 (44%)	6.0×10^{-18}		
TeuA	RbsA P04983 Ribose transport ATP-binding protein <i>E. coli</i>	188/450 (42%)	283/450 (63%)	1.4×10^{-113}	ATP/GTP - A binding site ABC transporter	GENGAGKS (37-44) LSGGNQQKVLLCRWL(399-413)
TeuC1	RbsC P04984 Ribose transport system permease protein <i>E. coli</i>	92/237 (39%)	143/237 (60%)	2.7×10^{-50}	Hydrophobic membrane proteins; periplasmic permeases of the AraH family	LYLFASGGNDFNARMNGVPVERTVI KAYILSALFACAAGM (185-225)
TeuC2	RbsC P04984 Ribose transport system permease protein <i>E. coli</i>	72/244 (30%)	126/244 (52%)	1.1×10^{-28}	Hydrophobic membrane proteins; periplasmic permeases of the AraH family	RYFRAVGNNPRAAEITGIPLARTIFF SHTLAGTLTGIAAL (204-244)
<u>XylB2</u>	XylB P39849 Aryl-alcohol dehydrogenase <i>P. putida</i>	98/217 (45%)	140/217 (65%)	4.3×10^{-104}		

^a Protein, data base accession number and source organism^b Number of amino acids with identity or similarity, total number of amino acids compared^c Probability that the scores have occurred by chance^d Amino acids contained in the motif and localization in the protein

encoded from nucleotides 2700-4223), shows the highest similarity to sugar transport ATP-binding proteins. *TeuA* should have two ATP-binding motifs, but with the program used only one was detected (Table 2). By direct inspection we found a sequence that may constitute the other ATP binding site, VFIFDEV (163-168 amino acids) (Higgins 1992). The third and fourth proteins, *TeuC1* and *TeuC2* (313 and 332 amino acids, encoded from nucleotides 4236-5174 and 5183-6178, respectively), had homology to the permease protein (*RbsC*). The *TeuC1* and *TeuC2* have the conserved motif found in hydrophobic membrane proteins of the periplasmic permease type, being most similar to the *AraH* family (Fig. 1) (Saurin et al. 1994). *TeuC1* and *TeuC2* show only 25% amino acid identity (51% similarity).

The deduced proteins are predicted to have the same cellular location as the corresponding *Rbs* proteins (Bell et al. 1986). *TeuB* is, according to our analysis, a periplasmic protein with a cleavable N-terminal signal sequence which may interact with the compound that is transported. *TeuA* is in the cytoplasm and is bound to the inner membrane via one transmembrane segment. *TeuC1* and *TeuC2* are highly hydrophobic (as is *RbsC*), having eight and nine transmembrane segments in the inner membrane, respectively.

We found other two ORFs, one on each side of the four described above. Both of these had homology to *xyfB* from *Pseudomonas putida*, but the one that is close to *teuB* is transcribed in the opposite direction relative to the other genes (Fig. 1 and Table 2). They were called *xyfB1* and *xyfB2* because of their high similarity to *xyfB*. They were partially sequenced and compared, showing 61% homology over 609 nucleotides.

The intergenic spaces between *xyfB1*, *teuB*, *teuA*, *teuC1*, *teuC2*, and *xyfB2* are 661, 58, 12, 8 and 50 bp long, respectively. Potential Shine-Dalgarno sequences (ribosome binding sites) were found preceding each of the genes. No transcriptional terminators were found in the 50 bp between *teuC2* and *xyfB2*.

The probable translation start codon for the *teu* operon is at nucleotide 1556, since a Shine-Dalgarno sequence was found seven bases upstream. Other methionines were found in this region, but none of them is near a Shine-Dalgarno sequence (Fig. 1). A probable promoter region (-10 -35) was found 54 bases upstream of this ATG.

Under the hybridization conditions tested, no homology was found with *R. etli* strain CFN42 using as a probe the *EcoRI* insert from pMR19 (Fig. 1). This probe includes a large part of *teuA* and *teuC1*, which are the most conserved genes in the sugar transport operons.

Induction of *teu* gene expression by plant exudates

Reproducible GUS activity in CFN299-19 was detected on incubation with Negro Xamapa bean-root exudates. At least 20 independent assays were performed. The highest GUS activities (517-465 nM MU/min/10⁶ cells)

were obtained with CFN299-19 cultures at the beginning of the exponential phase (at 0.2-0.6 OD600) and lower inducibility (159 nM MU/min/10⁶ cells) was observed with cultures in late exponential or stationary phase (at 1.8 OD600). Root-exudates obtained from a bean cultivar with a high capacity to fix nitrogen (N-8-116) or from light-seed beans, as well as from wild *P. vulgaris*, had an inducing capacity similar to that of Negro Xamapa. Induction was observed also with *Macroptilium atropurpureum* root exudate. There was also a slight induction with alfalfa root exudates (Fig. 3). No induction was observed with seed exudates. GUS activity was not observed in bacteroids treated with X-Gluc or MUG, or with extracts from bean nodules. To determine whether an inhibitor of gene expression was present in bean-seed exudates or in nodule extracts, they were mixed 1:1 with bean-root exudates. No inhibition was observed, compared to the control (water + bean-root exudates) (Fig. 3). No induction was observed with seed or root exudates from the other plants tested.

Utilization of the inducing compound

To test if the inducing compound was utilized by various *Rhizobium* species, including *R. tropici*, we incubated the bean-root exudate-medium with various strains (inoculated at an OD600 value of about 0.1) for 24 h. The exudate-containing media were filtered to remove the bacteria and tested for their inducing activity with CFN299-19. All the inducing compound was removed by *R. tropici* type A strain CFN299, type B strains CIAT899 and BR864, and by other bean-nodulating bacteria such as *R. etli* strains CFN42, Bra5 and F8; *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* 4292 and *R. giardinii*

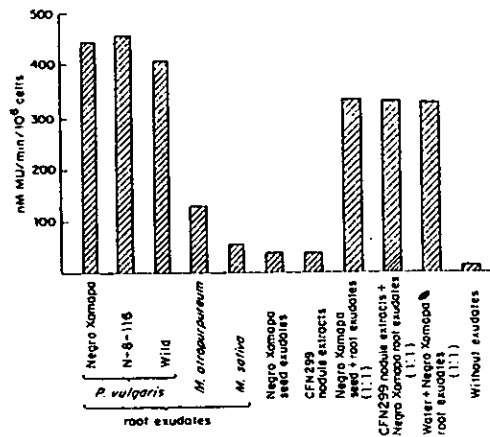


Fig. 3 β -Glucuronidase specific activities measured for CFN299-19 after incubation for 3 h in the presence of plant exudates or nodule extracts

Table 2

Hind III

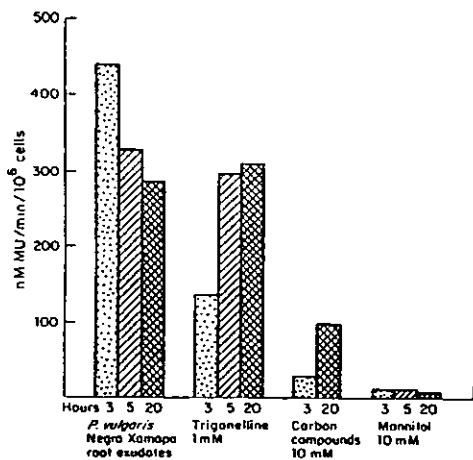


Fig. 6 β -glucuronidase specific activities from CFN299-19 incubated for different periods of time (3 and 20 h) with plant root exudates and various defined compounds. The bars labelled Carbon compounds show the average level of β -glucuronidase expression obtained with inosine, uridine, galactosamine, glucosamine, N-acetyl galactosamine, N-acetyl glucosamine, α -cyclodextrin, 2-aminoethanol and xylitol

ing that the inducing compound is catabolized during the first 3 h. No induction was observed with any of the flavonoids tested.

To establish whether trigonelline was the main compound determining the inducing activity of the exudate, a *R. etli* CFNX184 (CFN42 cured of pc) strain that is incapable of growth on trigonelline as sole carbon source was tested for its capacity to remove the inducer from the exudate (Fig. 5). After the strain had been growing on the exudate for 24 h very little inducer activity was

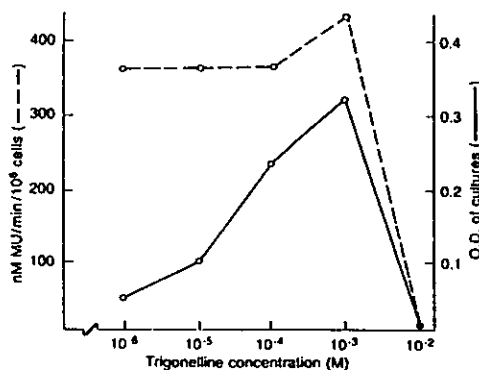


Fig. 7 β -glucuronidase specific activities (continuous line) of CFN 299-19 cultures grown in the presence of different trigonelline concentrations. The OD₆₀₀ value of the cultures is indicated by the dashed line.

recovered from the exudate. Similar observations were made with CIAT899, which cannot catabolize trigonelline (Fig. 5). *R. meliloti* and *R. leguminosarum* bv. *viciae* VF39SM, although able to catabolize trigonelline, were incapable of using the exudate-inducing compound.

HPLC analysis

We recovered the inducing compound in the polar fraction of the root exudate. This fraction was chromatographed either on a C18 column, for separating flavonoids, or on an Ultrahydrogel 120 column that separates compounds according to molecular weight. In the C-18 chromatograph a fraction that eluted before trigonelline and another that coeluted with trigonelline had inducing activity. In the Ultrahydrogel chromatograph it emerged that the fraction that had inducing activity had a molecular weight between 150 and 350 (data not shown).

Phenotypic analyses of the mutants

To analyze the role of the *ten* genes in symbiosis, we obtained independent mutants, both in the *R. tropici* type reference strain CIAT899 (Type B) and in CFN299, by site-directed insertion of a *lacZ* cassette into the *tenB* gene. The original mutant CFN299-19, as well as the new construction CFN299-191, was able to utilize the bean-inducing compound like the wild type strain CFN299 (Fig. 5). No deficiency in symbiosis was observed with the CFN299 mutants. On the other hand, CIAT899-191 was less efficient in removing the inducing activity from exudate when grown for 24 h in the exudate medium (Fig. 5). When CIAT899-191 was inoculated by itself, nodule number, persistence, and senescence were as in the wild type and microscopic analysis revealed that the nodules were normally infected, but CIAT899-191 showed reduced competitiveness for nodule formation. It formed around half of the nodules when inoculated in a 1:1 ratio with the wild type. Different inoculum ratios showed that the mutant was significantly less competitive than the wild type (Table 3). Different inoculum sizes were tested, varying between 1000 and 100 000 total bacteria per plant, without affecting the proportion of wild type and mutant cells recovered from nodules.

A. tumefaciens strain GM19023, which is unable to metabolize the bean compound, acquires this capacity from plasmid pa (from wild type CFN299). It is worth noting that the mutant plasmid from CFN299-191 is incapable of complementing this function, whereas the plasmid from CFN299-19 confers this capacity. This may be related to the different positions of the two mutations in the *ten* operon (Fig. 5).

All three mutants (CIAT899-191, CFN299-19, CFN299-191) and the wild types were able to grow on all of the compounds that were used in the induction

significantly less than

Table 3 Relative nodule occupancy by the *R. tropici* wild type strain CIAT899 and the mutant CIAT899-191

Inoculum ratio ^a	Nodule occupancy		Statistical significance ^{b,c}
	% CIAT899	% CIAT899 191	
1:1 ^b	71.6	28.4	**
1:1	60.3	39.7	*
1:2	57.1	42.9	**
1:20	15.2	84.8	**

^aTen nodules from 10 plants were analyzed for each inoculum ratio. Mixed nodules were not considered. The 1:1 inoculum ratio was tested in two independent experiments.

^bProbably significant differences ($P < 0.05$) and highly significant differences ($P < 0.01$) from the expected values deduced from the inoculum ratio using proportion contrast analyses are indicated by single and paired asterisks, respectively.

assays, indicating that they were not auxotrophs. This would indicate that the inducing compound transported by the *teu* genes does not correspond to any of the commercially available ones we have tried until now.

Discussion

The *A. tumefaciens* strain GM19023 bearing the *R. tropici* CFN299 symbiotic plasmid (pRtrCFN299c) is able to form nitrogen-fixing nodules on bean, albeit at a reduced efficiency both for nodulation and nitrogen fixation. If, in addition to the Sym plasmid, a 200-kb plasmid (pRtrCFN299b) is transferred to *A. tumefaciens* recipient strains, then nodulation rates of up to 50% of the wild-type rate and nitrogen fixation at 25% of the wild-type rate are obtained with the transconjugants (Martinez et al. 1987). It therefore seemed likely to us that the *R. tropici* plasmids contained some of the genetic information involved in symbiosis, and for this reason we decided to focus our efforts on plasmid-borne genes that are inducible with exudates.

The locus at which the *Tn5-gusA1* was inserted was originally identified as being inducible by bean-root exudates, and sequencing revealed it to contain genes related to sugar transport genes. The uptake of sugars into the cell requires an assemblage of transport proteins. In bacterial sugar transport systems, the genes encoding the proteins that are directly involved in the binding of the sugar (e.g. *rbsB*) are the most divergent ones (Ames 1986; Higgins 1992). This accounts for the different sugar specificities. This is also the case with the *teu* genes: *rbsB* and *teuB* show only low similarity, restricted to the C-terminal end. In addition, if the start codon is the one proposed, the encoded TeuB protein would be 66 amino acids larger than RbsB. In contrast, the ATP-binding proteins for sugar transport systems (TeuA in this case) show the highest degree of similarity and they are the most conserved of the ABC transporters (Higgins 1992). TeuC1, TeuC2, and TeuA have similar numbers of amino acids to the respective Rbs proteins. Since we found no homology to the RbsD, we suppose that one of the RbsC homologs may substitute for RbsD in the inner membrane.

The bean inducing compound could be unrelated to sugars and might resemble opines, betaines or even an

alcohol, as discussed later. The nicotinic-methylated betaine trigonelline occurs widely in plants (Tramontano et al. 1986). Seeds and roots of alfalfa release the betaines trigonelline and stachydrine, which act as inducers of transcription of some *R. meliloti nod* genes (Phillips et al. 1992). Betaine biosynthetic pathways include amino acids as precursors. Genes for the catabolism of trigonelline are located on the symbiotic plasmid of *R. meliloti* and have been cloned and sequenced (Boivin et al. 1991). They bear no significant homology to the *R. tropici teu* genes. Plant secondary metabolites catabolized selectively by microorganisms have been called nutritional mediators (Tepfer et al. 1988). These, in addition to being energy and carbon sources, may act as additional plant-signal molecules. Strains such as VF39SM and *R. meliloti* 2011 do catabolize trigonelline yet do not consume the inducer. CIAT899 and the c plasmid-cured CFN42 (CFN_x184) do not use trigonelline but consume the inducing activity. Thus we conclude that, in addition to trigonelline, there is another compound in the bean exudates that acts as the primary inducer. In addition, *xyiB2* could be part of the *teu* operon. In *P. putida* this gene belongs to *xyiCAB* operon whose proteins convert aromatic compounds to benzoic acids. XylB is a benzyl alcohol dehydrogenase that oxidizes toluol to tolualdehyde (Shaw and Harayama 1990). On this basis, the presence of *xyiB2* could be an indication that the inducing compound is related to an alcohol (perhaps an aryl alcohol).

The majority of bean-nodulating rhizobia are able to utilize this compound, with the exception of the *Rhizobium* spp. (Cl180, CFN234, and CFN265) and *R. gallium* bv. *gallicum* (FL27), which is related to *R. etli*. These have been reported to form few nodules on bean as compared to the other species and they do not harbor a "phaseoli" type plasmid (Martinez et al. 1985; Martinez et al. 1987).

The fact that *R. etli* strain CFN42 has no clear structural homologs of the *R. tropici* genes, in spite of its ability to take up ^{the} uptake and remove the inducer from exudate, may be explained if these two species have independent and converging uptake systems. These might have been selected by the host plant. We are interested in cloning and sequencing genes from *R. etli* strain CFN42 that are involved in this uptake in order to answer this question. We speculate that CFN299 has an additional

system for uptake and thus no phenotype is observed in the CFN299 mutants. The other system of CFN299 is perhaps homologous to that of *R. etli*, and is encoded on the pSym, as in *R. etli* and *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. CIAT899 must, then, have only one of these uptake systems. The ~~formant~~ nodulation of CIAT899 is explained because this strain, like many other rhizobia, is capable of using carbon sources present in the exudate, such as sucrose and glucose.

Periplasmic sugar-binding proteins play a role in chemotaxis in *E. coli*, *Salmonella*, *Azospirillum* and *Agrobacterium*, and certainly could do so in rhizobia. It remains to be evaluated if *teu* mutants are affected in chemotaxis.

Only after chemical characterization of the bean exudate inducer and the identification of the compound that is transported by the wild types but not by the mutants, will we be able clearly and definitively to determine the function of the *teu* genes. It is worth pursuing the definition of the chemical structure of this bean-exudate compound and we are working on this problem. Preliminary evidence indicates that the compound is present at low concentration in the exudate (in agreement with the fact that the bacteria seem to remove it completely within 3 h), that it might be a mono- or a disaccharide and is stable at 95°C. *equivalent in weight to*

Macroptilium and *Phaseolus* belong to the *Phaseolinae* subtribe of the subfamily *Papilionoideae* (Bruneau et al. 1990). *Macroptilium* is the closest to *Phaseolus* among all the plant root exudates tested and it has *teu* gene-inducing capacity. The compound in *Macroptilium* could be identical or similar to that of *Phaseolus*. The inducing compound seems to be restricted to this group of related legumes and it may form part of specificity mechanisms that may be further manipulated to improve inoculant competitiveness in the field. It is remarkable that all bean-nodulating rhizobia tested had the capacity to metabolize the bean exudate compound. This characteristic, although not indispensable for symbiosis, may be advantageous for rhizosphere survival and efficiency as a bean symbiont.

Acknowledgements We thank César Rodríguez for his help in obtaining clone pMR16, Marco Antonio Rogel for help with the HPLC, Paul Gaytan and Eugenio López from the Biotechnology Institute, UNAM, for the synthesis of the oligonucleotides, Patricia Bustos for DNA sequencing, Julio Martínez Romero for computing assistance and statistical analysis, and Michael Dunn for critically reading the manuscript. Partial financial support was from DGAPA IN202097, from UNAM. Michael Hynes was supported by CONACyT Cítedras Patrimoniales de Excelencia during his sabbatical year in Esperanza Martínez's laboratory. Mónica Rosenbluth was the recipient of a fellowship from CONACyT and DGAPA.

References

Amarger N, Macheret V, Laguerre G (1997) *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov. from *Phaseolus vulgaris* nodules. Int J Syst Bacteriol 47:996-1006

- Ames GF-I. (1986) Bacterial periplasmic transport systems: structure, mechanism and evolution. Annu Rev Biochem 55:397-425
- Baldani JJ, Weaver RW, Hynes MF, Eardly BD (1992) Utilization of carbon substrates, electrophoretic enzyme patterns, and symbiotic performance of plasmid-cured clover rhizobia. Appl Environ Microbiol 58:2308-2314
- Bañfali Z, Sakanyan V, Konec C, Kiss A, Dusha I, Kondoros A (1981) Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of *R. meliloti*. Mol Gen Genet 184:318-325
- Bell AW, Buckel SD, Groarke JM, Hope JN, Kingsley DH, Hermondson MA (1986) The nucleotide sequences of the *rhbD*, *rhbA* and *rhbC* genes of *Escherichia coli*. J Biol Chem 261:7652-7658
- Boivin C, Barran LR, Malpica CA, 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
- Bron S, García de los Santos A, Stepkowski T, Flores M, Dávila G, Romero D, Palacios R (1992) Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* are required for optimal symbiotic performance. J Bacteriol 174:5183-5189
- Bruneau A, Doyle JJ, Palmer JD (1990) A chloroplast DNA structural mutation as a subtribal character in the Phaseoleae (Leguminosae). Syst Bot 15:78-86
- Casse F, Boucher C, Jollot JS, Muehl M, Dénarié J (1979) Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis. J Bacteriol 113:229-242
- Charles TC, Finan TM (1991) Analysis of a 1600-kilobase *Rhizobium meliloti* megaplasmid using defined deletions generated in vivo. Genetics 127:5-20
- Dénarié J, Debelle F, Rosenberg C (1992) Signaling and host range variation in nodulation. Annu Rev Microbiol 46:497-531
- Eckhardt T (1978) A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. Plasmid 1:584-588
- 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
- Figurski DH, Helinski DR (1979) Replication of an origin-containing derivative of RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. Proc Natl Acad Sci USA 76:1648-1652
- Freiberg C, Fellay R, Bairoch A, Broughton WJ, Rosenhal A, Perret X (1997) Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. Nature 387:394-401
- Gallagher SR (1992) Quantitation of GUS activity by fluorometry. In Gallagher SR (ed) GUS Protocols: Using the GUS gene as a reporter of gene expression. Academic Press, San Diego, pp 47-59
- Graham PH, Viteri SE, Mackie F, Vargas AAT, Palacios A (1982) Variation in acid soil tolerance among strains of *Rhizobium phaseoli*. Field Crops Res 5:121-128
- Hernández-Lucas I, Segovia L, Martínez-Romero E, Pueppke SG (1995) Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. Appl Environ Microbiol 61:2775-2779
- Higgins CF (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. Annu Rev Cell Biol 8:67-113
- Hofmann K, Stoffel W (1993) TMbase: a database of membrane-spanning protein segments. Biol Chem Hoppe-Seyler 374:166
- Hungria M, Joseph CM, Phillips DA (1991) Anthocyanidins and flavonols-major nod gene inducers from seeds of a black-seeded common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). J Plant Physiol 97:751-756
- Hynes MF, McGregg NF (1990) Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. Mol Microbiol 4:567-574
- Hynes MF, O'Connell MP (1990) Host plant effect on competition among strains of *Rhizobium leguminosarum*. Can J Microbiol 36:864-869
- Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. Plant Mol Biol Reporter 5:387-405

change to: *Rhizobium nod gene inducers exuded naturally from roots of common bean (Phaseolus vulgaris L.)*

- Johnston AWB, Burn JE, Economou A, Davis EO, Hawkins FKL, Bibb MJ (1988) Genetic factors affecting host range in *Rhizobium leguminosarum*. In: Palacios R, Verma DP (eds) Molecular genetics of plant-microbe interactions. APS Press, St. Paul, Minn., pp 378-384
- Kyte J, Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol* 157:105-132
- Kokatek W, Lotz W (1989) Construction of a *lacZ*-kanamycin resistance cassette, useful for site-directed mutagenesis and as promoter probe. *Gene* 84:467-471
- Kondorosi A, Kiss GB, Dusha I (1984) Plasmids governing symbiotic nitrogen fixation. In: Sobha-Rao NS (ed) Current developments in biological nitrogen fixation. Edward Arnold, London, pp 135-171
- Laeremans T, Caluwaerts I, Verreth C, Rogel MA, Vanderleyden J, Martinez-Romero E (1996) Isolation and characterization of the *Rhizobium tropici* nod factor sulfation genes. *Mol Plant-Microbe Interact* 9:492-500
- Lamb JW, Hombrecht G, Johnston AWB (1982) Plasmid-determined nodulation and nitrogen-fixation abilities in *Rhizobium phaseoli*. *Mol Gen Genet* 186:449-452
- Long SR (1989) *Rhizobium*-legume nodulation: life together in the underground. *Cell* 56:203-214
- Martinez E, Pardo MA, Palacios R, Cevallos MA (1985) Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *J Gen Microbiol* 131:1779-1786
- Martinez E, Palacios R, Sanchez F (1987) Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. *J Bacteriol* 169:2828-2834
- Martinez-Romero E (1994) Recent developments in *Rhizobium* taxonomy. *Plant Soil* 161:11-20
- Martinez-Romero E, Rosenblueth M (1990) Increased bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodulation competitiveness of genetically modified *Rhizobium* strains. *Appl Environ Microbiol* 56:2384-2388
- Martinez-Romero E, Segovia L, Martins Mercante F, Franco AA, Graham P, Pardo MA (1991) *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int J Syst Bacteriol* 41:417-426
- Mavingui P, Flores M, Romero D, Martinez-Romero E, Palacios R (1997) Generation of *Rhizobium* strains with improved symbiotic properties by random DNA amplification (RDA). *Nature Biotechnol* 15:564-569
- Miller JH (1972) Experiments in bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Nakai K, Kanchisa M (1991) Expert system for predicting protein localization sites in Gram-negative bacteria. *Proteins* 11:95-110
- Norrander J, Kempe T, Messing J (1983) Construction of improved M13 vectors using oligonucleotide-directed mutagenesis. *Gene* 26:101-106
- Pardo MA, Lagunez J, Miranda J, Martinez E (1994) Nodulating ability of *Rhizobium tropici* is conditioned by a plasmid-encoded citrate synthase. *Mol Microbiol* 11:315-321
- Phillips DA, Joseph CM, Maxwell CA (1992) Trigonelline and stachydrine released from alfalfa seeds activate NodD2 protein in *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol* 99:1526-1531
- Phillips DA, Dakota FD, Sande E, Joseph CM, Zou J (1994) Synthesis, release and transmission of alfalfa signals to rhizobial symbionts. *Plant Soil* 161:69-80
- Phillips DA, Streit WR, Volpin H, Palumbo JD, Joseph CM, Sande ES, de Bruijn FJ, Kado CI (1996) Plant regulation of bacterial root colonization. In: Stacey G, Mullin B, Gresshoff PM (eds) Biology of plant-microbe interactions. International Society for Plant-Microbe Interactions, St. Paul, Minn., pp 481-486
- Piñero D, Martinez E, Selander RK (1988) Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Appl Environ Microbiol* 54:2825-2832
- Priefer UB (1989) Genes involved in lipopolysaccharide production and symbiosis are clustered on the chromosome of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* VF39. *J Bacteriol* 171:6161-6168
- Puepke SG (196) The genetic and biochemical basis for nodulation of legumes by rhizobia. *Crit Rev Biotechnol* 16:1-51
- Quandt J, Hynes MF (1993) Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria. *Gene* 127:15-21
- Reese MG, Harris NL, Eeckman FH (196) Large-scale sequencing, specific neural networks for promoter and splice site recognition. In: Hunter L, Klein T (eds) Proceedings of the Pacific Symposium on Biocomputing, Kona, Hawaii
- Rosenberg C, Huguet T (1984) The pATC58 plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* is not essential for tumor induction. *Mol Gen Genet* 195:533-536
- Rosbach S, Rasul G, Schneider M, Eardly B, de Bruijn FJ (1995) Structural and functional conservation of the rhizopine catabolism (*noc*) locus is limited to selected *Rhizobium meliloti* strains and unrelated to their geographical origin. *Mol Plant-Microbe Interact* 8:549-559
- Rovira AD (1969) Plant root exudates. *Bot Rev* 35:35-57
- Saurin W, Köster W, Dassa E (1994) Bacterial binding protein-dependent permeases: characterization of distinctive signatures for functionally related integral cytoplasmic membrane proteins. *Mol Microbiol* 12:993-1004
- Sawada H, Ieki H (1992) Phenotypic characteristics of the genus *Agrobacterium*. *Ann Phytopath Soc Japan* 58:37-45
- Schultze M, Kondorosi A (1996) The role of Nod signal structures in the determination of host specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *World J Microbiol Biotechnol* 12:137-149
- Scott IM, Firmin JL, Butcher DN, Searle LM, Sogeki AK, Eagles J, March JF, Self R, Fenwick GR (1979) Analysis of a range of crown gall and normal plant tissues for Ti plasmid-determined compounds. *Mol Gen Genet* 176:57-65
- Segovia L, Young JPW, Martinez-Romero E (1993) Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium eli* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 43:374-377
- Sessitch A, Ramirez-Saad H, Hardarson G, Akkermans ADP, de Vos WM (1997) Characterization of *Rhizobium pueblae* sp. nov., isolated from *Phaseolus vulgaris* L. *Int J Syst Bacteriol* 47: 1097-1107
- Sharma SB, Signer ER (1990) Temporal and spatial regulation of the symbiotic genes of *Rhizobium meliloti* in planta, revealed by transposon *Tn5-gusA*. *Genes Dev* 4:344-356
- Shaw JP, Harayama S (1990) Purification and characterization of TOL plasmid-encoded benzyl alcohol dehydrogenase and benzaldehyde dehydrogenase of *Pseudomonas putida*. *Eur J Biochem* 191:705-714
- Soedarjo M, Hemscheidt TK, Borthakur D (1994) Mimosine, a toxin present in leguminous trees (*Leucaena* spp.), induces a mimosine-degrading enzyme activity in some *Rhizobium* strains. *Appl Environ Microbiol* 60:4268-4272
- Tepler D, Goldmann A, Fleury V, Maille M, Message B, Pamboukdjian N, Bovin C, Dénarié J, Rosenberg C, Lallemand JY, Descoins C, Charpin I, Amarger N (1988) Calystegins, nutritional mediators in plant-microbe interactions. In: Palacios R, Verma DP (eds) Molecular genetics of plant-microbe interactions. APS Press, St. Paul, Minn., pp 139-144
- Tramontano WA, McGinley PA, Ciancaglini EF, Evans LS (1986) A survey of trigonelline concentrations in dry seeds of the Dicotyledonae. *Environ Exp Bot* 26:197-205
- Trinick MJ (1980) Relationships among fast-growing rhizobia of *Lupulus purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* spp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora*, and their affinities with other rhizobial groups. *J Appl Bacteriol* 49:39-53
- Van Egeraart AWSM (1975) The possible role of homoserine in the development of *Rhizobium leguminosarum* in the rhizosphere of pea seedlings. *Plant Soil* 42:381-386
- Vlissak KM, Vanderleyden J (1997) Factors influencing nodule occupancy by inoculant rhizobia. *Crit Rev Plant Sci* 16:163-229

change to: Classification of Austrian rhizobia and the Mexican isolate FL27 obtained from *Phaseolus vulgaris* L as *Rhizobium gallicum*.

DISCUSION

Una estrategia para analizar las funciones de los genes en bacterias Gram-negativas, ha sido la mutagénesis con transposones para provocar pérdida de dicha función. Los transposones son secuencias discretas de DNA que son incapaces de auto-replicarse y se pueden insertar en replicones de DNA, como cromosomas y plásmidos. Las inserciones pueden ser al azar, y cuando éstas se llevan a cabo en una secuencia de un gen, normalmente producen una mutación polar. En este trabajo se usó el Tn5, que ha mostrado ser muy estable en *Rhizobium* (Martínez et al., 1990). El Tn5 usado tiene el gen reportero *gusA1*, de forma que esta mutación permite también medir la inducción de la expresión del gen en el que se inserte (Sharma y Signer, 1990).

Cuando se construyeron las mutantes Tn5-*gusA1* en los plásmidos a, b y c de la CFN299, se seleccionaron ocho mutantes que expresaban actividad de β -glucuronidasa en presencia de exudados de frijol. Se observó un alto grado de rearreglos del transposón en siete mutantes, siendo la única estable la CFN299-19 (Tn5-*gusA1* en los genes *teu*). Se ignora cual es la razón de esto. La estabilidad en esta mutante se observa de varias formas (resultados no mostrados en el artículo): es la única que siguió presentando actividad de β -glucuronidasa en presencia de exudados de raíz de frijol; al hibridizar el DNA total de esta cepa usando como sonda Tn5 y el pMR19 en varias ocasiones durante cuatro años, siempre se observó el patrón esperado (Fig. 1).

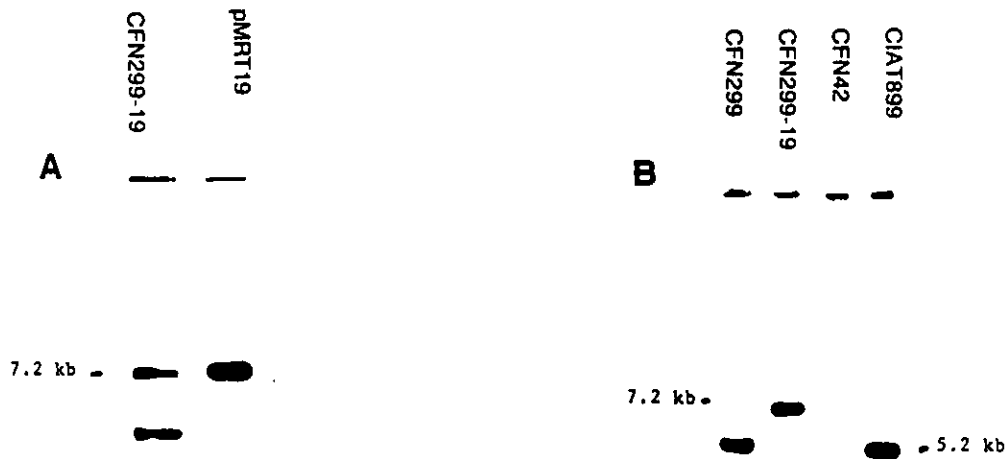


Fig. 1. (A) Hibridización con Tn5 del DNA total de *R. tropici* CFN299-19 y DNA de la clona pMRT19 (clona *Eco*RI obtenida de la CFN299-19 que incluye los genes *teuA* y *teuC1* y parte de Tn5-*gusA1*) digeridos con *Eco*RI. (B) Hibridización con pMR19 (clona obtenida de pMRT19 sin el Tn5-*gusA1*, ver Fig. 1 del artículo) del DNA total de *R. tropici* CFN299, CFN299-19, CIAT899 y *R. etli* CFN42, digeridos con *Eco*RI.

En el transcurso de este proyecto nos dimos cuenta de que la cepa de estudio, la CFN299, crecía más lentamente en medio mínimo y que ésto estaba asociado a una disminución de su capacidad simbiótica con nodulación tardía y formación de menor cantidad de nódulos. La cepa tenía el mismo perfil de plásmidos que la original (no mostrado). La mutante *lacZ* se obtuvo inicialmente a partir de la CFN299 con capacidad simbiótica disminuida (sin advertirse en ese momento). La cepa CFN299-191 se construyó transfiriendo el *pa::lacZ* de esa mutante a otra CFN299 obtenida de nódulo para recuperar el fenotipo silvestre de crecimiento en medio mínimo. Esta última CFN299 fue la que se utilizó para proseguir la investigación. Este fenómeno de disminución de la capacidad simbiótica ya había sido observado anteriormente por otros investigadores (Esperanza Martínez-Romero, comunicación personal; Toon Laeremans, comunicación personal). Esto deberá tenerse presente cuando se use la CFN299 como inoculante, y tal vez se pueda estudiar en el futuro qué es lo que sucede espontáneamente en la cepa que provoca la disminución de la capacidad simbiótica.

Una forma de competir de las poblaciones de microorganismos en la rizósfera es la capacidad de catabolizar una fuente de carbono y/o de nitrógeno específica producida por las plantas. Este parece ser el caso de la homoserina producida por el chícharo (van Egeraat, 1975, Hynes y O'Connell, 1990), de la mimosina en *Leucaena* (Soedarjo y Borthakur, 1996) y las rizopinas producidas en nódulos de *R. meliloti* (Murphy et al., 1988; Murphy et al., 1995). En todos estos casos se ha visto una ventaja competitiva de formar nódulos en las cepas que utilizan el compuesto específico. En este trabajo el compuesto exudado por las

raíces de frijol y transportado (tal vez catabolizado) sólo por bacterias simbiotes de esta planta, presenta un caso similar a los anteriores. Sin embargo, la capacidad competitiva bajo condiciones de laboratorio, la mutante que no puede transportar el compuesto de inducción (CIAT899-191), tiene una capacidad disminuida para nodular (Tabla 3 y Fig. 5 del artículo). Tal vez en el suelo donde las condiciones son más limitantes, los genes *teu* tengan mayor importancia. Sería interesante estudiar en el suelo en la rizósfera del frijol, la sobrevivencia de la mutante, su capacidad competitiva y la expresión de los genes *teu* y a su vez averiguar si otras bacterias o incluso la micorriza de la rizósfera de las plantas de frijol son también capaces de utilizar este compuesto. Queda por evaluarse la sobrevivencia de la mutante CIAT899-191 y su capacidad de competir también bajo condiciones de laboratorio.

Se hicieron los análisis del perfil de hidrofobicidad de las proteínas deducidas de los genes *teu* (Apéndice IV), obteniéndose predicciones de los segmentos transmembranales (Tabla 1) y de la localización intracelular de las proteínas con el programa Psort (Nakai y Kanehisa, 1991). Las proteínas Teu se compararon con las proteínas Rbs de *E.coli* descritas por Bell et al. (1986) encontrándose que TeuB y RbsB son ambas hidrofílicas y parecen tener una secuencia señal que se corta en el N-terminal. TeuB tiene el sitio de corte en el aminoácido 27. La probabilidad de que esta proteína sea periplásmica es de 0.924. TeuA y RbsA son ambas hidrofílicas, probablemente citoplásmicas. Sólo TeuA parece tener una hélice transmembranal. TeuC1 es altamente hidrofóbica con un perfil de hidrofobicidad similar a RbsC. Tiene una probabilidad de 0.520 de estar en la membrana interna y presenta ocho hélices transmembranales. TeuC2 también es altamente hidrofóbica. Tiene una probabilidad de 0.505 de estar en la

membrana interna y presenta 9 hélices transmembranales.

Los ORFs que bordean a los genes *teu* (*xy/B1* y *xy/B2*) codifican para proteínas similares a un ariil-álcohol deshidrogenasa. Aunque estos genes no están secuenciadas en su totalidad, se puede observar que las proteínas son hidrofóbicas, con dos posibles hélices transmembranales cada una (Tabla 1).

Los modelos de topología transmembranal que se presentan son los de mayor preferencia sugeridos por el programa. En el caso de TeuC1 y TeuC2 estos modelos coinciden con que la secuencia motivo conservada entre muchos transportadores ABC se encuentre en un asa (loop) citoplásmica, ya que parece estar involucrada en la interacción con los dominios de unión a ATP (a TeuA) (Fig. 2). Se hizo un modelo esquemático de la función y localización de estas proteínas, con base en la homología de las proteínas Teu (Tabla 2 del artículo) y la probable localización intracelular (Fig. 4 del capítulo de la introducción).

La mayoría de los transportadores ABC tienen seis segmentos transmembranales en cada uno de los dos dominios de la membrana interna (Higgins, 1992). Se han encontrado algunos transportadores ABC que tienen diferente número de hélices transmembranales. Por ejemplo, para el transporte de histidina en *Salmonella typhimurium*, HisQ y HisM tienen cada una 5 segmentos transmembranales; éste parece ser el mínimo número de segmentos transmembranales requeridos para la translocación de compuestos. El segmento N-terminal del que carecen HisQ y HisM tal vez sólo facilita una conformación y una orientación correcta en la membrana (Higgins, 1992). La proteína MalF para transportar maltosa en *E. coli* tiene ocho segmentos transmembranales, tiene los seis segmentos estandar y dos adicionales en el extremo N-terminal (Froshauer et al., 1988). Estos dos segmentos pueden ser deletados sin pérdida de la función de

Tabla 1. Segmentos transmembranales de mayor preferencia obtenidos con TMPred (Hofmann y Stoffel, 1993), de las proteínas deducidas de los genes *teu* y *xyl*.

Proteína	No. hélice	Longitud ^a	Calificación ^b	Orientación ^c
XylB1	1	21 (187-207)	1856	o-i
	2	25 (272-296)	608	i-o
TeuA	1	22 (318 -339)	1007	i-o
TeuC1	1	22 (14-35)	2170	o-i
	2	26 (62-87)	1418	i-o
	3	22 (92-113)	1929	o-i
	4	24 (121-144)	1521	i-o
	5	21 (160-180)	1799	o-i
	6	21 (212-232)	2049	i-o
	7	21 (257-277)	1712	o-i
	8	21 (283-303)	899	i-o
TeuC2	1	27 (27-53)	1814	i-o
	2	25 (57-81)	774	o-i
	3	21 (84-104)	1626	i-o
	4	25 (110-134)	2616	o-i
	5	21 (136-156)	1965	i-o
	6	22 (182-203)	2563	o-i
	7	28 (228-255)	1508	i-o
	8	24 (282-305)	2311	o-i
	9	21 (310-330)	1002	i-o
XylB2	1	24 (164-187)	778	i-o
	2	21 (191-211)	2051	o-i

^aNúmero de aminoácidos (localización).

^bCalificaciones mayores a 500 se consideran significativas.

^c i = adentro del citoplasma (in)

o = adentro del periplasma (out)

MalF (Ehrmann, et al., 1990). En el caso de TeuC1 y TeuC2 tuvieron homología a RbsC en siete hélices transmembranales tanto de TeuC1 como de TeuC2; las hélices que carecieron de homología fueron la número ocho de TeuC1 y las hélices tres y nueve de TeuC2. El transposón Tn5-*gusA1* está mutando el aminoácido 300 de TeuC1 que se encuentra en la hélice transmembranal número ocho (Fig. 2). Probablemente esta hélice adicional, al igual que las dos de MalF, no tenga una función importante en el transporte del compuesto. Esto explicaría que las cepas Apa19 (GMI9023 con el pa de CFN299-19, que tiene la inserción Tn5-*gusA1*) y Apa (GMI9023 con el pa de CFN299) tengan el mismo fenotipo, y no así la cepa Apa191 (GMI9023 con el pa de CFN299-191, que tiene *lacZ* en *teuB*) (Fig. 5 del artículo). Además otras razones por las cuales la inserción Tn5-*gusA1* no muestra ningún efecto, es que la mutación fuera no-polar, o que TeuC1 y TeuC2 sean sustituidas en su función por otras proteínas de transporte de la membrana interna.

En *Rhizobium* se conoce poco de la regulación de los transportadores. En *R. meliloti* se han descrito genes involucrados en el transporte de algún azúcar y con homología a *araC* de *E. coli* que pudieran estar reprimidos por *syrA* de manera que dejan de expresarse en nódulo (Long, 1997). En el caso de los genes *teu*, que tampoco se expresan en nódulo, no se propone un sistema de represión, pues los extractos de nódulo no indujeron la expresión de los genes ni tampoco inhibieron su expresión cuando se mezclaron junto con exudados de raíz (Fig. 3 del artículo). Hasta el momento mediante el análisis de secuencia se encontró en el extremo 5' de los genes *teu* un promotor potencial débil (con una probabilidad de 0.83), con secuencias semejantes a los promotores σ^{70} de *E. coli* (Fig. 1 del artículo).

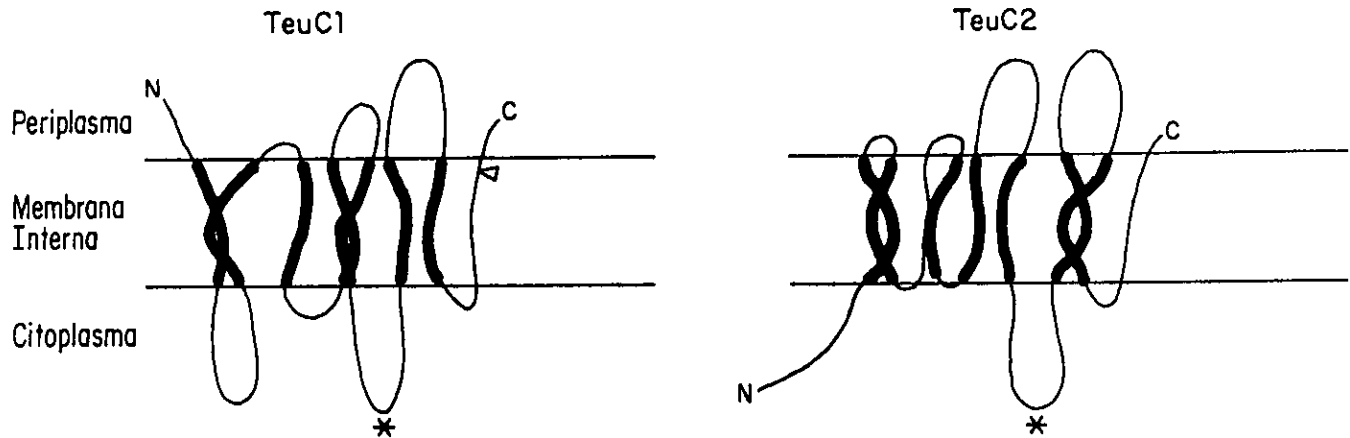


Fig. 2. Modelos propuestos de topología transmembranal de TeuC1 y TeuC2 obtenidos con TM pred (Hofmann y Stoffel, 1993), basados en los datos de la Tabla 1. **—** hélices transmembranales homólogas a RbsC. * secuencia motivo involucrada en la interacción con TeuA. ▽ Tn5-gusA1.

El compuesto inductor de los genes *teu* es exudado aparentemente en forma específica por raíces de plantas de la subtribu Phaseolinae de la subfamilia Papilionoideae, a la que pertenecen *Macroptilium* y *Phaseolus* (Fig. 3). Es probable que el compuesto inductor de *Macroptilium* sea diferente al de *Phaseolus*, ya que aunque se concentró el exudado de *Macroptilium*, éste nunca dió una inducción mayor al 30% con respecto al de *Phaseolus* (no se muestra). Un análisis más extenso de otras plantas de la misma subtribu, con diferente cercanía filogenética a *Phaseolus* nos permitirá responder qué tan específica es la producción de este compuesto.

La capacidad de las bacterias de transportar el compuesto no está relacionado a la cercanía filogenética de éstas, sino más bien a la capacidad de nodular a *Phaseolus vulgaris* (Fig. 4). Así, especies cercanas a *R. tropici* como son *Agrobacterium* spp. Chag-4 y KAg-3, no pueden utilizar el compuesto, en cambio *R. etli*, *R. leguminosarum* bv phaseoli y *R. giardinii*, que nodulan frijol, sí lo pueden transportar. Hay algunos rizobios que sí nodulan frijol pero formando menos nódulos, éstos son *Rhizobium* spp. (Cli80, CFN234 Y CFN265) y *R. gallicum* (FL27) cercanos a *R. etli* (Martínez et al., 1985, Martínez et al., 1987), y *Rhizobium* sp. NGR234 (van Rhijn et al., 1994). Ninguno de éstos fue capaz de utilizar completamente el compuesto (Fig. 4 del artículo). Tal vez si adquirieran los genes para el transporte del compuesto su capacidad para nodular mejoraría, por lo que se propone transferirlos a dichas cepas.

Las actividades de β -galactosidasa de las mutantes *lacZ* en el gen *teuB* (periplásmico) de las cepas CFN299-191 y CIAT899-191 no se pudieron medir, debido a que ésta no se expresa en periplasma.

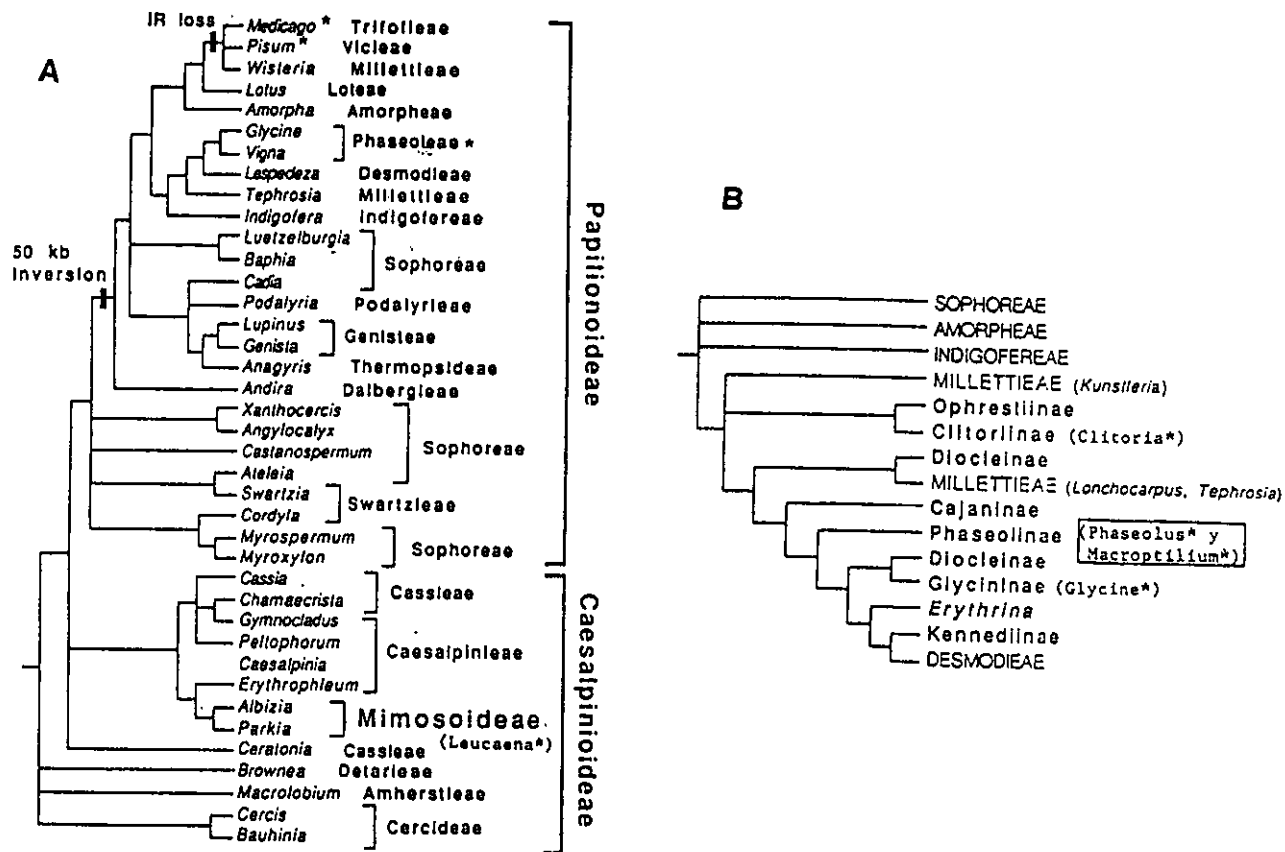


Fig. 3. (A) Relaciones evolutivas de la subfamilia Papilionoideae y Caesalpinioideae (Doyle, 1995) y (B) de la tribu Phaseoleae. Las tribus se muestran en mayúsculas (Doyle, 1995). * especies utilizadas en los ensayos de inducción de la expresión de los genes *teu*. □ especies que producen compuestos inductores de la expresión de los genes *teu*.

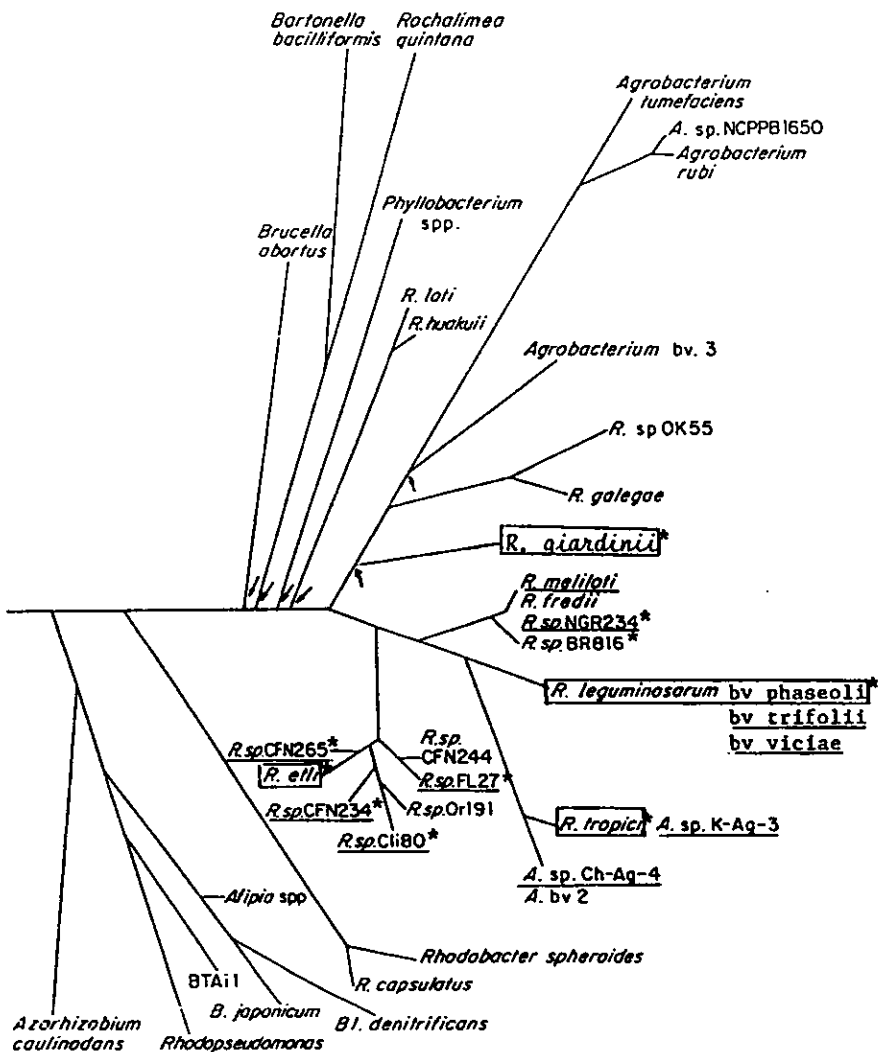


Fig. 4. Relaciones genéticas de la familia Rhizobiaceae y otras bacterias afines, basada en el análisis de secuencia de genes que codifican para el RNA ribosomal 16S (Martínez-Romero, 1994). La posición de nudos indicada con flechas no es definitiva. * rizobios capaces de nodular efectivamente a *P. vulgaris*. _____ especies utilizadas en los ensayos de catabolismo. □ especies capaces de remover del exudado el compuesto inductor de la expresión de los genes *teu*. *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, bv. *viciae* y bv. *trifolii* están cercanamente relacionadas. *R. giardinii* es un grupo independiente cercano a *R. galegae* y *A. tumefaciens* (Amarger et al., 1977). Estos últimos se añadieron a la filogenia original, y el sitio exacto dentro del árbol no está determinado.

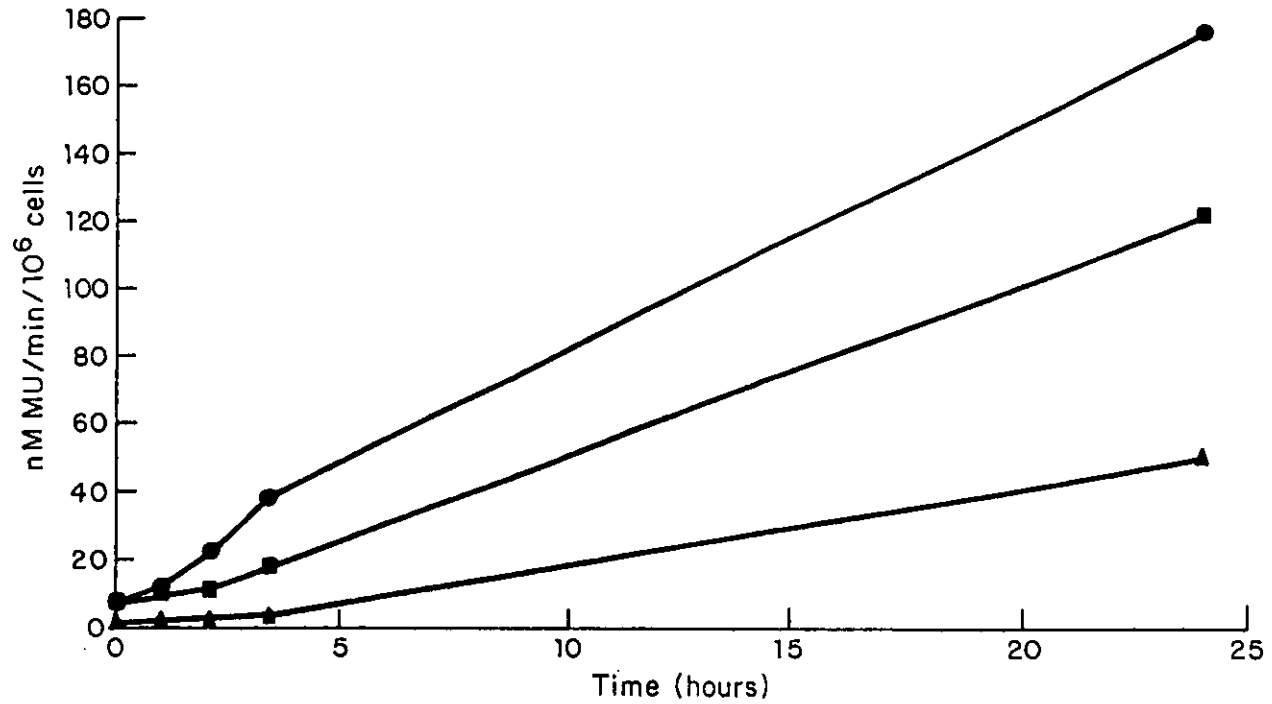


Fig. 5. Actividad de β -glucuronidasa de la CFN299-19 incubada en presencia de plantas de frijol de Negro Xamapa de tres días. Cada línea representa el ensayo de una sola planta.

También se midió la actividad de β -glucuronidasa en la cepa CFN299-19 en el exudado en presencia de la planta. En este caso se observó un constante aumento de la actividad (Fig. 5), lo que puede indicar que cuando la bacteria utiliza el compuesto del exterior de la planta (disminuyendo su concentración), ésta sigue secretando más. Se sabe que en el caso de que la concentración de un compuesto en la rizósfera disminuya, su exudación por la planta aumenta (Smucker y Safir, 1986). De ahí se deduce que para obtener mayor cantidad del compuesto inductor se podría cambiar la solución nutritiva de las plantas, tal vez cada 24 hrs.

Se requiere obtener la mayor cantidad posible del compuesto del exudado de frijol para poder purificarlo e identificar el inductor de los genes *teu*. Hasta el momento se ha purificado mediante cromatografía de HPLC. Primero se identificó que la fase polar era la que tenía el compuesto inductor. Esta se pasó primero por una columna C18 para separar flavonoides y después por la columna Ultrahydrogel 120 para separar por peso molecular. Con la primera se confirmó que el compuesto inductor no era un flavonoide y que la trigonelina tenía cierto efecto inductor (Fig. 6 y 7 del artículo). Con la segunda se encontró que el compuesto tenía un peso molecular entre 150 y 350 (Fig. 6). Para esta última columna no se incluyó como control un compuesto de mayor peso molecular, como un trisacárido ya que no disponíamos de éste, lo cual habría ayudado a evaluar con mayor precisión el peso del compuesto.

Además de cambiar la solución nutritiva, otras condiciones que pueden contribuir para incrementar la cantidad del compuesto exudado por las plantas son las siguientes:

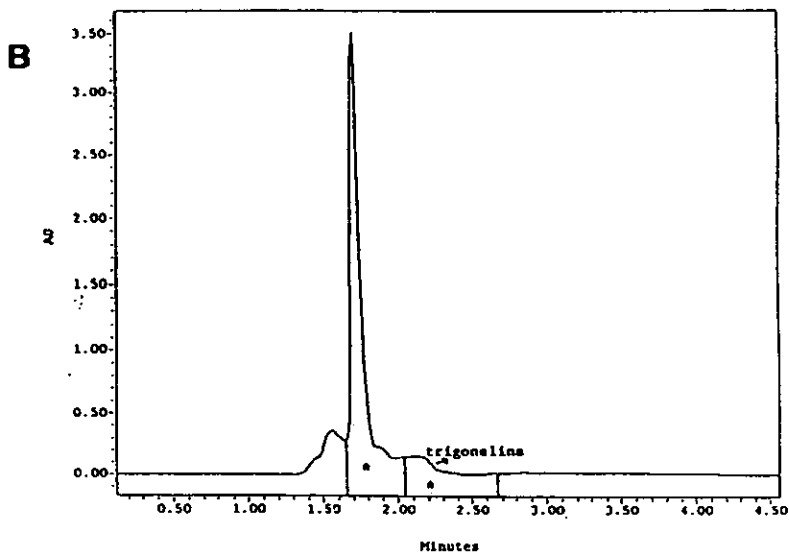
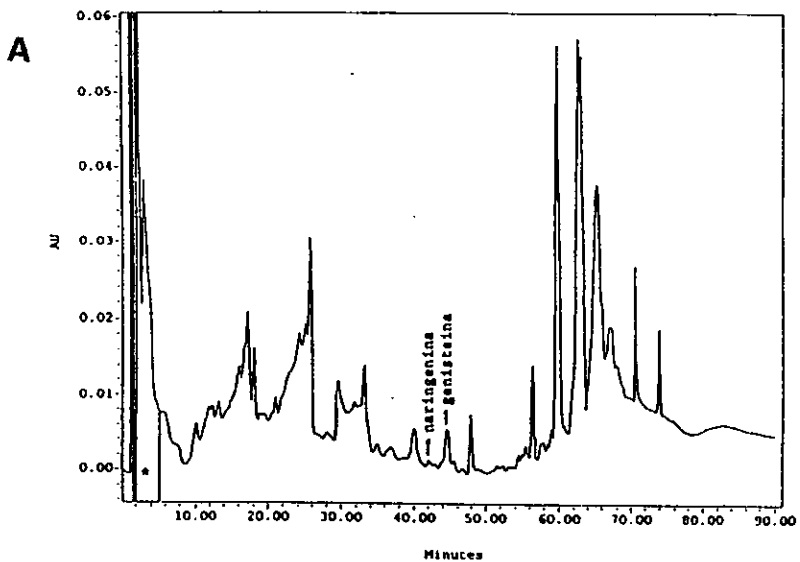
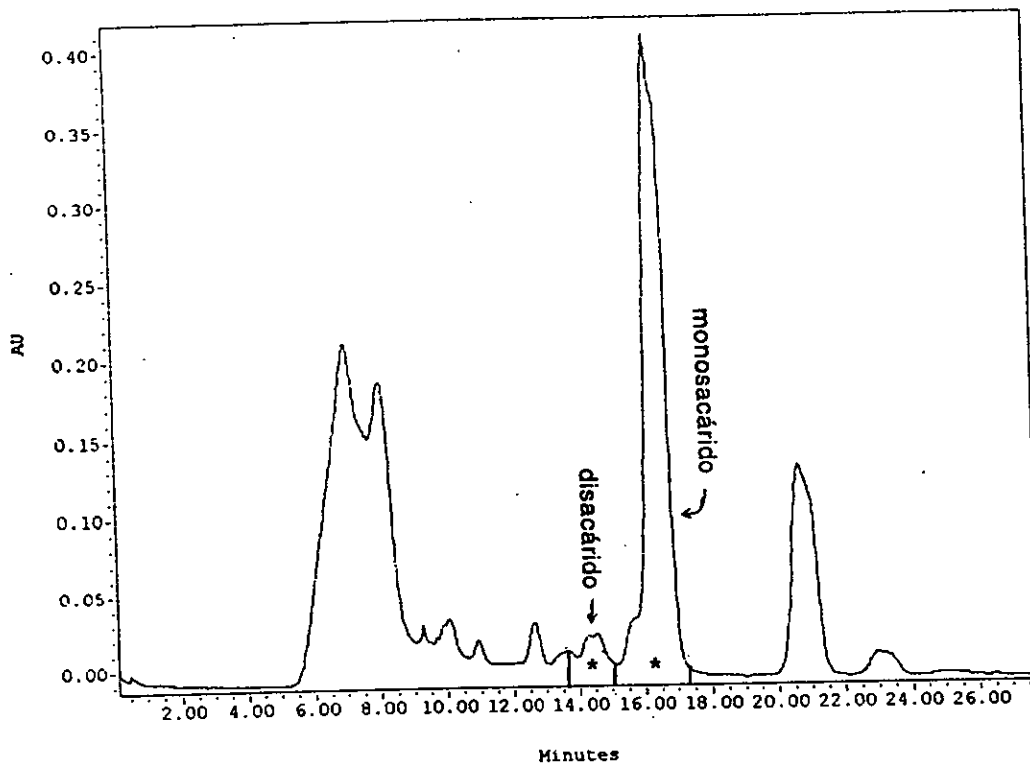


Fig. 6. Patrones de cromatografía de HPLC (High-pressure liquid chromatography) en columnas C-18 de la fracción polar (obtenida con cartuchos Sep-Pak C18 de Waters) del exudado de la raíz de *Phaseolus vulgaris*. Eje Y: Unidades de absorción. Eje X: Tiempo de retención en minutos. * fracciones que promueven la actividad de β -glucuronidasa en la mutante CFN299-19. (A) Se muestran los picos que corresponden a la naringenina y a la genisteína. (B) Cromatograma de la fracción aislada con actividad de β -glucuronidasa obtenida en (A). Se muestra el pico que corresponde a la trigonelina.



(C) Utilizando la columna Ultrahydrogel 120. Se muestran los picos que corresponden a un monosacárido y a un disacárido (usando arabinosa y sacarosa como controles).

-Inocular a la planta con microorganismos que no puedan catabolizar el compuesto. La presencia en la rizósfera de algunos microorganismos provoca una mayor exudación, no sólo porque se remueven algunos compuestos al catabolizarlos, sino también porque pueden lisar células de la raíz, producir hormonas y antibióticos que afectan la permeabilidad de la membrana, e inducir la síntesis de diversos compuestos (Hale y Moore, 1979; Phillips et al., 1992).

-Obtener los exudados en el estadio de plántula, después de que han emergido las raíces laterales. En varias leguminosas se ha observado que se favorece el crecimiento de su propia bacteria noduladora durante los primeros 10-12 días después de la germinación (Tschailachjan y Megrabjan, 1958, citado en van Egeraat, 1975). Además los exudados solubles en agua (como azúcares, aminoácidos, flavonoides, ácidos orgánicos, hormonas y vitaminas) que no requieren de energía metabólica para ser liberados por la raíz, se exudan de la zona meristemática inmediatamente arriba de la cofia y por las raíces laterales jóvenes sin pelos absorbentes (Curl y Truelove, 1986 y Peters y Long, 1988).

-Usar una solución nutritiva con diferentes concentración de nutrientes. Se ha reportado que la limitación de hierro y fósforo en el medio de cultivo de plantas provoca una mayor exudación de azúcares.

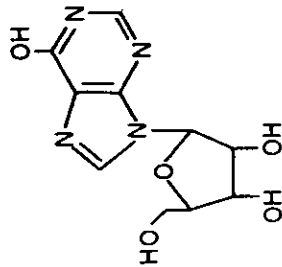
-Obtener exudado de diferentes cultivares de frijol. Existen tres razas de frijol originadas en México clasificadas como: Durango, Jalisco y Mesoamérica (Singh et al., 1991). Hasta el momento sólo se han probado exudados de frijoles mesoamericanos. Podría ser que el compuesto inductor se encuentre en mayor cantidad en algún frijol de otra raza.

De 114 compuestos analizados 10 indujeron un poco la transcripción de los genes *teu* (Fig. 6 del artículo). La estructura química de estos compuestos son

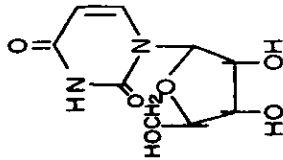
poco similares entre sí (Fig. 7). Tal vez algunos de ellos dieron inducción por ser similares a la trigonelina (que sí induce a los genes *teu*) en que tienen un grupo amino y que son cíclicos. Es importante advertir que algunos tienen un papel biológico en la planta: La glucosamina y la *N*-acetil-D-glucosamina son parte de la estructura del factor de nodulación producido por la bacteria (Dénarié et al., 1996). La ciclodextrina aumenta el número de nódulos de trébol cuando se inocula con *R. leguminosarum* bv trifolii (Abe et al., 1982); tal vez esto se deba a que las α -ciclodextrinas tienen la capacidad de quelar compuestos de defensa resultando en una protección de la bacteria contra reacciones de defensa de la planta (Gray et al., 1992). La uridina, compuesto encontrado en el estele de raíz de chícharo, induce la división de células corticales (Smit et al., 1995). La trigonelina en la misma concentración en que induce la expresión de los genes *teu* (1mM) es un inductor de *nodD2* en *R. meliloti* (Phillips et al., 1992). Se ha visto que los genes del catabolismo de la trigonelina se encuentran inducidos en todos los pasos simbióticos, lo que sugiere que la trigonelina es una fuente de energía durante todo el proceso de asociación (Boivin et al., 1991). Si en los nódulos de frijol también hubiera esa concentración de trigonelina, tal vez se vería cierta inducción en los bacteroides, sin embargo no fue así.

Además del pRtrCFN299a, el pSim de la CFN299 también tiene la información genética necesaria para utilizar el compuesto inductor de los genes *teu*, ya que la cepa Apc (*Agrobacterium tumefaciens* GMI9023 con el pRtrCFN299c (pSim)) también lo remueve del exudado (Fig. 5 del artículo). Un amplicón de este plásmido (AMPRtrCFN299pc60) de 60 kb, que abarca los genes *nodD1*, *nodABCSU*, *nodJ*, *nodHPQ*, *nifA*, *fixABC*, *nodD2*, *fixLJ* (Mavingui et al., 1998) en la

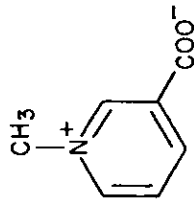
Inosina



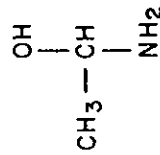
Uridina



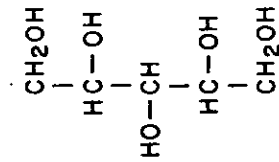
Trigonelina



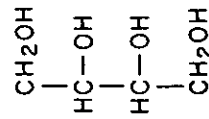
2-Aminoetanol



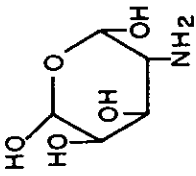
Xilitol



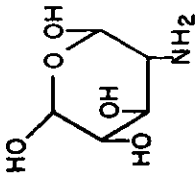
Eritritol



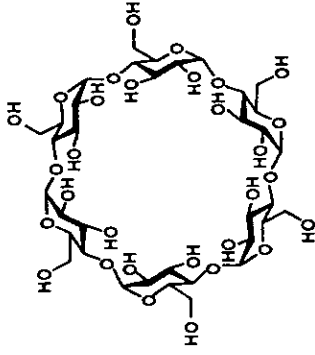
Galactosamina



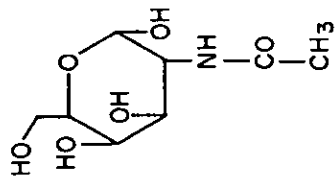
Glucosamina



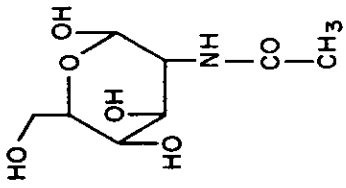
α -Ciclodextrina



N-acetil galactosamina



N-acetil glucosamina



GMI9023 y en *E. coli* DH5 α no fue capaz de utilizar el compuesto (no se muestra). Esto pudiera ser porque los genes necesarios para utilizarlo al menos no están completos en esa región.

R. etli (CFN42) no tiene aparentemente una homología estructural a los genes *teu* de *R. tropici* al hibridizar el DNA total de esta cepa con pMR19, clona que incluye los genes *teuA* y *teuC1* (Fig. 1B), sin embargo es capaz de transportar y catabolizar el compuesto inductor del exudado. La región involucrada en estas funciones se encuentra en el plásmido simbiótico (pSim), ya que la cepa CFN42 curada de éste (CFNX89) no puede usar el compuesto (Fig. 5 del artículo). Estamos interesados en identificar esta región usando un grupo de 16 cósmidos que abarcan todo el pSim de la CFN42 (Girard et al., 1991). Pudiera ser que así como los genes del transporte y catabolismo de *R. tropici* son funcionales en *E. coli* DH5 α (Fig. 5 del artículo), también los de *R. etli* lo sean. Esto facilitaría mucho el trabajo de clonación y complementación. En otro trabajo se había observado que al transferir el pRtrCFN299a a la CFN42, no se incrementaba la nodulación del frijol (Martínez-Romero y Rosenblueth, 1990, ver apéndice V). Una explicación a esto, podría ser que como la CFN42 ya puede utilizar este compuesto, no significa una ventaja el adquirir genes con la misma función.

En las bacterias que nodulan frijol existen dos vías del transporte del compuesto de acuerdo a los resultados. Una vía cuya información genética se encuentra en el pRtrCFN299a que es la misma del pRtrCIAT899a, y otra cuya información está en el pRetCFN42d (pSim) que podría ser la misma del pRtrCFN299c (pSim). El hecho de que se hayan generado dos vías alternas en estas bacterias puede significar que esta función es una ventaja competitiva real

en la rizósfera del frijol. Con esta información se puede especular que el pRtrCFN299a (homólogo al pRtrCIAT899a) existía desde antes que se separaran los linajes de *R. tropici* tipo A y B; en cambio los genes para utilizar este compuesto que están en el pSim de la CFN299, fueron adquiridos en forma horizontal. Esto se sugiere debido al razonamiento de que si el tener dos formas alternas de transporte en lugar de una es mejor para la bacteria, le hubiera sido más rápido a ésta obtener una duplicación de los genes *teu* que generan una vía alterna.

En otros trabajos se ha discutido la semejanza entre los plásmidos simbióticos de los dos tipos de *R. tropici* descritos, que incluye la identidad de los patrones de restricción de los genes *nifH* (Martínez et al., 1991), del gene plasmídico de citrato sintasa (Pardo et al., 1994), la identidad de la secuencia de los genes *nodHPQ* (Laeremans et al., 1996; Folch-Mallol et al., 1996) la semejanza en los factores de nodulación producidos por cepas de los dos tipos (Poupot et al., 1993). Como diferencias se ha encontrado que el flavonoide genisteína es inductor de la producción de los factores de nodulación en cepas tipo A pero no en las tipo B (Martínez-Romero, 1996), y aquí se describe que el pSim de *R. tropici* tipo B no lleva genes alternativos de transporte de exudados.

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria muy cercana a *Rhizobium* y produce tumores en distintas plantas. La inducción de los genes de virulencia requiere de acetosiringona y de azúcares (Stachel y Nester, 1986; Dessaux et al., 1992). En *Rhizobium* también pudiera existir una doble señal de la planta (flavonoides y azúcares) para inducir los genes de nodulación. El análisis de los factores de nodulación producidos por la cepa CIAT899-191 en comparación con la CIAT899 en presencia de exudados de frijol sería una manera de evaluar esta posibilidad. En este caso el papel del compuesto exudado sería otro que el de una

fuentes de carbono, que estimulara el crecimiento en la rizósfera. Esto también explicaría la disminución en nodulación observada con la mutante CIAT899-191. Anteriormente ya se había observado que la CFN299-19 no tenía diferencias en el factor de nodulación usando genisteína como inductor, pero esta cepa tiene un sistema alternativo de transporte del compuesto.

Las proteínas periplásmicas de unión a azúcares juegan un papel en quimiotaxis en *E. coli*, *Salmonella*, *Azospirillum* y *Agrobacterium* y también podría ser el caso de *Rhizobium*. La homoserina, el aminoácido más abundante en chícharo, es un quimioatrayente de *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Armitage et al., 1988). Todavía falta estudiar si las mutantes en los genes *teu* están afectadas en quimiotaxis. Esto se podrá hacer una vez que se haya identificado el compuesto inductor, ya que en la mutante CIAT899-191 no se ha observado ninguna alteración en la quimiotaxis hacia el exudado de raíz en un ensayo con agar suave (no mostrado). Las mutantes no son auxótrofas a los compuestos probados, lo cual puede indicar que el compuesto inductor, transportado por las proteínas *Teu*, no es ninguno de los probados hasta ahora; pero también podría ser que nunca se vaya a encontrar una auxotrofia y que el principal papel del compuesto inductor no sea de una fuente de carbono, sino tal vez como quimioatrayente para la bacteria o para que ésta reconozca la presencia de la planta en el suelo. O bien que este compuesto tenga un doble papel como fuente de carbono y quimioatrayente o como fuente de carbono y para ayudar de alguna manera en la nodulación. Un ejemplo de este último caso sería el de la trigonelina producida por la planta, que a la vez que es una fuente de carbono y nitrógeno para *R. meliloti* (Boivin et al., 1991), es un inductor de la transcripción de *nodD2* (Phillips et al., 1992).

La identificación de este compuesto y la descripción de su papel en la interacción con frijol que aquí se reporta, constituirán una contribución valiosa en el conocimiento de la simbiosis de frijol.

APENDICE I. Detección de la actividad de β -glucuronidasa con X-Gluc.

El método para hacer el ensayo es el siguiente (basado en Jefferson, 1987):

- 1.- Se crece la bacteria 24 hrs en medio mínimo (MM) (ver p. 9 del artículo).
- 2.- Se prepara un medio 1:1 (MM: exudado de raíz de frijol). Se inocula con el cultivo crecido de manera que quede a una D.O de 0.1 (a 600 nm). Se crece con agitación toda la noche.
- 3.- Se centrifugan 50 μ l del cultivo en microcentrífuga Eppendorf 2 min a 12000 rpm/min y se resuspende la pastilla en 50 μ l de NaHPO₄ pH 7.0 con X-Gluc. La reacción se incuba toda la noche a 37°C. Para hacer una solución concentrada 100X de X-Gluc, se toman 5 mg en 50 μ l de N,N-dimetil formamida. El color azul es característico de la hidrólisis de X-Gluc por β -glucuronidasa (GUS).

APENDICE II. Detección de la actividad de β -glucuronidasa con 4-MUG.

Los ensayos con MUG se realizaron con la cepa CFN299-19 que tiene insertado el Tn5-*gusA1* en el gene *teuC1*. El ensayo se hizo de la siguiente forma (basado en Gallagher, 1992 y Jefferson, 1987):

- 1.- Se crece la bacteria toda la noche en MM.
- 2.- Se reinocula en el mismo medio diluyendo el cultivo y se crece hasta que tenga una D.O. de 0.4 (a 600 nm).
- 3.- Se utiliza este cultivo para inocular el exudado o MM con el inductor (una fuente de carbono en este caso), en una proporción 1:1, de modo que la D.O. del cultivo será de 0.2.
- 4.- Se incuba con agitación durante 3 hrs. En este caso se probó hacerlo también a 5 y 20 hrs, pero se observó que con exudados, la CFN299-19 tenía una mayor actividad de β -glucuronidasa (GUS) a las 3 hrs.
- 5.- Cuando la incubación es mayor de tres horas se ajusta a una misma D.O. para hacer el ensayo. Si no, de todas formas se mide la D.O., que en general no varía mucho entre un tratamiento y otro. Si no se tiene una equivalencia del número de células al que corresponde la D.O., será necesario hacer diluciones y plateos para hacer un conteo posterior.
- 6.- Se toman 100 μ l del cultivo y se lisan con 100 μ l del buffer de extracción GUS 2X. Se pueden guardar las células a 4°C tapadas durante unos días sin pérdida significativa de la actividad de GUS.
- 7.- Se precalientan las células a 37°C, y se añaden 100 μ l de MUG 3 mM en buffer de extracción, también precalentado. La concentración final de 4-MUG será de 1mM. Se incuban 20 min a 37°C. En este caso, el tiempo puede alargarse hasta

60 min, ya que la reacción sigue siendo lineal durante este tiempo.

8.- Para parar la reacción, se toman 50 μl de ésta en 450 μl de Na_2CO_3 0.2 M. Se puede guardar la reacción tapada a 4°C, durante unos días, sin pérdida significativa de la actividad de GUS.

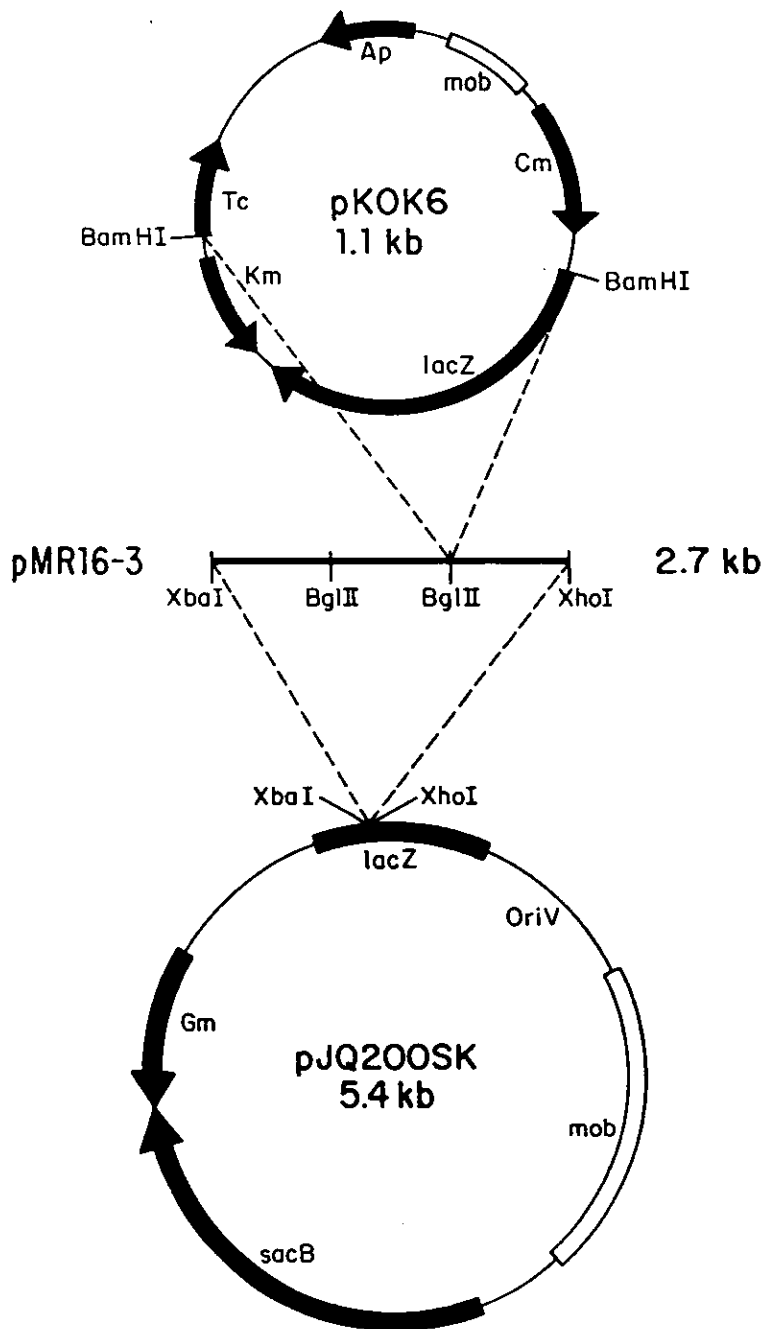
9.- El fluorocromo 4-metilumbeliferona (MU) producto de la hidrólisis de 4-MUG por GUS se mide usando un fluorómetro ($\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$). Para ajustarlo ver Gallagher (1992). Se reporta en nM MU/min/ 10^6 células.

APENDICE III. Construcción de mutantes *lacZ*.

Para obtener las mutantes *lacZ* de la CFN299 y de la CIAT899 se hizo lo siguiente (ver figura p. 39):

- 1.- Se clonó el plásmido pMR16-3 (Fig. 1 del artículo) en el vector suicida pJQ200SK (Quandt y Hynes, 1993), generando la clona pMRJQ16-3.
- 2.- Se clonó el cassette Km-*lacZ* (pKOK6, Kokotek y Lotz, 1989) en el DNA del inserto de pMRJQ16-3.
 - a). Se hicieron digestiones parciales del DNA de pMRJQ16-3 con *Bgl*III, desfosfatando posteriormente.
 - b). Se digirió el DNA de pKOK6 con *Bam*HI.
 - c). Una vez ligado el DNA de pMRJQ16-3 y de pKOK6, se transformó en *E. coli* S17-1, se seleccionó en LB Km₃₀ Gm₃₀ checando que fueran Ap₁₀₀^S.
 - d). Se dedujo la localización y la orientación digiriendo el DNA de las clonas con *Eco*RI-*Hind*III.
- 3.- Se obtuvieron recombinantes sencillas al conjugar la CFN299 y CIAT899 con pJQMR16-3::*lacZ* por inserción. Se seleccionaron la CFN299 en PY Nal₁₀ Km₂₅, y la CIAT899 en PY Nal₂₀ Km₄₀.
- 4.- Se obtuvo la inserción *lacZ* seleccionando en PY Sacarosa (12.5%) Km en las mismas concentraciones, checando que fueran Gm₃₀^S, para seleccionar positivamente aquellas que hubieran perdido el vector, obteniéndose así las mutantes CFN299-191 y CIAT899-191. Se checó la localización hibridizando el DNA total de las mutantes digerido con *Eco*RI-*Hind*III con las sondas *lacZ* y el inserto de pMR16-3.

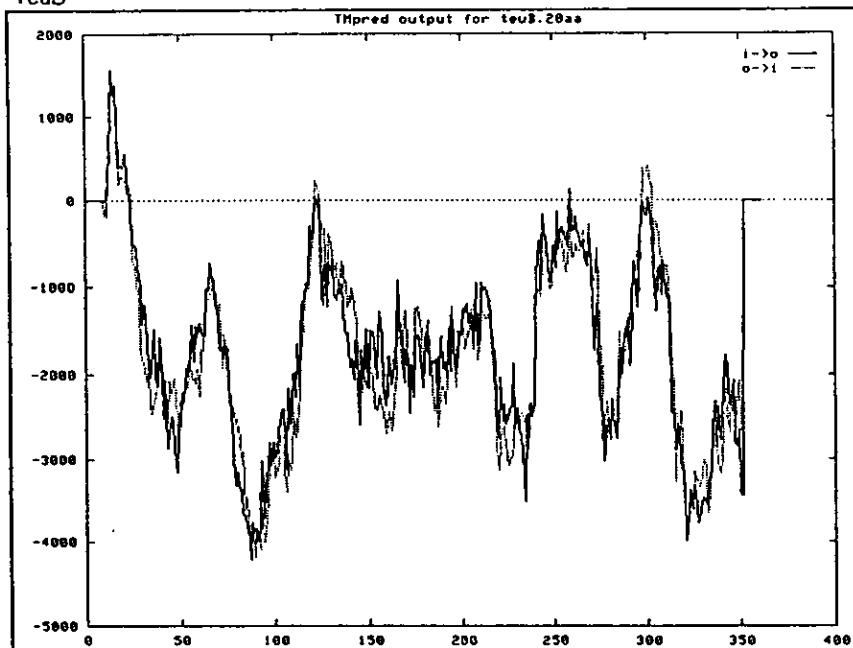
Abreviaturas: Km = kanamicina, Nal = ácido nalidíxico, Ap = ampicilina, Gm = gentamicina, Cm = cloramfenicol, S = sensible, el número de los subíndice de los antibióticos = concentración en mg/l.



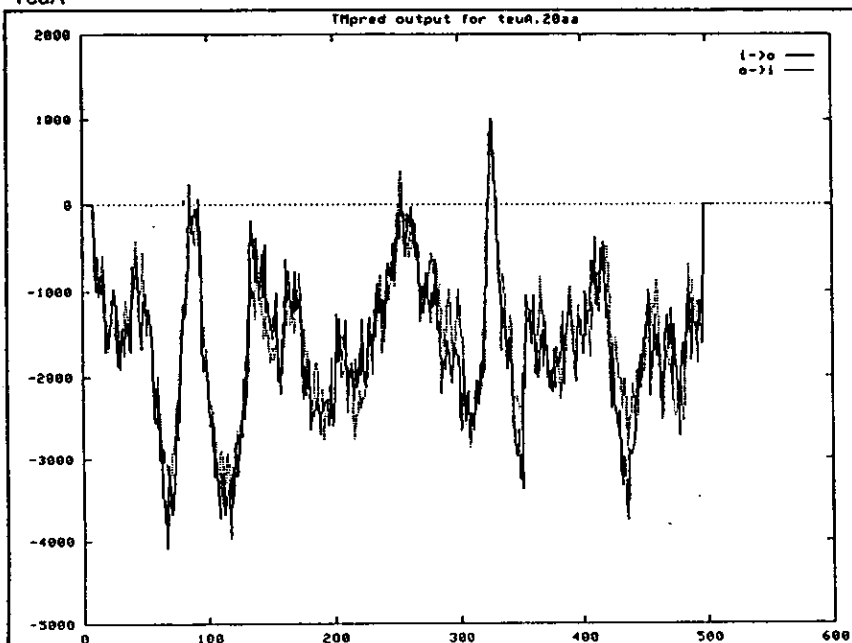
Mapa estructural y físico de pKOK6, pMR16-3 y pJQ200SK. Se señalan los sitios de restricción usados para clonar.

APENDICE IV. Perfiles de hidrofobicidad, con una ventana de 20 aminoácidos de las proteínas deducidas TeuB, TeuA, TeuC1, TeuC2, XylB1 y XylB2. Eje Y: Índice de hidrofobicidad. Eje X: Número de aminoácidos. Programa TMpred (Hofmann y Stoffel, 1993).

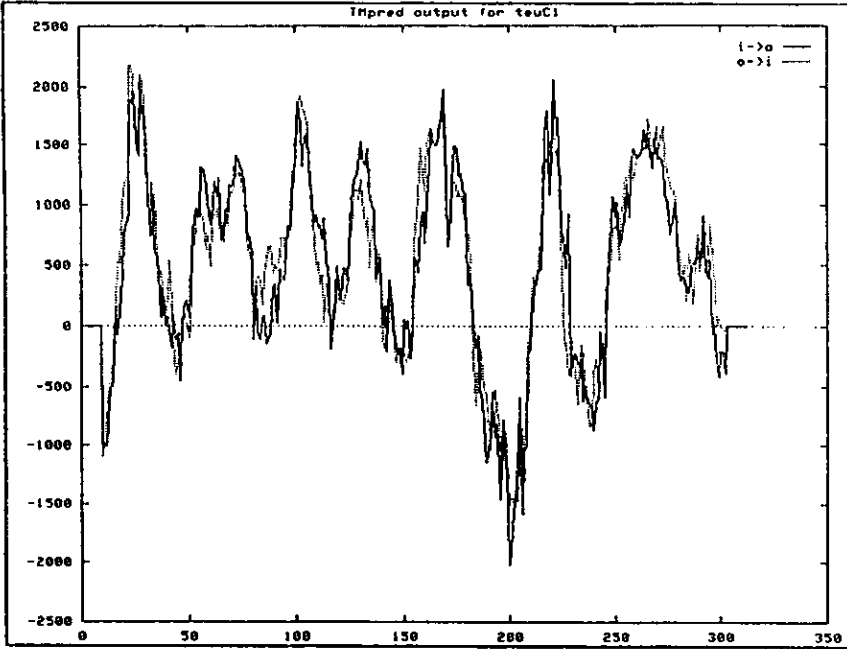
TeuB



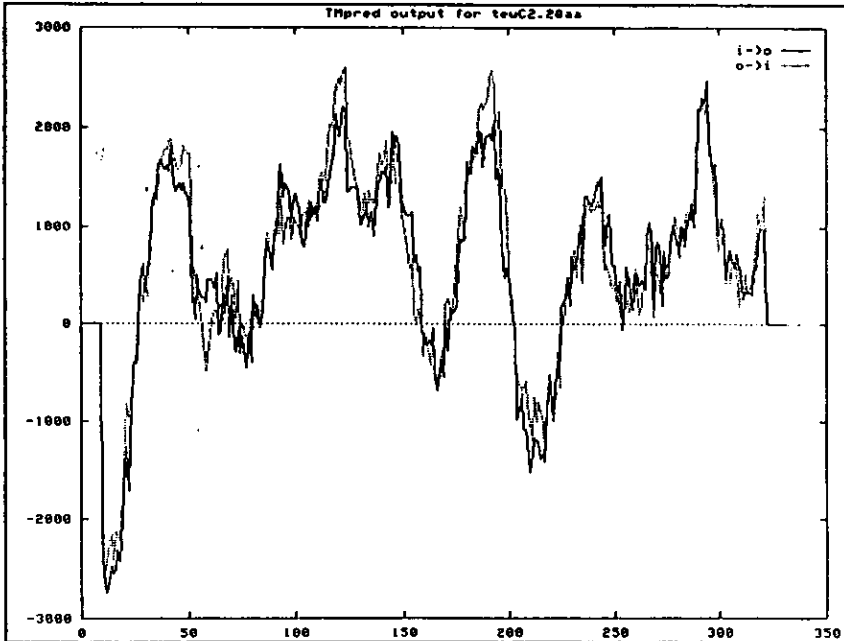
TeuA



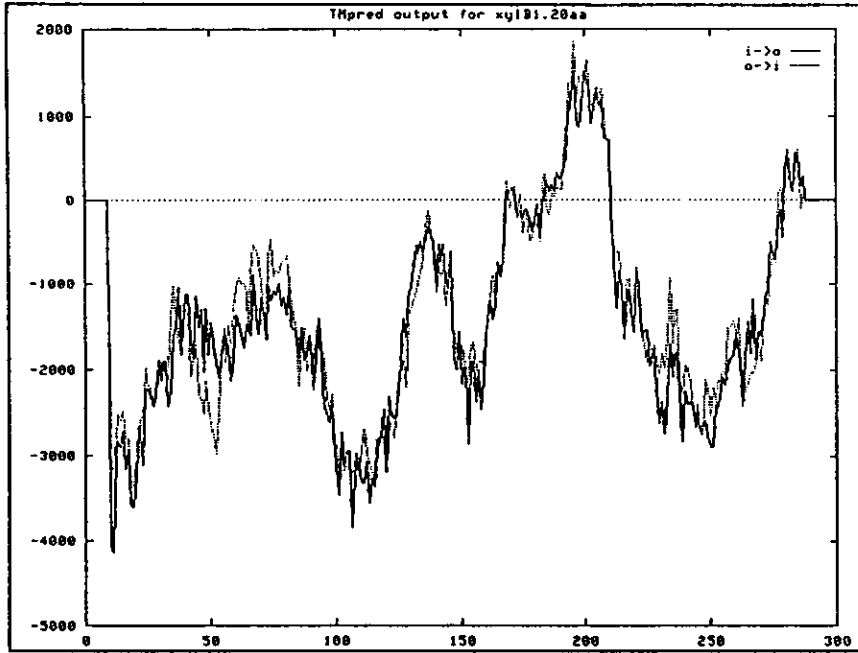
TeuC1



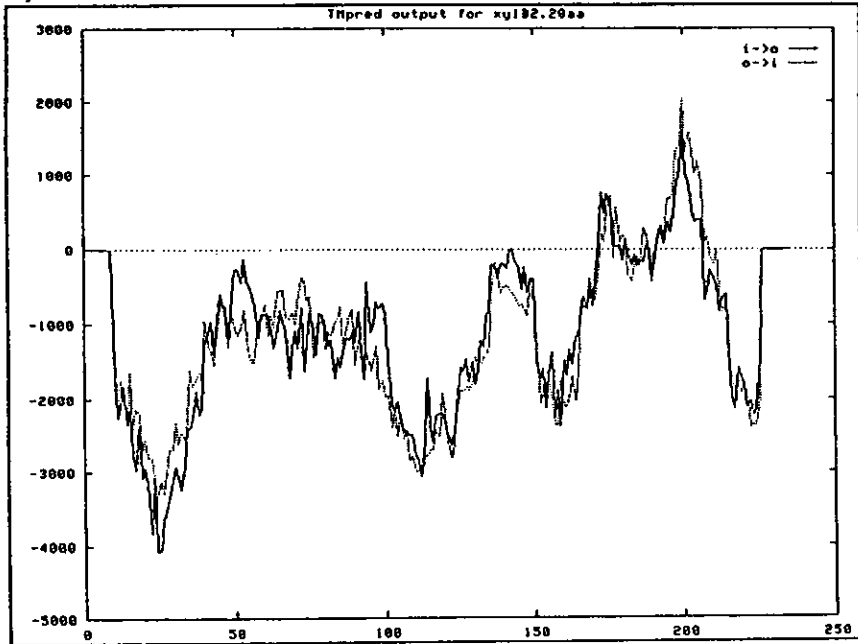
TeuC2



XyIB1



XyIB2



Increased Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Nodulation Competitiveness of Genetically Modified *Rhizobium* Strains

ESPERANZA MARTINEZ-ROMERO* AND MONICA ROSENBLUETH

Departamento de Genética Molecular, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. P. 565-A, Cuernavaca, Morelos, Mexico

Received 29 September 1989/Accepted 9 May 1990

Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli strain collections harbor heterogeneous groups of bacteria in which two main types of strains may be distinguished, differing both in the symbiotic plasmid and in the chromosome. We have analyzed under laboratory conditions the competitive abilities of the different types of *Rhizobium* strains capable of nodulating *Phaseolus vulgaris* L. bean. *R. leguminosarum* bv. phaseoli type I strains (characterized by *nif* gene reiterations and a narrow host range) are more competitive than type II strains (that have a broad host range), and both types are more competitive than the promiscuous rhizobia isolated from other tropical legumes able to nodulate beans. Type I strains become even more competitive by the transfer of a non-Sym, 225-kilobase plasmid from type II strain CFN299. This plasmid has been previously shown to enhance the nodulation and nitrogen fixation capabilities of *Agrobacterium tumefaciens* transconjugants carrying the Sym plasmid of strain CFN299. Other type I *R. leguminosarum* bv. phaseoli transconjugants carrying two symbiotic plasmids (type I and type II) have been constructed. These strains have a diminished competitive ability. The increase of competitiveness obtained in some transconjugants seems to be a transient property.

Field inoculation with *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* spp. may increase the yield of host legumes as a result of nodule formation in plant roots. In the nodules, the bacteria fix atmospheric nitrogen and export ammonium to the host legume, thus providing part of the nitrogen the plant requires.

Among other factors, field legume inoculation with *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* spp. is mainly restricted by the presence in the soil of native strains capable of nodulating the host legumes (10, 27, 34). This is particularly evident in the sites of origin of host legumes, where specific rhizobia are abundant, e.g., *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli in Mexican soils (1). Failure to introduce *Rhizobium* strains may be overcome by the introduction of highly competitive strains or by using very high rates of application of inoculated strains (2, 22, 23). The latter is not economically feasible. The traditional method for obtaining *Rhizobium* strains with improved properties has been the selection of naturally occurring field isolates that best exhibit the trait desired. An alternative approach is to construct improved *Rhizobium* strains by genetic transfer of symbiotically favorable determinants.

Plasmid transfer may increase nodulation or nitrogen fixation in *R. leguminosarum* bv. vicine strains (7), and there is one report of a plasmid loss that improves symbiotic properties in *Rhizobium loti* (28). In *Rhizobium meliloti*, a nonsymbiotic plasmid enhances nodulation of the strains harboring it. This plasmid may be related to a modification of exopolysaccharides and confers sensitivity to some phages (36). Succinate-sensitive strains of *Rhizobium* spp. demonstrate increased symbiotic properties and increased competitiveness for nodulation (39).

The analysis of *Rhizobium* isolates from *Phaseolus vulgaris* nodules revealed two distinct types of strains (24, 26). The genetic relatedness of both types of strains has been established (3, 29). *R. leguminosarum* bv. phaseoli type I

strains have multiple copies of the nitrogenase structural genes (26, 30), produce melanin, and hybridize to the *psi* gene originally described in *R. leguminosarum* bv. phaseoli (5). Type II strains have an extended host range for nodulation. They nodulate beans as well as *Leucaena* species (26). In this paper we analyze the competitive abilities of both types of strains originally isolated from bean nodules and present the genetic construction of *R. leguminosarum* bv. phaseoli derivatives that demonstrate enhanced competitiveness for nodule formation.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains. The bacteria used are listed in Table 1. Transconjugant strains were obtained as described earlier (25) by matings of donor strains (Tn5-*mob* derivatives) (35) in a 1:1 ratio with recipients with or without the helper strain HB101(pRK2013) (15). The transconjugants were selected for their resistance to neomycin (60 or 80 µg/ml) and purified as single colony isolates.

Nodulation assays. Seeds of *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa or Negro Argel were surface sterilized and germinated on 0.8% (w/vol) agar-water plates. Plant assays were performed at 28°C in 250-ml agar flasks or in vermiculite jars with Fahraeus medium (14). Bacteria for inocula were grown in solid individual PY plates (26) and suspended in 10 mM MgSO₄. Inoculum concentrations were determined by A_{600} and by total bacterial counts by use of a Neubauer microscope counting chamber. Cell numbers were adjusted in suspensions to formulate the mixtures of inoculum strains, and final cell numbers were verified by serially diluting the inocula in 10 mM MgSO₄-0.01% (vol/vol) Tween 40 and plating on PY medium to count CFU. About 10⁷ bacteria were added to each plant rootlet. Nitrogenase activity was measured by the acetylene reduction assay of whole roots (26), and total numbers of nodules were obtained from plants inoculated with individual strains.

Identification of bacteria in competition assays. Surface-sterilized nodules were crushed in PY plates, and single

* Corresponding author.

TABLE 1. Bacterial strains used in this study

Strain	Host plant	Relevant characteristics*	Source or reference ^b
<i>R. leguminosarum</i> bv. phaseoli type I			
CFN42	<i>P. vulgaris</i>	Sm ^r derivative (100 µg/ml)	30
CFN42pb		CFN42(pCFN299b::Tn5-mob)	This study
CFN42pa		CFN42(pCFN299a::Tn5-mob)	
CFN279	<i>P. vulgaris</i>		26
CFN279pb		CFN279(pCFN299b::Tn5-mob)	This study
Viking I	<i>P. vulgaris</i>	Sm ^r derivative (100 µg/ml)	31
Viking Ipb		Viking I(pCFN299b::Tn5-mob)	This study
TAL182	<i>P. vulgaris</i>		B. B. Bohlool
TAL182pb		TAL182(pCFN299b::Tn5-mob)	This study
CFN402	<i>P. vulgaris</i>		This study
CFN42-18		CFN42::Tn5-mob (in chromosome)	S. Brom
<i>R. leguminosarum</i> bv. phaseoli type II			
CFN299	<i>P. vulgaris</i>	Sp ^r (100 µg/ml)	25
CIAT899	<i>P. vulgaris</i>	Rif ^r (100 µg/ml)	40
C-05 I	<i>P. vulgaris</i>		M. Tsai
Car22	<i>P. vulgaris</i>		M. Tsai
CFN2993		Donor strain CFN299, with Tn5-mob in plasmid pb (225-kilobase non-Sym plasmid)	This study
<i>Rhizobium</i> strain			
CFN244	<i>M. gibbosifolium</i>	Nod ⁺ Fix ⁺ in <i>P. vulgaris</i>	26
CFN249	<i>D. leparina</i>	Nod ⁺ Fix ⁺ in <i>P. vulgaris</i>	26
CFN265	<i>L. esculenta</i>	Nod ⁺ Fix ⁺ in <i>P. vulgaris</i>	26
CFN401	<i>C. ternatea</i>	Nod ⁺ Fix ⁺ in <i>P. vulgaris</i>	3

* Sm, Streptomycin; Rif, rifampin; Sp, spectinomycin.

^b Sources: B. B. Bohlool, NITAL Project, Paia, Hawaii; S. Brom, Departamento de Genética Molecular, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Cuernavaca, Morriston, México; M. Tsai, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

colonies were picked and tested for growth in selective media for strain identification as previously described (25).

Statistical analysis. Four replicate jars (two plants per jar) were used per treatment, and these were arranged in a completely randomized design. Twenty randomly selected nodules from each jar were analyzed (10 per plant). In competition experiments, analyses of variance were done to compare the percentage of nodules formed by the original and the derivative strains, using angular transformation of percentage data.

Profiles, purification, and hybridization of plasmids. Plasmid patterns were visualized by the procedure of Eckhardt (13). Plasmid b from type II strain CFN299 was isolated from *Agrobacterium tumefaciens* A2 (25) by the procedure of Hirsch et al. (20). The plasmid was purified by CsCl density gradient centrifugation and was used as a probe for hybridization against blots of plasmid profiles as described previously (16).

RESULTS

Competitive abilities of strains of *Rhizobium* spp. that nodulate *P. vulgaris*. Table 2 shows the percentage of *P. vulgaris* L. bean nodules formed by type I and type II strains inoculated at different ratios. At a 1:1 ratio of inoculation, more than 90% of the nodules in the Negro Jamapa and in the Negro Argel bean cultivars were formed by type I strains. Inocula with greater numbers of organisms of type II strain CFN299 are needed to increase its percent nodule occupancy. The minimal number of organisms in the inoculum required to form one nodule in beans is similar for both types, around 4 to 20 bacteria per plant, as determined by

inoculating serial dilutions of bacteria from both types of strains independently. Nodules appeared on day 4 after inoculation for both types of strains, and there was no significant difference in total number of nodules formed by type I or type II strains when tested independently (data not shown).

There are various *Rhizobium* sp. strains isolated from tropical legumes not closely related to beans that are able to form effective nodules in beans (26). These strains are genetically different from type I and type II isolates (29), and they may be recovered from bean nodules in field cultures (26). We tested the competitive abilities of some of these strains. Strains CFN244, CFN249, CFN401, and CFN265,

TABLE 2. Competition of type I and type II strains for nodule occupancy in *P. vulgaris* L. bean

Ratio inoculated (type I: type II)	Strains in inoculum		Strains occupying nodules (%)			
	Type I	Type II	Type I	Type II	Types I + II	
1:1	CFN42	CFN299	90	10	0	
	CFN42	CIAT899	100	0	0	
	CFN279	CIAT899	97	0	3	
	CFN402	CIAT899	77	10	12	
	Viking I	C-05 I	100	0	0	
	Viking I	Car22	75	0	25	
	Viking I	CFN299	98	2	0	
	Viking I	CIAT899	100	0	0	
	1:5	CFN42	CFN299	62	38	0
		CFN42	CFN299	42	42	16
CFN42		CFN299	2	90	8	

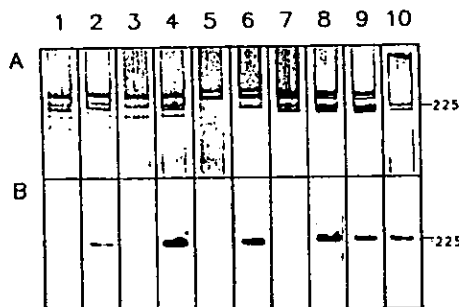


FIG. 1. (A) Plasmid profiles of parental type I and type II *R. leguminosarum* bv. phaseoli strains and transconjugants. Lanes: 1, CFN279; 2, CFN279pb; 3, TAL182; 4, TAL182pb; 5, Viking I; 6, Viking Ipb; 7, CFN42; 8, CFN42pb; 9, CFN42pb (7-month subculture); 10, type II donor strain CFN299. (B) Autoradiogram of the plasmid profiles hybridized with purified plasmid b (225 kilobases) of CFN299. Molecular weight markers are indicated in kilobases.

originally isolated from *Macroptilium gibbosifolium*, *Dalea leporina*, *Clitoria ternatea*, and *Leucaena esculenta*, respectively, did not form any nodules when tested in a 1:1 ratio in competition with any of the type I or type II strains (data not shown).

Nodulation and competitive abilities of type I transconjugant strains. Type I *R. leguminosarum* bv. phaseoli CFN42, Viking I, TAL182, and CFN279 were genetically modified by the transfer of a 225-kilobase plasmid from type II strain CFN299. The frequency of transfer of plasmid b from CFN2993 to type I strains was around 10^{-3} transconjugants per recipient when using *Tn5-mob*. The plasmid patterns of the parental strains and transconjugants are presented in Fig. 1. All transconjugants carried an additional plasmid corresponding to plasmid pb of CFN299.

Sixteen days after inoculation, the average numbers of nodules of 11 plants were 51.9 for parental strains and 72.7 for transconjugant strains (per plant) in flasks. On average, therefore, 40% more nodules were obtained with the transconjugants on *P. vulgaris* both in flasks and in jars. Analysis of variance showed that the difference between the total number of nodules induced by transconjugants and the total

TABLE 3. Competition of transconjugants and parental strains for nodule occupancy in *P. vulgaris* L. bean

Ratio inoculated (parent: transconjugant)	Strains in inoculum		Strains occupying nodules (%)			
	Parent	Transconjugants	Parent	Transconjugants	Both	SE
1:1	CFN42	CFN42pb	18	67	15	$\pm 8.4^*$
	CFN42	CFN42pb*	53	39	8	± 3.5
	CFN279	CFN279pb	26	66	8	$\pm 9.5^*$
	TAL182	TAL182pb	35	60	5	$\pm 4.0^*$
2:1	CFN42	CFN42pb	38	55	7	± 3.7
	Viking I	Viking Ipb	15	70	15	$\pm 3.2^*$

* Transconjugant tested after a 7-month subculture.

^a Significantly more nodules were formed by the transconjugant strain at the 99% confidence level.

^b Significantly more nodules were formed by the transconjugant strain at the 95% confidence level.

TABLE 4. Bean nodule occupancy of strains and transconjugants

Strains in inoculum		Ratio inoculated	% of nodules showing occupancy by:			
Parent-reference	Transconjugant-reference		Parent or transconjugant strain	Reference strain	Both	SE
CFN42-	Viking I	1:1	0	100	0	± 0.0
CFN42-	Viking I	10:1	2	98	0	± 2.7
CFN42-	Viking I	100:1	34	66	0	± 3.3
Viking I-	CFN279pb	1:1	9	91	0	± 1.8
CFN42pb-	Viking I	1:1	17	83	0	± 10.4
Viking Ipb-	CFN279pb	1:1	26	62	12	± 12.5

number induced by parental strains was highly significant ($P \leq 0.01$). The increase in nodulation efficiency may explain the significantly greater percentage of nodules formed by the transconjugants when tested in competition with the original strains in cultivars Negro Jamapa and Negro Argel (Table 3).

In another type of experiment, the parental strain and the modified strain were each tested against a third strain (Table 4). For example, while strain CFN42 did not form any nodules when tested with Viking I in a 1:1 ratio, strain CFN42pb formed approximately 15% of the total number of nodules when tested with Viking I under the same conditions. The ratio of CFN42 to Viking I must be increased 10- to 100-fold for CFN42 to form approximately 10% of the total nodules in the presence of Viking I. Similar results were obtained with Viking I and Viking Ipb against the more competitive strain CFN279pb (Table 4).

Other transconjugants were obtained by the transfer of the symbiotic plasmid from *R. leguminosarum* bv. phaseoli type II strain CFN299 to type I strains CFN42 and Viking I. Nine donor CFN299 derivatives were used, each harboring a different *Tn5-mob* insertion in the symbiotic plasmid. All nine of the different transconjugants with double symbiotic plasmids (CFN42pc) strains had significantly reduced competitive abilities (Table 5). Plasmid a of CFN299 appeared to be more or less neutral in a type I background, since it did not significantly change the competitive ability of the strain harboring it, i.e., CFN42pa. This was also the case with a *Tn5* insertion in the chromosome, indicating that *Tn5* is not responsible for the effects on competition.

TABLE 5. Competition of derivatives and parental strains for nodule occupancy in *P. vulgaris* (bean)

Strains in inoculum ^a		% of nodules showing occupancy by:			
Parent	Derivative	Parent	Derivative	Both	SE
CFN42	CFN42pc ^b	95	4	1	$\pm 1.4^*$
CFN42	CFN42pa	41	59	0	± 3.1
CFN42	CFN42-18	50	40	10	± 10.0
CFN42	CFN42pb	18	67	15	$\pm 8.4^*$

^a Ratio inoculated (parent:derivative), 1:1.

^b Nine different derivatives were tested, each harboring the symbiotic plasmid of CFN299 with different *Tn5-mob* insertions.

^c The derivative strain was significantly different from the parent strain at the 99% confidence level.

Instability of transconjugants. After a 7-month subculture, the genetically modified strain CFN42pb no longer had enhanced competitiveness for nodule formation (Table 3). This instability was not related to the loss of plasmid b since both the resistance to neomycin and the plasmid profile in the transconjugant were maintained (Fig. 1). A new transconjugant was constructed which again had the previously observed advantage for nodule formation (data not shown).

DISCUSSION

A majority (around 90%) of strains isolated from bean nodules in agricultural fields correspond to what we have designated *R. leguminosarum* bv. phaseoli type I strains (24, 26). This greater prevalence may be due to the greater competitive ability of type I strains as compared with type II strains, as reported here. The greater competitive ability of type I over type II strains cannot be explained by a bacteriocinogenic or bacteriostatic effect of type I over type II strains (data not shown).

There is a wide range of competitive abilities among type I strains. Strain CFN42 is a poor competitor, especially against strain Viking I (Table 4). Viking I has been described as a very good competitor in U.S. soils (31), and TAL182 is a good competitor in Hawaiian soils (B. B. Bohlool, personal communication).

The competition of strains for nodulation on beans has been evaluated by de Oliveira and Graham by a different approach which uses a Fix⁻ natural mutant as a reference strain (7a). Of 62 strains, 7 were identified as both superior in competitive ability and in nitrogen-fixing activity (7a). We analyzed five of these seven strains (data not shown) and found that all five correspond to type I strains.

Interstrain competition for nodule formation may not be a permanent or universal characteristic of a strain but rather a result of interactions among biotic (4, 10, 18, 33) and abiotic factors (6, 22, 42) which allow for the selection of particular genotypes (strains) best suited for nodule formation under certain conditions. Thus, inoculants derived from indigenous strains have an advantage over introduced strains (9). A general characteristic of type II isolates is their resistance to acid conditions. *Rhizobium* strains are normally very sensitive to acid conditions (40). In addition, some of the type II strains are able to grow at 37°C. At this temperature, most type I isolates do not grow (data not shown). One may predict that, in acid conditions or at high temperatures, type II strains will have an advantage over type I strains in competition assays.

In another approach, it has been shown that the production of a toxin by *Rhizobium* strains allows them to be highly competitive by inhibiting the growth of other *Rhizobium* strains (37, 38). A nodulation inhibition effect has been observed among *R. leguminosarum* bv. *viciae* strains, and nodulation genes from the inhibiting bacteria seem to be responsible for this phenomenon (11, 12). It is important to identify other genetic markers that can give strains a selective advantage for competition. One of them seems to be plasmid b of strain CFN299.

The biological explanation of how plasmid pb from an inherently less competitive type II strain could improve nodulation competitiveness of a more competitive type I strain must await further research. Type I and type II strains differ greatly both chromosomally and plasmidwise, and they may have different strategies for plant interaction and for nodulation. Whether plasmid b increases the copy num-

ber of any gene(s) involved in the nodulation or differentiation process or whether it alters the regulation or function of those genes or their products in type I strains is at present only a matter of speculation.

In an *A. tumefaciens* plasmidless strain, plasmid b allows transconjugants carrying the symbiotic plasmid of CFN299 to nodulate faster, to form more nodules, and to fix more nitrogen in *P. vulgaris* L. bean. *A. tumefaciens* transconjugants with only the symbiotic plasmid have a 4-day delay for nodulation, form 30% of nodules, and fix around 10% of the nitrogen as compared with the original CFN299 strain. With plasmid b, on the other hand, there is only a 2-day delay before nodulation and transconjugants make 50% of the nodules and fix around 25% of the nitrogen that the original strain does (25). When plasmid b is transferred to type I *R. leguminosarum* bv. phaseoli strains, nodulation efficiency and competitiveness for nodule formation improve. The nitrogen-fixing capacity of the nodules formed by the transconjugants remains unchanged or improves slightly (data not shown).

We have previously shown that type I and type II symbiotic plasmids belong to different incompatibility groups since both plasmids are stably maintained in *A. tumefaciens* (25). *R. leguminosarum* bv. phaseoli type I strains, with two symbiotic plasmids with the same specificity (for bean nodulation), have a diminished competitive ability. Other reports indicate that there may be symbiotic interference in strains with double symbiotic plasmids (8, 19, 21, 32, 41).

Genomic rearrangements have been reported to occur frequently in *R. leguminosarum* bv. phaseoli (17). At present we do not know if such genomic instability could be related to the unstable enhanced competitiveness of transconjugants harboring plasmid pb. This instability may be an advantage from an ecological point of view because it allows further introductions of *Rhizobium* strains into the soil.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Rafael Palacios for encouraging discussions, Lorenzo Segovia for reading the manuscript, P. Graham and M. Tsai for providing strains, A. Vargas and M. Tsai for providing seeds of cultivar Negro Argel, PRONASE (Productora Nacional de Semillas) for providing seeds of cultivar Negro Jamapa, and Alfonso Leija for help with the microscopic count of bacteria.

Partial financial support for this research was provided by grant no. 936-5542.01-523-8.600 from the U.S. Agency for International Development and by grant CIH*0104-MEX(A) from La Communauté Economique Européenne.

LITERATURE CITED

1. Araujo, R. S., J. Maya-Flores, D. Barnes-McConnell, C. Yokoyama, F. B. Dazzo, and F. A. Bliss. 1986. Semienclosed tube cultures of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) for enumeration of *Rhizobium phaseoli* by the most-probable-number technique. Appl. Environ. Microbiol. 52:954-956.
2. Beattie, G. A., and J. Handelsman. 1988. Nodulation competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* in the laboratory, greenhouse, and field, p. 777. In H. Bothe, F. J. de Bruijn, and W. E. Newton (ed.), Nitrogen fixation: hundred years after, Gustav Fischer Verlag, New York.
3. Brom, S., E. Martínez, G. Dávila, and R. Palacios. 1988. Narrow- and broad-host-range symbiotic plasmids of *Rhizobium* spp. strains that nodulate *Phaseolus vulgaris*. Appl. Environ. Microbiol. 54:1280-1283.
4. Fromfield, F. S. P., I. B. Simba, and M. S. Wolynetz. 1986. Influence of location, host cultivar, and inoculation on the composition of naturalized populations of *Rhizobium meliloti* in *Medicago sativa* nodules. Appl. Environ. Microbiol. 51:1077-1084.

5. Borthakur, D., J. A. Downie, A. W. B. Johnston, and J. W. Lamb. 1985. *psl*, a plasmid-linked *Rhizobium phaseoli* gene that inhibits exopolysaccharide production and which is required for symbiotic nitrogen fixation. *Mol. Gen. Genet.* 200:278-282.
6. Caldwell, B. E., and D. F. Weber. 1970. Distribution of *Rhizobium japonicum* serogroups in soybean nodules as affected by planting dates. *Agron. J.* 62:12-14.
7. DeJonj, T. M., N. J. Brewin, A. W. B. Johnston, and D. A. Phillips. 1982. Improvement of symbiotic properties in *Rhizobium leguminosarum* by plasmid transfer. *J. Gen. Microbiol.* 128:1829-1838.
- 7a. de Oliveira, L. A., and P. H. Graham. 1990. Evaluation of strain competitiveness in *Rhizobium leguminosarum* by *phaseoli* using a *Nod⁺ Fix⁺* natural mutant. *Arch. Microbiol.* 153:305-310.
8. Djordjevic, M. A., W. Zarkowski, J. Shine, and B. G. Kofe. 1983. Sym plasmid transfer to various symbiotic mutants of *Rhizobium trifolii*, *R. leguminosarum*, and *R. meliloti*. *J. Bacteriol.* 156:1035-1045.
9. Dowdle, S. F., and B. B. Bohloul. 1987. Intra- and interspecific competition in *Rhizobium fredii* and *Bradyrhizobium japonicum* as indigenous and introduced organisms. *Can. J. Microbiol.* 33:990-995.
10. Dowling, D. N., and W. J. Broughton. 1986. Competition for nodulation of legumes. *Annu. Rev. Microbiol.* 40:131-157.
11. Dowling, D. N., U. Samrey, J. Stanley, and W. J. Broughton. 1987. Cloning of *Rhizobium leguminosarum* genes for competitive nodulation blocking on peas. *J. Bacteriol.* 169:1345-1348.
12. Dowling, D. N., J. Stanley, and W. J. Broughton. 1989. Competitive nodulation blocking of Afghanistan pea is determined by *nodDABC* and *nodFE* alleles in *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Gen. Genet.* 216:170-174.
13. Eckhardt, T. 1978. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* 1:584-588.
14. Fahræus, G. 1957. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J. Gen. Microbiol.* 16:374-381.
15. Figurski, D. H., and D. R. Hellinski. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in *trans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:1648-1652.
16. Flores, M., V. González, S. Brom, E. Martínez, D. Piñero, U. Romero, G. Dávila, and R. Palacios. 1987. Reiterated DNA sequences in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. *J. Bacteriol.* 169:5782-5788.
17. Flores, M., V. González, M. A. Pardo, A. Leija, E. Martínez, U. Romero, D. Piñero, G. Dávila, and R. Palacios. 1988. Genomic instability in *Rhizobium phaseoli*. *J. Bacteriol.* 170:1191-1196.
18. Handelsman, J., and W. J. Brill. 1985. *Erwinia herbicola* isolates from alfalfa plants may play a role in nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:818-821.
19. Harrison, S. P., D. G. Jones, P. H. D. Schunmann, J. W. Forster, and J. P. W. Young. 1988. Variation in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* Sym plasmids and the association with effectiveness of nitrogen fixation. *J. Gen. Microbiol.* 134:2721-2730.
20. Hirsch, P. R., M. Van Montagu, A. W. B. Johnston, N. J. Brewin, and J. Schell. 1980. Physical identification of bacteriocinogenic, nodulation and other plasmids in strains of *R. leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 120:403-412.
21. Johnston, A. W. B., J. L. Beynon, A. V. Buchanan-Wollaston, S. M. Setchell, P. R. Hirsch, and J. E. Beringer. 1978. High frequency transfer of nodulating ability between strains and species of *Rhizobium*. *Nature (London)* 276:634-636.
22. Kamteker, B. J., and W. J. Brill. 1987. Methods to alter the recovery and nodule location of *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strains on field-grown soybeans. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:1737-1742.
23. Kapusta, G., and D. L. Rouwenhorst. 1973. Influence of inoculum size on *Rhizobium japonicum* serogroup distribution frequency in soybean nodules. *Agron. J.* 65:916-919.
24. Martínez, E., M. Flores, S. Brom, D. Romero, G. Dávila, and R. Palacios. 1988. *Rhizobium phaseoli*: a molecular genetics view. *Plant Soil* 108:179-184.
25. Martínez, E., R. Palacios, and F. Sánchez. 1987. Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. *J. Bacteriol.* 169:2828-2834.
26. Martínez, E., M. A. Pardo, R. Palacios, and M. A. Cevallos. 1985. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *J. Gen. Microbiol.* 131:1779-1786.
27. Meawad, H., and B. B. Bohloul. 1984. Competition among *Rhizobium* spp. for nodulation of *Leucaena leucocephala* in two tropical soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:5-9.
28. Pankhurst, C. E., P. E. Macdonald, and J. M. Reeves. 1986. Enhanced nitrogen fixation and competitiveness for nodulation of *Lotus pedunculatus* by a plasmid-cured derivative of *Rhizobium loti*. *J. Gen. Microbiol.* 132:2321-2328.
29. Piñero, D., E. Martínez, and R. K. Selander. 1988. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2825-2832.
30. Quinto, C., H. de la Vega, M. Flores, L. Fernández, T. Ballado, G. Soberón, and R. Palacios. 1982. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli*. *Nature (London)* 299:724-726.
31. Robert, F. M., and E. L. Schmidt. 1983. Population changes and persistence of *Rhizobium phaseoli* in soil and rhizospheres. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:550-556.
32. Sadowsky, M. J., and B. B. Bohloul. 1985. Differential expression of the pea symbiotic plasmid pJBS11 in genetically dissimilar backgrounds. *Symbiosis* 1:125-138.
33. Schippers, B., A. W. Bakker, and P. A. H. M. Bakker. 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annu. Rev. Phytopathol.* 25:339-358.
34. Singleton, P. W., and J. W. Tavares. 1986. Inoculation response of legumes in relation to the number and effectiveness of indigenous rhizobium populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:1013-1018.
35. Simon, R. 1984. High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the *in vitro* constructed *Tn5-mob* transposon. *Mol. Gen. Genet.* 196:413-420.
36. Toro, N., and J. Olivares. 1986. Characterization of a large plasmid of *Rhizobium meliloti* involved in enhancing nodulation. *Mol. Gen. Genet.* 202:331-335.
37. Triplett, E. W. 1988. Isolation of genes involved in nodulation competitiveness from *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* T24. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3810-3814.
38. Triplett, E. W., and T. M. Barta. 1987. Trifoliotoxin production and nodulation are necessary for the expression of superior nodulation competitiveness by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain T24 on clover. *Plant Physiol.* 85:335-342.
39. Urban, J. 1988. Use of succinate-sensitive inoculants increases nodule number and seed yields in legumes. p. 566. In H. Bothe, F. J. de Bruijn, and W. E. Newton (ed.), *Nitrogen fixation: hundred years after Gustav Fischer Verlag*, New York.
40. Vargas, A. A. T., and P. H. Graham. 1988. *Phaseolus vulgaris* cultivar and *Rhizobium* strain variation in acid-pH tolerance and nodulation under acid conditions. *Field Crops Res.* 19:91-101.
41. Wang, C. L., J. E. Beringer, and P. R. Hirsch. 1986. Host plant effects on hybrids of *Rhizobium leguminosarum* biovars *viciae* and *trifolii*. *J. Gen. Microbiol.* 132:2063-2070.
42. Weber, D. F., and V. L. Miller. 1972. Effect of soil temperature on *Rhizobium japonicum* serogroup distribution in soybean nodules. *Agron. J.* 64:796-798.

BIBLIOGRAFIA

- Abe M, Amemura A, Higashi S (1982) Studies on cyclic (1,2)- β -glucan obtained from periplasmic space of *Rhizobium trifolii* cells. *Plant Soil* 64:315-324.
- Amarger N, Macheret V, Laguerre G (1997) *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov. from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Int J Syst Bacteriol* 47:996-1006.
- Armitage JP, Gallagher A, Johnston AWB (1988) Comparison of the chemotactic behavior of *Rhizobium leguminosarum* with and without the nodulation plasmid. *Molecular Microbiology* 2:743-748.
- Bell AW, Buckel SD, Groarke JM, Hope JN, Kingsley DH, Hermodson MA (1986) The nucleotide sequences of the *rbsD*, *rbsA*, and *rbsC* genes of *Escherichia coli* K12. *J Biol Chem* 261:7652-7658.
- Bhagwat AA, Keister DL (1992) Identification and cloning of *Bradyrhizobium japonicum* genes expressed strain selectively in soil and rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* 58:1490-1495.
- Boivin C, Barran LR, Malpica CA, 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.
- Borthakur D, Soedarjo M (1998) *Rhizobium* genes required for mimosine degradation are induced by mimosine and are expressed in the *Leucaena leucocephala* nodules. 16th North American Conference on Symbiotic Nitrogen Fixation, Cancún Quintana Roo, México.
- Curl EA, Truelove B (1986). *The Rhizosphere*. Springer-Verlag (Berlin).
- Chuang S, Daniels DL, Blattner FR (1993) Global regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 175:2026-2036.
- David D, Domergue O, Pognonec P, Kahn D (1987) Transcription patterns of *Rhizobium meliloti* symbiotic plasmid pSym: identification of *nifA*-independent *fix* genes. *J Bacteriol* 169:2239-2244.
- De Maagd RA, Wijffelman CA, Pees E, Lugtenberg BJJ (1988) Detection and subcellular localization of two Sym plasmid-dependent proteins of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *J Bacteriol* 170:4424-4427.
- Dénarié J, Debelle F, Promé JC (1996) *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Ann Rev Biochem* 65:503-535.

Dessaux Y, Petit A, Tempe J (1992) Opines in *Agrobacterium* biology. En Verma D. PS (ed.) Molecular signals in plant-microbe communications. CRC Press, Boca Raton Fla. pp. 109-136.

Djordjevic SP, Chen H, Batley M, Redmond JW, Rolfe BG (1987) Nitrogen fixation ability of exopolysaccharide synthesis mutants of *Rhizobium* sp strain NGR234 and *Rhizobium trifolii* is restored by the addition of homologous exopolysaccharides. J Bacteriol 169:53-60.

Doyle JJ (1995) DNA data and legume phylogeny: a progress report. En: Crisp M and Doyle JJ (Eds.). Advances in Legume Systematics 7: Phylogeny. Royal Botanic Gardens, Kew pp. 11-30.

Ehrmann M, Boyd D, Beckwith J (1990) Genetic analysis of membrane protein topology by a sandwich gene fusion approach. Proc Natl Acad Sci USA 87:7574-7578.

Encarnación S, Mendoza G, Dunn M, Contreras S, Mora J (1998) *Rhizobium etli* in aerobic or fermentative metabolism induced proteins revealed by proteome analysis. 16th North American Conference on Symbiotic Nitrogen Fixation, Cancún, Quintana Roo, México.

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

Folch-Mallol JL, Marroquí S, Sousa C, Manyani H, López-Lara IM, van Der Drift KMG, Haverkamp J, Quinto C, Gil-Serrano A, Thomas-Oates JE, Spaink HP, Megías M (1996) Characterization of *Rhizobium tropici* CIAT899 nodulation factors: the role of *nodH* and *nodPQ* genes in their sulfation. Mol Plant-Microbe Interact 9:151-163.

Froshauer S, Green GN, Boyd D, McGovern K, Beckwith J (1988) Genetic analysis of the membrane insertion and topology of MalF, a cytoplasmic membrane protein of *Escherichia coli*. J Mol Biol 200:501-511.

Gallagher SR (1992) Quantitation of GUS activity by fluorometry. En: Gallagher SR (ed.) GUS Protocols. Using the GUS gene as a reporter of gene expression. Academic Press, San Diego pp 47-59.

Geniaux E, Flores M, Palacios R, Martínez E (1995) Presence of megaplasmids in *Rhizobium tropici* and further evidence of differences between the two *R. tropici* subtypes. Int J Syst Bacteriol 45:392-394.

Girard ML, Flores M, Brom S, Romero D, Palacios R, Dávila G (1991) Structural complexity of the symbiotic plasmid of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli. J. Bacteriol. 173:2411-2419.

- 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. 142:2847-2856.
- Gray JX, de Maagd RA, Rolfe BG, Johnston AWB, Lugtenberg BJJ (1992) The role of the *Rhizobium* cell surface during symbiosis. En: Molecular Signals in Plant-Microbe Communications. Verma DPS (ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida. pp 359-376.
- Guerreiro N, Redmond JW, Rolfe BG, Djordjevic MA (1997) New *Rhizobium leguminosarum* flavonoid-induced proteins revealed by proteome analysis of differentially displayed proteins. Mol Plant-Microbe Interact 10:506-516.
- Hale, MG, LD Moore (1979) Factors affecting root exudation II: 1970-1978. Advances in Agronomy. Academic Press, Inc. 31:93-124.
- Hartwig UA, Joseph CM, Phillips DA (1991) Flavonoids released naturally from alfalfa seeds enhance growth rate of *Rhizobium meliloti*. Plant physiol 95:797-803.
- Hernández-Lucas I, Segovia L, Martínez-Romero E, Pueppke SG (1995) Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. Appl Environ Microbiol 61:2775-2779.
- Higgins ChF (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. Annu Rev Cell Biol 8:67-113.
- Hofmann K, Stoffel W (1993) TMbase - a database of membrane-spanning protein segments. Biol Chem Hoppe-Seyler 347:166.
- 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.
- Hynes MF, O'Connell MP (1990) Host plant effect on competition among strains of *Rhizobium leguminosarum*. Can J Microbiol 36:864-869.
- James P (1997) Breakthroughs and views of genomes and proteomes. Biochem Biophys Res Comm 231:1-6
- Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. Plant Mol Biol Reporter 5:387-405.
- Jordan DC (1984) Family III. *Rhizobiaceae*. En: Bergey's manual of systematic bacteriology. Krieg NR, Holt JG ed. pp 234-242. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.

Koenig R, Gepts P (1989). Allozyme diversity in wild *Phaseolus vulgaris*: further evidence for two major centers of genetic diversity. *Theo Appl Genet* 78:809-817.

Kokotek W, Lotz W (1989) Construction of a *lacZ*-kanamycin-resistance cassette, useful for site-directed mutagenesis and as promoter probe. *Gene* 84:467-471.

Krishnan HB, Pueppke SG (1993) Flavonoid inducers of nodulation genes stimulate *Rhizobium fredii* USDA257 to export proteins into the environment. *Mol Plant-Microbe Interact* 6:107-113.

Laeremans T, Caluwaerts I, Verreth C, Rogel MA, Vanderleyden J, Martínez-Romero E (1996) Isolation and characterization of the *Rhizobium tropici* nod factor sulfation genes. *Mol Plant-Microbe Interact* 9:492-500.

Long S (1997) Molecular/genetic studies of *Rhizobium*-plant signals and responses. 11th International Congress on Nitrogen Fixation, Paris, Francia.

Martínez-Romero, E. (1994) Recent developments in *Rhizobium* taxonomy. *Plant Soil* 161:11-20.

Martínez-Romero E (1996) Comments on *Rhizobium* systematics. Lessons from *R. tropici* and *R. etli*. En: Stacey G, Mullin B, Gresshoff PM (eds.) *Biology of Plant-Microbe Interactions*, St. Paul, MN: International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions, pp. 503-508.

Martínez-Romero E, Caballero-Mellado J (1996) *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. *Crit Rev Plant Sci* 15:113-140.

Martínez E, Flores M, Brom S, Romero D, Dávila G, Palacios R (1988) *Rhizobium phaseoli*: A molecular genetics view. *Plant Soil* 108:179-184.

Martínez E, Palacios R, Sánchez F (1987) Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. *J Bacteriol* 169:2828-2834.

Martínez E, Pardo MA, Palacios R, Cevallos MA (1985) Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *J Gen Microbiol* 131:1779-1786.

Martínez E, Romero D, Palacios R (1990) The *Rhizobium* Genome. *Crit Rev Plant Sci* 9:59-93.

Martínez-Romero E, Segovia L, Martins Mercante F, Franco AA, Graham P, Pardo MA (1991) *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int J Syst Bacteriol* 41:417-426.

Mavingui P, Laeremans T, Flores M, Romero D, Martínez-Romero E, Palacios R (1998) Genes essential for Nod factor production and nodulation are located on a symbiotic amplicon (AMPRtrCFN299pc60). *J Bacteriol* 180:

Milcamps A, Davey ME, Ragatz D, Struffi P, de Bruijn FJ (1998) Environmental control of gene expression in *Rhizobium meliloti*. En: Elmerich C, Kondorosi A, Newton WE (eds.). *Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century*, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. p. 499.

Murphy PJ, Heycke N, Trenz SP, Ratet P, de Bruijn FJ, Schell J (1988) Synthesis of an opine-like compound, a rhizopine, in alfalfa nodules is symbiotically regulated. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:9133-9137.

Murphy PJ, Wexler W, Grzemeski W, Rao JP, Gordon D (1995) Rhizopines - their role in symbiosis and competition. *Soil Biol Biochem* 27:525-529.

Nakai K, Kanehisa M (1991) Expert system for predicting protein localization sites in Gram-negative bacteria. *Proteins* 11:95-110.

Pardo MA, Lagúnez J, Miranda J, Martínez E (1994) Nodulating ability of *Rhizobium tropici* is conditioned by a plasmid-encoded citrate synthase. *Mol Microbiol* 11:315-321.

Peters NK, Long SR (1988) Alfalfa root exudates and compounds which promote or inhibit induction of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Plant Physiol* 88:396-400.

Phillips DA, Joseph CM, Maxwell CA (1992) Trigonelline and stachydrine released from alfalfa seeds activate NodD2 protein in *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol* 99:1526-1531.

Phillips DA, Streit WR, Volpin H, Palumbo JD, Joseph CM, Sande ES, de Bruijn FJ, Kado CI (1996) Plant regulation of bacterial root colonization. En: Stacey G, Mullin B, Gresshoff PM (eds). *Biology of Plant-Microbe Interactions*. Int Soc Mol Plant-Microbe Interac, St Paul, MN pp. 481-486.

Poupot R, Martínez-Romero E, Promé JC (1993) Nodulation factors from *Rhizobium tropici* are sulfated or nonsulfated chitopentasaccharides containing an *N*-methyl-*N*- acylglucosaminyl terminus. *Biochem* 32:10430-10435.

Poupot R, Martínez-Romero E, Gautier N, Promé JC (1995) Wild type *Rhizobium etli*, a bean symbiont, produces acetyl-fucosylated, *N*-methylated, and carbamoylated nodulation factors. *J Biol Chem* 270:6050-6055.

Prinsen E, Chauvaux N, Schmidt J, John M, Wieneke U, Greef JD, Schell J, Van Onckelen H (1991) Stimulation of indole-3-acetic acid production in *Rhizobium* by flavonoids. *FEBS* 282:53-55.

- Quandt J, Hynes MF (1993) Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria. *Gene* 127:15-21.
- Roche P, Debellé F, Maillet F, Lerouge P, Faucher C, Truchet G, Dénarié J, Promé JC (1991) Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti*: *nodH* and *nodPQ* genes encode the sulfation of lipo-oligosaccharide signals. *Cell* 67:1131-1143.
- Rong L, Karcher SJ, O'Neal K, Hawes MC, Yerkes CD, Jayaswal RK, Hallberg CA, Gelvin SB (1990) *picA*, a novel plant-inducible locus on the *Agrobacterium tumefaciens* chromosome. *J Bacteriol* 172:5828-5836.
- Rong L, Karcher SJ, Gelvin SB (1991) Genetic and molecular analyses of *picA*, a plant-inducible locus on the *Agrobacterium tumefaciens* chromosome. *J Bacteriol* 173:5110-5120.
- Sadowsky MJ, Olson ER, Foster VE, Kosslak RM, Verma DPS (1988) Two host-inducible genes of *Rhizobium fredii* and characterization of the inducing compound. *J Bacteriol* 170:171-178.
- Schultze M, Kondorosi A (1996) The role of Nod signal structures in the determination of host specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *World J Microbiol Biotechnol* 12:137-149.
- Scott-Craig JS, Guerinot ML, Chelm BK (1991) Isolation of *Bradyrhizobium japonicum* DNA sequences that are transcribed at high levels in bacteroids. *Mol Gen Genet* 228:356-360.
- Segovia L, Young JPW, 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.
- Sharma SB, Signer ER (1990) Temporal and spatial regulation of the symbiotic genes of *Rhizobium meliloti* in plant revealed by transposon Tn5-*gusA*. *Genes Develop* 4:344-356.
- Singh SP, Gepts P, Debouck DG (1991) Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, fabaceae). En: *Economic Botany* 45:379-396. The New York Botanical Garden, Bronx, NY.
- Smit G, Koster CC, Schripsema J, Spaik HP, van Brussel AA (1995) Uridine, a cell division factor in pea roots. *Plant Mol Biol* 29:869-873.
- Smucker AJM, Safir GR (1986) Root and soil microbial interactions which influence the availability of photoassimilate carbon to the rhizosphere. En: Mitchell MJ, Nakas JP (eds.) *Microbial and Faunal Interactions in Natural and Agroecosystems, Developments in Biogeochemistry*. Martinus Nijhoff/Dr. Junk Publ. Podrecht. pp. 203-204.

- 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.
- Stachel SE, Nester EW (1986) The genetic and transcriptional organization of the *vir* region of the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO J* 5:1445-1454.
- Streit WR, Phillips D (1997) A biotin-regulated locus *bioS*, in a possible survival operon of *Rhizobium meliloti*. *Mol Plant-Microbe Interact* 10:933-937.
- Tschailachjan MCh, Megrabjan AA (1958) Einfluss der Wurzelausscheidungen von Leguminosen auf das Wachstum der Knöllchenbakterien. *Nach Akad Wiss ArmenSSR. Biol. Landwirtschaft. Wiss* 11:3-11.
- Van Bastelaere E (1996) Isolation and characterization of plant-inducible genes in *Azospirillum brasilense* Sp7. (Tesis de Doctorado). Universidad Católica de Leuven, Bélgica.
- Van Bastelaere E, De Mot R, Michiels K, Vanderleyden J (1993) Differential gene expression in *Azospirillum* spp. by plant root exudates: analysis of protein profiles by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *FEMS Microbiol* 112:335-342.
- Van Egeraat AWSM (1975) The possible role of homoserine in the development of *Rhizobium leguminosarum* in the rhizosphere of pea seedlings. *Plant Soil* 42:381-386.
- Van Rhijn P, Desair J, Vlassak K, Vanderleyden J (1994) Functional analysis of *nodD* genes of *Rhizobium tropici* CIAT899. *Mol Plant-Microbe Interact*. 7:666-677.
- Vincent JM (1970) A manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBP Handbook 15. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Wilson KJ, Sessitsch A, Corbo JC, Giller KE, Akkermans ADL, Jefferson RA (1995) β -glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other Gram-negative bacteria. *Microbiol* 141:1691-1705.