

R. 8269

T-428

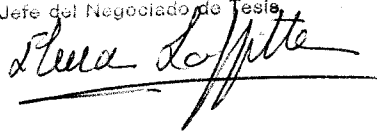
UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 34 número 77 del libro
correspondiente.

Sevilla, _____

19 OCT. 1990

El Jefe del Negociado de Tesis



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA

GENES TEMPRANOS DE *RHIZOBIUM TRIFOLII*

IMPLICADOS EN EL PROCESO DE LA NODULACION

Memoria que presenta la Lda. en Farmacia
Carmen Coronado Carvajal, para aspirar al
grado de Doctor en Farmacia por la
Universidad de Sevilla.

1990

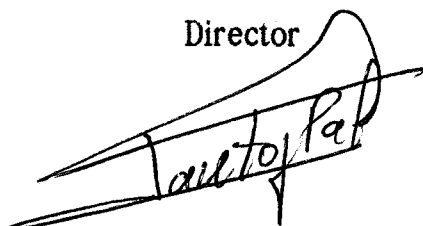
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA

Memoria realizada en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla que presenta la Licenciada CARMEN CORONADO CARVAJAL para optar al grado de Doctor.

Director

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Antonio J. Palomares Díaz', written over a horizontal line.

Fdo. Antonio J. Palomares Díaz

Sevilla, Octubre 1990

A mis padres, a cambio de todos sus sacrificios y por todo el amor que me ofrecen.

INDICE GENERAL.

	página
Dedicatoria	iii
Indice General	iv
Indice de Figuras	viii
Indice de Tablas	x
Abreviaturas	xi
Agradecimientos	xiii
Curriculum Vitae y Publicaciones	xv
Resumen	xvii

Capítulo 1.

Introducción General	1
BIBLIOGRAFIA	25

Capítulo 2.

Homología interespecífica de genes <i>ndv</i> en <i>Rhizobium</i> y <i>Bradyrhizobium</i> spp.	44
INTRODUCCION	45
MATERIAL Y METODOS	48
Bacterias y plásmidos	48
Medios y condiciones de cultivo	48
Aislamiento de ADN	48
Detección de plásmidos en gel de agarosa	49
Enzimas e isótopos	49
Análisis de hibridación	49
RESULTADOS	50
Hibridación con <i>ndvA</i>	50
Hibridación con <i>ndvB</i>	54
Localización cromosómica de genes <i>ndv</i>	54
DISCUSION	54

AGRADECIMIENTOS	63
BIBLIOGRAFIA	64

Capítulo 3.

Aislamiento de dos loci de <i>Rhizobium trifolii</i> RS800 homólogos estructural y funcionalmente a <i>ndvA</i> y <i>ndvB</i> , que complementan mutantes avirulentos de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	70
INTRODUCCION	71
MATERIAL Y METODOS	74
Bacterias y plásmidos	74
Plantas	74
Medios y condiciones de cultivo	74
Enzimas e isótopos	76
Ensayo de nodulación	76
Reaislamiento de bacterias a partir de nódulos	77
Ensayo de virulencia	78
Mecanismos de transferencia de ADN	78
A) CONJUGACION	78
B) TRANSFORMACION	79
Aislamiento de ADN	79
A) ADN PLASMIDICO	79
B) PLASMIDOS DE <i>RHIZOBIUM</i>	79
Electroforesis en gel de agarosa y recuperación de ADN de un gel	80
Ligamiento de ADN	80
Análisis de hibridación	81
RESULTADOS	81
Aislamiento de cósmidos recombinantes portadores de las regiones <i>ndvA</i> y <i>ndvB</i> de <i>Rhizobium trifolii</i> RS800	81
Complementación heteróloga funcional de mutantes avirulentos de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	90
Caracterización de los loci <i>ndvA</i> y <i>ndvB</i> de <i>R. trifolii</i> RS800	94
DISCUSION	99
AGRADECIMIENTOS	101

BIBLIOGRAFIA	102
--------------------	-----

Capítulo 4.

Aislamiento y caracterización de mutantes <i>ndvB</i> de <i>Rhizobium trifolii</i> RS800	106
INTRODUCCION	107
MATERIAL Y METODOS	110
Bacterias y plásmidos	110
Medios y condiciones de cultivo	110
Mutagénesis dirigida mediante la técnica de marcador de cambio	114
Ligamiento de ADN	114
Ensayo de nodulación	114
Microscopía de cortes de nódulos	115
Microscopía de epifluorescencia	116
Extracción de β -1,2 glucano	116
Análisis de transcripción y traducción in vitro	117
RESULTADOS	117
Creación de mutantes <i>ndvB</i> de <i>R. trifolii</i> RS800	117
Fenotipo en planta de la estirpe CAR1	123
Estudio de la estructura de los nódulos formados por RS800 y CAR1	126
Producción de β -1,2 glucano por la estirpe CAR1 de <i>R. trifolii</i>	133
Identificación del producto génico del locus <i>ndvB</i>	133
DISCUSION	136
AGRADECIMIENTOS	139
BIBLIOGRAFIA	140

Capítulo 5.

Análisis de la región promotora del locus <i>ndvB</i>	145
INTRODUCCION	146
MATERIAL Y METODOS	150
Bacterias y plásmidos	150
Medios y condiciones de cultivo	154
Enzimas y luciferina	154

Defosforilación de fragmentos de ADN	154
Determinaciones de actividad luciferasa	154
RESULTADOS	157
Aislamiento de la región promotora del locus <i>ndvB</i> de <i>R. trifolii</i> RS800	157
Expresión del gen <i>luc</i> bajo el control del promotor <i>ndvB</i> en bacterias pertenecientes al género <i>Rhizobium</i>	157
Expresión del gen <i>luc</i> bajo el control del promotor <i>ndvB</i> en otras bacterias fijadoras de nitrógeno	161
DISCUSION	162
AGRADECIMIENTOS	165
BIBLIOGRAFIA	166

Capítulo 6.

Discusión General	171
CONCLUSIONES	189
BIBLIOGRAFIA	190

INDICE DE FIGURAS.

Figura		página
Capítulo 1.		
1.1	Esquema general del proceso de infección.....	9
Capítulo 2.		
2.1	Hibridación de ADN <i>ndvA</i> específico perteneciente a <i>Rhizobium meliloti</i> 102F34 frente a ADN total de otras especies y cepas de <i>Rhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> y <i>Agrobacterium</i>	53
2.2	Hibridación de ADN <i>ndvB</i> específico perteneciente a <i>Rhizobium meliloti</i> 102F34 frente a ADN total de otras especies y cepas de <i>Rhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> y <i>Agrobacterium</i>	57
2.3	Localización cromosómica de genes <i>ndv</i> en <i>Rhizobium trifolii</i> RS800	60
Capítulo 3.		
3.1	Esquema del aislamiento de loci <i>ndv</i> por complementación de mutantes.....	84
3.2	Plantas de alfalfa inoculadas con la mezcla de transconjugantes del mutante <i>ndvB</i>	86
3.3	Hibridación de ADN <i>ndv</i> -específico de <i>Rhizobium meliloti</i> 102F34 frente a cósmidos recombinantes de <i>Rhizobium trifolii</i> RS800.....	89
3.4	Complementación de mutantes avirulentos de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	93
3.5	Estudio físico e hibridación frente a ADN <i>ndv</i> -específico de los cósmidos pCC11 y pCC71	96
3.6	Mapa físico de restricción de pCC119 y pCC719	98
Capítulo 4.		
4.1	Técnica de mutagénesis dirigida	113
4.2	Construcción de pCC7181	119
4.3	Floculación en medio líquido de la estirpe CAR1 de <i>Rhizobium trifolii</i>	122
4.4	Plantas de trébol inoculadas con las estirpes RS800 y CAR1 de <i>Rhizobium trifolii</i>	125

4.5	Microscopía de nódulos formados por la estirpe RS800 de <i>Rhizobium trifolii</i>	128
4.6	Microscopía de nódulos, similares a los producidos por la cepa silvestre, formados por la estirpe CAR1 de <i>Rhizobium trifolii</i>	130
4.7	Microscopía de nódulos, diferentes a los inducidos por la cepa silvestre formados por la estirpe CAR1 de <i>Rhizobium trifolii</i>	132
4.8	Análisis de transcripción y traducción in vitro de loci <i>ndv</i>	135

Capítulo 5.

5.1	Esquema del plásmido pAL4000	153
5.2	Expresión del gen de la luciferasa de luciérnaga bajo el control de la región promotora <i>ndvB</i> de <i>Rhizobium trifolii</i>	159

INDICE DE TABLAS

Tabla		página
Capítulo 1.		
1.1	Asociaciones <i>Rhizobium</i> -leguminosa	5
Capítulo 2.		
2.1	Bacterias y plásmidos.....	47
2.2	Homología de genes <i>ndv</i> en distintas especies de <i>Rhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Agrobacterium</i> y en <i>E. coli</i>	51
2.3	Reiteración de genes <i>ndv</i> en distintas especies de <i>Rhizobium</i> y <i>Bradyrhizobium</i>	55
Capítulo 3.		
3.1	Bacterias y plásmidos	75
3.2	Complementación de mutantes <i>chvA</i> y <i>chvB</i> de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	91
Capítulo 4.		
4.1	Plásmidos	111
Capítulo 5.		
5.1	Bacterias y plásmidos	151
5.2	Actividad luciferasa en unidades relativas de luz/D. O.600 de los plásmidos pAL4000 y pLUC19	156
5.3	Actividad luciferasa bajo el control del promotor <i>ndvB</i> de <i>Rhizobium trifolii</i> RS800	160

ABREVIATURAS.

bp	pares de bases
Kb	kilobases
MDa	megadaltons
KDa	kilodaltons
h	horas
min	minutos
µg	microgramos
mg	miligramos
g	gramos
% p/v	gramos por cada 100 ml
% v/v	mililitros por cada 100 ml
µl	microlitros
ml	mililitros
cm	centímetros
mm	milímetros
µm	micras
nm	nanómetros
µCi	microcuries
rpm	revoluciones por minuto
Tc	tetraciclina
Nal	ácido nalidíxico
Spc	espectinomicina
Amp	ampicilina
Km	kanamicina
Nm	neomicina
X-gal	5-bromo-4cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido
IPTG	isopropil-β-D-tio-galactopiranósido
BSA	albúmina bovina
PVP	polivinilpirrolidona
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
SDS	dodecil sulfato sódico
DMSO	dimetilsulfóxido
PPO	difeniloxazol
DTT	ditiotreititol
Tris	tris-hidroximetil-aminometano

ATP	adenosin-trifosfato
^{32}P -dCTP	desoxicitosina 5'(α - ^{32}P) trifosfato
TBB	tampón tris-borato
DSB	tampón para conservación de ADN
ORF	secuencia abierta de lectura
λ PR	promotor derecho del fago lambda
EPS	exopolisacárido
LPS	lipopolisacárido
MDO	oligosacáridos derivados de membrana
KDO	ácido 2-ceto, 3-desoxioctulónico
RMN	resonancia magnética nuclear
D.O.	densidad óptica
pSym	plásmido simbiótico
pTi	plásmido inductor de tumores
bv.	biovariedad
cv.	cultivar

AGRADECIMIENTOS.

Me resulta muy difícil expresar en unas líneas mi agradecimiento por todo el apoyo que he recibido durante estos cuatro años de mi formación y de mi vida. Desde el principio han sido el cariño y el aliento de mis padres, de mis hermanas Rosario y Pilar, de Juanele, de Antonio y Paco, y la alegría contagiosa de mis sobrinas Ana y Pilareta, lo que me ha impulsado hacia adelante en el camino que he decidido tomar para desarrollarme como profesional y como persona. En esta decisión tengo que agradecer a Catalina Lara el haberme introducido en el mundo de la Investigación y de la Ciencia, así como su orientación en la elección de laboratorio y en muchos momentos a lo largo del desarrollo de este trabajo.

A D. Francisco Ruíz-Berraquero, le doy las gracias por haberme acogido en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Sevilla, por haberme dado todo tipo de facilidades para mi formación científica y para la realización de mi trabajo, y por su colaboración en la redacción de esta Tesis. En el Departamento he encontrado tantos valores humanos que me he sentido como en casa gracias a todos mis compañeros. Particularmente quiero agradecer su ayuda a Manuel Megias, a quien he sentido siempre a mi lado y con quien he aprendido mucho; a Miguel Angel Caviedes, que siempre ha tenido tiempo para escucharme; y a Carolina Sousa, que ha compartido conmigo muchos momentos en el laboratorio y ha sido junto con Mari Carmen Mejias mi primera maestra. En Carmen Vargas y Beatriz Sánchez he tenido la fortuna de encontrar dos buenas compañeras y dos buenas amigas, dentro y fuera del laboratorio, quiero agradecer vuestra participación en este trabajo y expresar mi deseo de conservar vuestra amistad para siempre. Finalmente me gustaría hacer constar mi agradecimiento a Antonio J. Palomares, sin cuya dedicación y esmero no habría sido posible esta Tesis Doctoral; su ilusión por el trabajo, su seriedad en la tarea investigadora, y su calidad humana han sido muy importantes en mi formación científica y personal.

También quiero agradecer a Dulce Nombre Rodríguez, su colaboración en todos los ensayos en planta que se presentan en este trabajo; a Rafael Maldonado y Josep Casadesús, haberme iniciado en el uso del ordenador Macintosh; y a Pedro Vaquero, su asistencia en la fotografía.

CURRICULUM VITAE.

- 11-Septiembre-1964 Nacida en Córdoba.
- 1981-1986 Licenciatura de Farmacia. Univ. de Sevilla.
- 1986 Examen de Grado. Univ. de Sevilla.
- 1986-1990 Estudios de Doctorado. Departamento de
Microbiología y Parasitología.
Univ. de Sevilla
- 1986-1990 Becaria predoctoral F. P. I.-M. E. C.
- 1990 Bécaria postdoctoral. Perfeccionamiento
para Doctores y Tecnólogos-M. E. C.

Cursos realizados.

- 1987 Manipulación Genética de Microorganismos. Dpto. de
Genética y Microbiología. Univ. Autónoma de Barcelona.
- 1988 Fijación y Movilización Biológica de Nutrientes. Estación
Experimental del Zaidín. C. S. I. C. Granada.
- 1989 Genetic Manipulation of Industrial Microorganisms and
Control of Gene Expression. Dpto. de Ecología, Genética y
Microbiología. Univ. de León. B. A. P.-C. E. E.

Comunicaciones a Congresos Internacionales.

Palomares, A. J., Coronado, C., Sousa, C., Vargas, C., Ruíz-Berraquero, F. y Megias, M. (1988). Study of *ndv* genes in *Rhizobium trifolii* and other *Rhizobium* species. 4th International Symposium on Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. Acapulco, Mexico. III b-3.

Coronado, C., Sánchez-Andújar, B., Ruíz-Berraquero, F. y Palomares, A. J. (1990). Nodule development genes in *Rhizobium trifolii* RS800. 5th International Symposium on Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. Interlaken, Suiza. P-138.

Publicaciones.

Coronado, C., Megias, M., Ruíz-Berraquero, F. y Palomares, A. J. (1989). Interspecies homology of nodule development genes in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* spp. FEMS Microbiol. Lett. 59: 289-296.

Palomares, A. J., Coronado, C. y Megias, M. (1989). Study of *ndv* genes in *Rhizobium trifolii* and other *Rhizobium* species. En Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. R. Palacios y D. P. S. Verma (eds.). APS Press. St. Paul, Minnesota. pp. 183-186.

Palomares, A. J., Cebolla, A., Caviedes, M. A., Sánchez, B., Rodríguez, D. N., Muñoz, J. A., Coronado, C. y Ruíz-Berraquero, F. (1990). Firefly luciferase expression on nitrogen fixation with non-legumes. Proceeding Fifth International Symposium on Nitrogen Fixation with Non-Legumes. Florencia, Italia.

RESUMEN.

Genes tempranos de *Rhizobium trifolii* implicados en el proceso de la nodulación

**Memoria realizada en el Departamento de
Microbiología y Parasitología**

por

**Carmen Coronado Carvajal
Universidad de Sevilla**

Director, Dr. D. Antonio J. Palomares Díaz

Entre las bacterias pertenecientes a la familia Rhizobiaceae se encuentran las agrobacterias y los rizobios. Ambos grupos de microorganismos presentan la particularidad de interactuar con plantas superiores. Las agrobacterias poseen la capacidad de formar tumores en dicotiledóneas, mientras que los rizobios establecen una asociación simbiótica con las leguminosas en cuyas raíces realizan la transformación de nitrógeno atmosférico en amonio.

Los nódulos inducidos por los rizobios en la raíz de la planta, son unas estructuras altamente especializadas donde ocurre la fijación simbiótica de nitrógeno. El proceso que conduce al desarrollo de un nódulo efectivo es una sucesión compleja de etapas que se pueden agrupar en tres: formación del nódulo, invasión del nódulo y fijación de nitrógeno. Hasta ahora se han descrito gran cantidad de genes, tanto bacterianos como de la planta, implicados en cada una de estas etapas. Sin embargo, la invasión del nódulo continúa siendo uno de los puntos más oscuros.

En *Rhizobium meliloti* se han descrito dos loci, denominados *ndvA* y *ndvB*, que intervienen en el desarrollo del nódulo en esta etapa intermedia de invasión. Los genes *ndv* se aislaron por homología con los genes *chv* de *Agrobacterium tumefaciens*, y están relacionados con la síntesis y transporte de un pequeño oligosacárido cíclico (β -1,2 glucano) necesario para la adaptación a condiciones de baja osmolaridad.

Se ha demostrado la presencia de secuencias homólogas a *ndvA* y *ndvB* en *Rhizobium trifolii*, *Rhizobium phaseoli*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium fredii*, *Rhizobium* sp. NGR234 y *Bradyrhizobium japonicum*. En todos los casos la localización de las mismas es cromosómica. Se ha investigado también la existencia de posibles reiteraciones de los loci *ndv*. Particularmente interesante para este estudio ha resultado el hecho de la triple repetición del locus *ndvB* en la estirpe RS800 de *Rhizobium trifolii*.

Por complementación de mutantes *ndvA* y *ndvB* de *R. meliloti*, se han aislado los loci *ndvA* y *ndvB* de *R. trifolii* RS800 y mediante hibridación se ha demostrado la homología estructural de éstos con los genes *ndv* de *R. meliloti*. Los genes *ndv* de *R. trifolii* son funcionalmente intercambiables por los genes *chv* de *Agrobacterium tumefaciens*.

El fenotipo vegetativo y simbiótico de la estirpe CAR1 de *R. trifolii*, mutante en una de las copias *ndvB*, presenta similitudes y diferencias con respecto a los mutantes *ndv* de *R. meliloti*. CAR1 no ha perdido la capacidad de sintetizar β -1,2 glucano ni su motilidad se ve afectada; en cambio crece muy lentamente en medio líquido y presenta una marcada tendencia a la autoaglutinación. En las plantas inoculadas con la estirpe *R. trifolii* CAR1 se induce la formación de dos tipos de nódulos. El 70% de los nódulos son blancos, pequeños y se sitúan en las raíces secundarias, revelando el análisis microscópico que se trata de nódulos vacíos o con un número reducido de células excásamente invadidas. El resto de los nódulos son más parecidos a los inducidos por la estirpe silvestre; aunque presentan un número mayor de células no invadidas, realizan fijación de nitrógeno.

Se ha aislado la región promotora del locus *ndvB* de *R. trifolii* RS800 utilizando el vector para búsqueda de promotores pAL4000. Este plásmido lleva el gen de la luciferasa de luciérnaga como gen informador, lo que ha permitido una identificación fácil y rápida de los clones portadores de un fragmento *Sau3A* de 1.5 Kb con actividad promotora. Se ha demostrado la funcionalidad del promotor *ndvB* en un amplio rango de bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Rhizobium trifolii*, *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium phaseoli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Azospirillum brasilense*.

La fuerza del promotor *ndvB* en estas bacterias es comparable a la del promotor derecho del fago lambda, por lo que podría ser un promotor útil para la construcción de vectores de expresión.

CAPITULO 1.

Introducción General.

LA FIJACION SIMBIOTICA DE NITROGENO.

El nitrógeno, tras el carbono, oxígeno e hidrógeno, es el elemento más abundante de la materia viva, de la que entra a formar parte en un 8-16 por ciento. La importancia del nitrógeno para los seres vivos no es sólo cuantitativa ya que es un componente fundamental de moléculas tan importantes como los ácidos nucleicos, base de la información genética, o de las proteínas y enzimas, componentes estructurales de la materia viva y catalizadores de los procesos biológicos, respectivamente.

Aunque el nitrógeno constituye el 78% de la atmósfera terrestre, la mayor parte se encuentra como nitrógeno molecular que no es utilizable por las plantas ni por la mayoría de los microorganismos. La concentración de nitrógeno inorgánico combinado en forma de nitratos, amonio etc., en la mayoría de los suelos es generalmente baja. Esto hace que el nitrógeno se convierta, tras el agua, en el factor determinante de la productividad agraria más importante.

En este contexto es donde cabe apreciar la importancia fundamental de la fijación biológica de nitrógeno. En este proceso exclusivo de procariotas, el nitrógeno molecular es convertido en amonio con un coste energético considerablemente elevado ya que se consumen 35 moléculas de ATP por cada molécula de dinitrógeno reducida (Haaker y Veeger, 1984).

Clásicamente los microorganismos fijadores de nitrógeno se dividen en dos grupos dependiendo de si realizan la fijación de nitrógeno en vida libre según sus propias necesidades, o en relación con plantas superiores como parte de una asociación simbiótica.

Entre las bacterias fijadoras en vida libre (Postgate, 1982), encontramos formas aeróbicas pertenecientes a los géneros *Azotobacter* y *Beijerinckia*, bacterias anaerobias como *Clostridium* y *Desulfovibrio* y anaerobias facultativas como *Bacillus* y *Klebsiella*. Entre los microorganismos que fijan nitrógeno en asociación con plantas superiores podemos citar aquéllos que forman asociaciones llamadas rizocenosis, como *Azotobacter paspali*, o especies

pertenecientes al género *Azospirillum*; y aquéllos que establecen simbiosis mutualistas que conducen a la formación de estructuras especializadas donde se realiza la fijación de nitrógeno, como son algunas especies de cianofíceas pertenecientes a los géneros *Anabaena* y *Nostoc*, el actinomiceto *Frankia* y bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* incluidas en la familia Rhizobiaceae.

Las bacterias fijadoras de nitrógeno pertenecientes a la familia Rhizobiaceae forman asociaciones simbióticas con una familia concreta dentro de las Angiospermas, la familia Leguminosae. Los rizobios estimulan el desarrollo de nódulos en la raíz de la planta leguminosa, que la bacteria infecta y habita. Es en el seno de esta estructura donde los dos organismos interactúan íntimamente y establecen una cooperación metabólica. La bacteria reduce el nitrógeno molecular hasta amonio que es exportado y asimilado por la planta; a cambio ésta durante la fotosíntesis reduce dióxido de carbono hasta azúcares, que son translocados a la raíz donde la bacteria los usa como fuente de carbono y energía.

La familia Leguminosae es una de las más grandes dentro de las Angiospermas, se encuentra ampliamente distribuida en los distintos ecosistemas e incluye desde plantas herbáceas hasta árboles. Es interesante la restricción de la asociación de los rizobios con plantas pertenecientes exclusivamente a esta familia. Sólo se ha descrito una excepción a esta especificidad para el caso de dos rizobios distintos que nodulan un árbol tropical, *Parasponia andersonii*, que no es una leguminosa (Trinick y Galbraith, 1980). Estos hechos plantean ciertas cuestiones como por ejemplo, si la fijación simbiótica de nitrógeno, por su capacidad adquirida de crecer independientemente de limitaciones de nitrógeno en el suelo, es la clave fundamental del éxito de la familia Leguminosae. Esta pregunta lleva a otra más importante sobre las razones de la singularidad de esta familia para ser nodulada. Por último surge una cuestión en torno a *Parasponia*. ¿Se trata de un caso extraño y aislado o de una tendencia en el curso de la evolución hacia la expansión de la fijación simbiótica de nitrógeno?.

Además de la importancia ecológica y económica, la asociación *Rhizobium*-leguminosa presenta un atractivo fundamental por la propia naturaleza del proceso, ya que a través de una compleja serie de etapas, bacteria y planta interaccionan en actividades primordiales como son la división celular, la expresión génica, el metabolismo y la morfogénesis celular.

ESPECIFICIDAD DE HOSPEDADOR Y TAXONOMIA EN *RHIZOBIUM*.

El fenómeno de la especificidad de hospedador en la interacción *Rhizobium*-leguminosa, va mucho más allá del nivel de familia, de forma general se puede decir que cada rizobio interacciona con una o muy pocas especies vegetales estrechamente relacionadas. Este hecho ha servido de base para la designación de especies y cepas. Inicialmente estas bacterias estaban agrupadas en el género *Rhizobium* como un único género, que posteriormente ha sido reclasificado en tres: *Rhizobium*, agrupa bacterias de crecimiento rápido que nodulan leguminosas de clima templado con un reducido rango de hospedador; *Bradyrhizobium*, un grupo heterogéneo de bacterias de crecimiento lento que interaccionan con gran variedad de leguminosas de clima tropical y templado; y *Azorhizobium* que forma nódulos en raíz y tallo de *Sesbania rostrata*, y que también fija nitrógeno en vida libre (Jordan, 1984; Dreyfus *et al.*, 1988).

Aunque la estructura y función de los genes simbióticos es generalmente similar en los tres géneros, existen sin embargo diferencias significativas en su organización y regulación (Long, S. R., 1984). En el género *Rhizobium* los genes implicados en las primeras etapas de la nodulación (genes *nod*), en la determinación del rango de hospedador (*hsn*) y en la capacidad de fijar nitrógeno (*nif* y *fix*) están agrupados en un plásmido de gran tamaño o plásmido simbiótico (*pSym*). En cambio en las cepas del género *Bradyrhizobium*, los genes *nif* y *nod* están más dispersos y localizados cromosómicamente. Algunas cepas de *Bradyrhizobium* fijan nitrógeno a bajos niveles en vida libre pero no asimilan el amonio, no creciendo en el nitrógeno fijado; a diferencia de las

TABLA 1.1. Asociaciones *Rhizobium*-leguminosa.

ESPECIES	PLANTA HOSPEDADORA
----------	--------------------

Crecimiento rápido, reducido rango de hospedador:

<i>Rhizobium fredii</i>	<i>Glycine max</i> (soja)
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	
biovar. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i> sp. (judía)
biovar. <i>trifolii</i>	<i>Trifolium</i> sp. (trébol)
biovar. <i>viciae</i>	<i>Pisum sativum</i> (guisante), <i>Vicia</i> (veza)
<i>Rhizobium loti</i>	<i>Lotus</i> sp.
<i>Rhizobium meliloti</i>	<i>Medicago sativa</i> (alfalfa) <i>Melilotus</i>

Crecimiento rápido, amplio rango de hospedador:

<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	<i>Desmodium</i> , <i>Leucaena</i> , <i>Lablab</i> , <i>Macroptilium</i> , <i>Vigna</i> y la no leguminosa <i>Parasponia andersonii</i>
-----------------------------	--

Rizobios de crecimiento lento:

<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Glycine max</i> (soja)
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (Cowpea)	Grupo Cowpea
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (Parasponia)	<i>Parasponia andersonii</i>

Formador de nódulos en tallo y raíz, y fijador de nitrógeno en vida libre:

<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>
---------------------------------	--------------------------

cepas de *Azorhizobium* que fijan nitrógeno a altos niveles "in vitro" y pueden crecer en el amonio formado.

La clasificación de las distintas especies de rizobios se realizó en un principio en base al concepto de grupos de inoculación cruzada; por ejemplo, *Rhizobium meliloti* es el simbiote asociado con *Melilotus* y *Medicago sativa*, y la inoculación de judía o guisante con *R. meliloti* no origina ningún tipo de interacción. En la Tabla 1.1 se muestran las asociaciones *Rhizobium*-leguminosa más conocidas y estudiadas. En esta clasificación se han encontrado fundamentalmente dos inconvenientes. Uno es el hecho de que se encuentran cada vez más fenómenos de infección cruzada entre grupos distintos de afinidad (Martinez *et al.*, 1985; Eardly *et al.*, 1985; Lewin *et al.*, 1987) y el otro es que para esta clasificación se han utilizado sólo el 1% de las leguminosas noduladas descritas.

El descubrimiento de plásmidos portadores de los determinantes de la simbiosis en las distintas especies de *Rhizobium*, argumenta también en contra de esta clasificación. La pérdida del pSym conduce a la pérdida de la capacidad simbiótica, y la transferencia desde unas especies de *Rhizobium* a otras altera la especificidad de hospedador. Se ha discutido que la división de *Rhizobium leguminosarum* en las tres biovariedades: biovar. *trifolii*, biovar. *phaseoli* y biovar. *viciae*, se refiere a la clasificación de sus plásmidos simbióticos que poseen características particulares: los genes simbióticos están organizados de forma distinta, algunos genes son exclusivos de cierto tipo de plásmido y algunas secuencias repetidas parecen ser características de cada pSym (Watson y Schofield, 1985). También debemos considerar que en una misma especie podemos encontrar plásmidos simbióticos bien diferentes que confieren la misma especificidad, tal es el caso de los dos tipos de pSym descritos en *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli* (Martinez *et al.*, 1988).

En el presente trabajo adoptaremos la designación clásica (Vincent, 1970) para referirnos a las especies: *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium trifolii* y *Rhizobium phaseoli*, con objeto de simplificar el texto. Actualmente se consideran como tres biovariedades de la especie *Rhizobium leguminosarum* (Jordan,

1984), en base a estudios de taxonomía numérica, homología ADN-ADN, serología, composición polisacáridica etc. Parece ser que dentro de la especie *R. leguminosarum*, la biovariedad *phaseoli* se encuentra algo alejada de las otras dos.

EL PROCESO DE INFECCION.

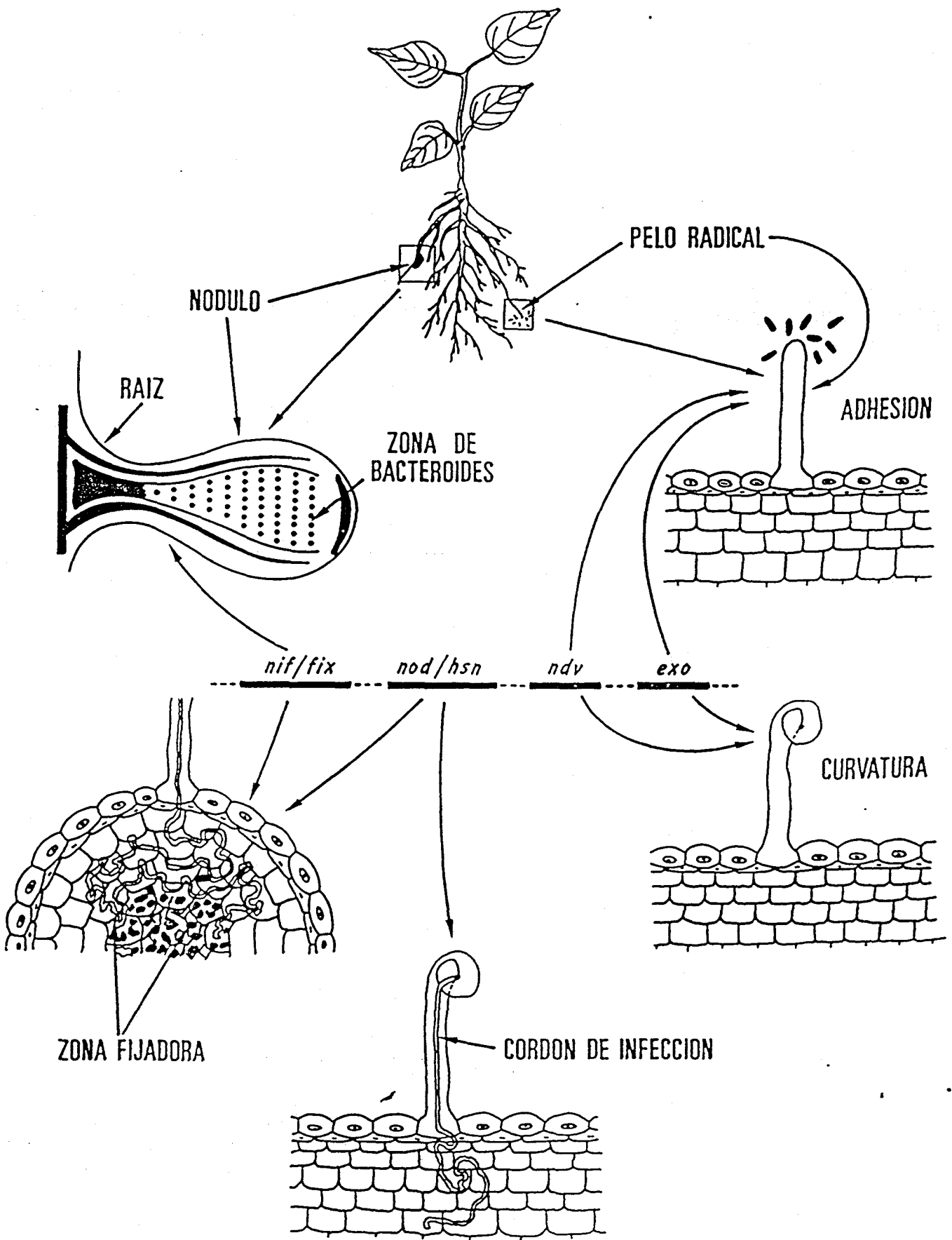
El establecimiento de la simbiosis entre *Rhizobium* y su hospedador, requiere el reconocimiento de la bacteria y la raíz de la planta. El primer efecto visible tras la inoculación de la raíz de una leguminosa con un cultivo de rizobios, es la inducción de curvatura en los pelos radicales jóvenes de la raíz. Tras esta deformación del pelo la bacteria penetra en la planta, y se forma una estructura especializada que permite la invasión y se denomina "cordón de infección". Por delante del avance del cordón de infección, en el córtex de la raíz, se inicia la división de las células de la planta originándose un nódulo incipiente; al mismo tiempo el cordón de infección se ramifica y crece entre las células de la planta. Las bacterias se liberan en el extremo del cordón de infección por un proceso en el que son rodeadas por una membrana de origen vegetal. Es aquí en el interior de las células del nódulo donde las bacterias se diferencian en bacteroides y adquieren la capacidad de fijar nitrógeno.

El desarrollo del proceso que conduce a la fijación simbiótica de nitrógeno en *Rhizobium*, es una compleja serie de etapas que pueden agruparse fundamentalmente en tres: inicio de la formación del nódulo, invasión del nódulo y fijación de nitrógeno. En la Figura 1.1 se presenta un esquema general de la interacción *Rhizobium*-leguminosa.

FORMACION DEL NODULO:

Las etapas iniciales de la interacción incluyen el crecimiento y la deformación de pelos radicales en la epidermis de la raíz (Dazzo y Gardiol, 1984; Yao y Vincent, 1969), y el inicio de la división celular en el córtex de la raíz de la planta (Newcomb, 1981). Esta etapa sólo tiene lugar si la planta se encuentra dentro del rango de

Figura 1.1. Esquema general del proceso de infección.



hospedador correcto de la bacteria. Mediante análisis genético en numerosas especies de *Rhizobium* se han identificado aquellos loci necesarios para la nodulación, que se han denominado genes *nod*.

INVASION DEL NODULO:

Los rizobios atrapados en un pelo radical curvado, o entre un pelo y otra célula, causan de alguna manera una invaginación de la pared celular de la célula vegetal que parece implicar su degradación y la redirección de su crecimiento, originándose por extensión de esta invaginación el cordón de infección (Callaham y Torrey, 1981; Turgeon y Bauer, 1985; Ridge y Rolfe, 1986). Las bacterias se multiplican en el interior del cordón y éste se ramifica y avanza hasta el córtex donde se está formando la estructura del nódulo. El mecanismo por el que las bacterias son liberadas del cordón de infección no se conoce muy bien, por estudios microscópicos parece ser que escapan por discontinuidades en la pared del cordón.

En estas etapas de crecimiento del cordón de infección e invasión del tejido del nódulo parecen estar implicadas determinadas características superficiales de la bacteria. Entre los componentes de la superficie bacteriana debemos considerar: heteropolisacáridos ácidos, glucanos neutros y lipopolisacáridos; recientemente se están realizando estudios genéticos encaminados a identificar los loci de la bacteria implicados, designados como *exo*, *ndv* y *lps* respectivamente, y a descubrir la forma en la que intervienen en la interacción de superficies vegetal y bacteriana.

FIJACION DE NITROGENO:

Las últimas etapas, que conducen al establecimiento de un nódulo funcional, incluyen una liberación correcta y una proliferación controlada de los rizobios. Las bacterias, liberadas y envueltas en una membrana de origen vegetal llamada membrana peribacteroidal, se diferencian en bacteroides que convierten dinitrógeno en amonio asimilable por la planta y que dependen totalmente de los nutrientes que reciben de ella.

Los loci bacterianos relacionados específicamente con la fijación simbiótica de nitrógeno se designan de dos formas: como genes *nif*, aquéllos que presentan homología con los genes *nif* de *Klebsiella pneumoniae* y como genes *fix*, aquéllos que no son equivalentes a los genes *nif*.

GENETICA DE LA NODULACION.

La genética de la nodulación se ha estudiado fundamentalmente en *R. meliloti*, *R. leguminosarum*, *R. trifolii* y *Bradyrhizobium japonicum* (Kondorosi y Kondorosi, 1986; Downie y Johnston, 1988; Rolfe y Gresshoff, 1988; Long, S. R., 1989a, 1989b; Martinez *et al.*, 1990). Las mutaciones que ocasionan la pérdida de la capacidad de nodular de estas bacterias, mapean en un "cluster" de cuatro genes, *nodDABC*, de los cuales *nodD* se transcribe divergentemente y es un regulador de *nodABC* y de otros operones *nod*. El operón *nodABC* es indispensable para la curvatura del pelo radical, y para la inducción del desarrollo meristemático del córtex de la raíz (Kondorosi *et al.*, 1984; Djordjevic, M. A. *et al.*, 1985b; Rossen *et al.*, 1985; Truchet *et al.*, 1985; Bender *et al.*, 1987; Dudley *et al.*, 1987).

Estos genes reciben el nombre de genes *nod* comunes porque se han encontrado secuencias homólogas en todas las especies de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* estudiadas y porque las mutaciones en estas secuencias pueden ser complementadas por genes de especies distintas (Kondorosi *et al.*, 1984; Djordjevic, M. A. *et al.*, 1985a; Fisher *et al.*, 1985; Marvel *et al.*, 1985). El producto de *nodC* presenta características de receptor de membrana (John *et al.*, 1988) y *nodA* y *nodB* están implicados en la síntesis de un factor difusible de bajo peso molecular cuya estructura ha sido recientemente determinada por Lerouge *et al.* (1990).

Los genes *nodABC* no se expresan en vida vegetativa, pero pueden inducirse por exudados de planta (Innes *et al.*, 1985; Mulligan y Long, 1985; Rossen *et al.*, 1985; Djordjevic, S. P. *et al.*, 1987; Kosslak *et al.*, 1987; Zaat *et al.*, 1987; Davis *et al.*, 1988). Dependiendo de las especies, se han identificado los factores

inductores en los exudados como flavonas, isoflavonas o flavonoides (Peters *et al.*, 1986; Redmon *et al.*, 1986; Kosslak *et al.*, 1987; Horvath *et al.*, 1987; Peters y Long, 1988). En los exudados también se han encontrado algunos componentes que actúan como anti-inductores (Firmin *et al.*, 1986; Djordjevic, M. A. *et al.*, 1987).

La inducción requiere el producto del gen regulador *nodD* que se transcribe constitutivamente en la bacteria (Innes *et al.*, 1985; Mulligan y Long, 1985), aunque en algunas especies el propio gen autorregula su expresión (Rossen *et al.*, 1985). NodD está relacionado con una familia de activadores transcripcionales que incluye los productos de *lysR* y *metR* (Henikoff *et al.*, 1988). La proteína NodD purificada es capaz de unirse a los promotores inducibles de los genes *nod* que contienen una secuencia altamente conservada de unas 50 bp denominada "*nod box*" (Rostas *et al.*, 1986; Fisher *et al.*, 1988), aproximadamente 25 bp "downstream" de estas "cajas de nodulación" se inicia la transcripción de los distintos operones *nod* (Fisher *et al.*, 1987). En *R. meliloti* se han encontrado seis "*nod box*" localizadas en una región de 135 Kb del plásmido simbiótico. En algunas especies de *Rhizobium* se han encontrado varias copias de *nodD* (Rodríguez-Quiñones *et al.*, 1987; Appelbaum *et al.*, 1988), en el caso de *R. meliloti* existen tres reiteraciones de *nodD* cuyos productos presentan preferencias por distintos inductores y están implicados en especificidad de hospedador (Honma y Ausubel, 1987; Györgypal *et al.*, 1988). Recientemente se ha propuesto que la expresión de los genes *nod* está sujeta tanto a un control positivo como a un control negativo (Kondorosi *et al.*, 1989).

Otros genes de nodulación incluyendo *nodFE*, *nodG*, *nodH*, *nodLMN*, *nodPQ* y *nodO* intervienen en la determinación de la especificidad de hospedador. Anteriormente se habían agrupado como genes *hsn* por "host-specific-nodulation" (Horvarth *et al.*, 1986) para diferenciarlos de los genes *nod* comunes; las mutaciones en estos genes inducen reacciones anormales en el pelo radical en el hospedador habitual, y a veces, inducen deformación e incluso curvatura en hospedadores desconocidos (Djordjevic, M. A. *et al.*, 1985b; Debelle y Sharma, 1986; Debelle *et al.*, 1986). Estos genes no están conservados funcionalmente ya que no son intercambiables

para los distintos hospedadores, alelos procedentes de distintos rizobios (Kondorosi *et al.*, 1984; Djordjevic, M. A. *et al.*, 1985b).

Muy recientemente se está tratando de dilucidar la función bioquímica de los genes *nod*. Se sabe que cuando los genes *nodABC* están inducidos las células de *Rhizobium* exportan un factor que afecta a la morfología de la raíz y al crecimiento del pelo radical. El papel concreto que cada gen *nod* común o específico desempeña en la síntesis de este factor está actualmente en estudio (Canter-Cremers *et al.*, 1986; Van Brussel *et al.*, 1986; Cervantes *et al.*, 1989; Downie, 1989; Economou *et al.*, 1989; Schwedock y Long 1989; Lerouge *et al.*, 1990).

También se ha demostrado que la expresión constitutiva de un gen que codifica la síntesis de una citoquinina (zeatina) en un mutante *nodABC*, permite la inducción de la formación de pseudonódulos en la planta hospedadora (Long y Cooper, 1988).

Hirsch *et al.* (1989) han descrito que determinadas moléculas que bloquean el transporte de auxinas, pueden inducir el desarrollo de pseudonódulos en los que ya aparecen algunas nodulinas tempranas, proteínas de la planta que se expresan únicamente en el nódulo, en ausencia de bacterias. Todo esto parece indicar una implicación del balance hormonal en los mecanismos que conducen a la morfogénesis del nódulo.

Por otro lado, la morfología y funcionamiento de nódulos inducidos por una bacteria cuyo gen *nodD* es activo en ausencia de flavonoides sugiere que éstos pueden ser necesarios para el funcionamiento ulterior del nódulo (Spaink *et al.*, 1989).

La formación del nódulo puede por tanto depender de la acción de hormonas cuya síntesis sea inducida por la bacteria, o bien que sean sintetizadas o modificadas por ella; y también parece posible que los flavonoides jueguen un papel más complejo que la simple inducción de los genes *nod*.

GENETICA DE LOS COMPONENTES DE LA SUPERFICIE CELULAR.

La superficie celular de las bacterias pertenecientes al género *Rhizobium* ha sido un elemento interesante desde hace tiempo ya que se le asignaba un papel importante en las primeras etapas de reconocimiento celular. Estudios genéticos recientes han puesto de manifiesto la implicación de determinadas características superficiales de la bacteria en momentos más avanzados en la interacción simbiótica, durante el propio proceso de infección.

Entre estas características superficiales se encuentran los polisacáridos, los factores que intervienen en quimiotaxis y motilidad, y otra serie de componentes de función desconocida que pueden contribuir a la interacción superficial planta-bacteria.

Se han descrito distintas clases de mutantes afectados en etapas intermedias del desarrollo del nódulo: mutantes *exo* que carecen o presentan alteraciones en el polisacárido extracelular o exopolisacárido ácido, mutantes *lps* de lipopolisacárido y mutantes *ndv* afectados en la síntesis de β -glucano cíclico. Estos tres tipos de mutantes son capaces de estimular la formación de estructuras parecidas a nódulos que no son invadidos o que lo son sólo ligéramente por la bacteria.

EXOPOLISACARIDOS:

El exopolisacárido ácido (EPS) es sintetizado por todas las especies del género *Rhizobium*, se trata de una molécula de gran tamaño constituida por una subunidad octosacarídica de glucosa y galactosa con sustituciones de grupos pirúvico, acético y succínico (Aman *et al.*, 1981).

En *Rhizobium meliloti* se han identificado doce loci que participan en la síntesis del EPS (Leigh *et al.*, 1985; Long, S. *et al.*, 1988b) que están localizados en una región de 22 Kb del segundo megaplásmido (Finan *et al.*, 1986), mientras que los genes *nod* y *fix* se localizan en el primer megaplásmido o pSym.

Los mutantes de *R. meliloti* que no producen EPS inducen en alfalfa pseudonódulos que carecen de bacteroides y no fijan nitrógeno (Finan *et al.*, 1985; Leigh *et al.*, 1985). Los mutantes en *exoA*, *B*, *F*, *L*, *M*, *P*, y *Q* no producen EPS; los mutantes en *exoH* producen un EPS alterado que carece de grupos succínico y no invaden el nódulo; los mutantes en *exoK*, *N*, *G* y *J* producen menos EPS que la cepa silvestre y mientras que *exoK* y *exoN* forman nódulos fijadores de nitrógeno, *exoG* y *exoJ* forman nódulos normales pero menos eficientemente que la cepa silvestre (Long, S. *et al.*, 1988b). Long, S. *et al.* (1988a) han demostrado que los productos génicos de algunos genes *exo* (*exoP*, *F* y *A*) son proteínas de membrana.

Además de los genes *exo* del segundo megaplásmido se han encontrado otros cuatro genes *exo* localizados en el cromosoma (*exoC*, *D*, *R* y *S*). Los mutantes en *exoC* y *exoD* inducen en alfalfa pseudonódulos no fijadores de nitrógeno; los mutantes *exoC* no sintetizan EPS mientras que los mutantes *exoD* sintetizan EPS pero la producción es menor que en la cepa silvestre. Los productos génicos de *exoR* y *exoS* regulan negativamente la síntesis de EPS (Doherty *et al.*, 1988).

La naturaleza del bloqueo simbiótico en los mutantes *exo* es desconocida. Se ha especulado sobre si el EPS está implicado en el reconocimiento planta-bacteria, o por el contrario, actúa como un escudo protegiendo a la bacteria de una posible respuesta de defensa de la planta. Otra posibilidad es que el EPS sea uno de los constituyentes de la matriz del cordón de infección.

Glazebrook y Walker (1989) han encontrado que *R. meliloti* tiene la capacidad crítica de producir un segundo exopolisacárido (EPSII) bastante diferente al EPSI que produce normalmente. La síntesis de EPSII se desencadena por una mutación cromosómica en *expR* y requiere la presencia de *expA*, *C*, *D*, *E*, *F* y *G* que se localizan en el segundo megaplásmido; así mismo también se necesita el producto génico de *exoB*. Este EPSII restablece la capacidad de *R. meliloti* para nodular *Medicago sativa*, pero no para nodular otros cuatro hospedadores naturales de la cepa estudiada. Estos

datos sugieren una posible implicación de los exopolisacáridos en la determinación del rango de hospedador.

Se han descrito interrelaciones similares entre la síntesis de EPS y el desarrollo del nódulo para las interacciones *R. trifolii*-trébol (Chakravorty *et al.*, 1982), *R. leguminosarum*-guisante (Borthakur *et al.*, 1986) y *Rhizobium* sp. NGR234-*Leucaena* (Chen *et al.*, 1985; Chen *et al.*, 1988). Entre los polisacáridos producidos por *R. meliloti* y *Rhizobium* sp. NGR234 existen semejanzas estructurales. Los genes implicados en su síntesis son funcionalmente intercambiables y la organización general de las regiones *exo* en ambas especies es muy similar (Zhan *et al.* 1990).

En cambio los mutantes *exo* de *R. fredii* y *R. phaseoli* no se ven afectados en simbiosis (Borthakur *et al.*, 1986; Diebold y Noel, 1989; Kim *et al.*, 1989). Sin embargo, cuando se transfirieron mutaciones *exo::Tn5* de *R. phaseoli* a *R. trifolii*, los transconjugantes resultaron simbióticamente defectuosos (Diebold y Noel, 1988). Estos resultados se han interpretado como una independencia en judía del EPS, necesario en cambio para la simbiosis en trébol y guisante. Otra posible explicación sería que la cepa de *R. phaseoli* posee un locus supresor que obvia la necesidad del EPS. Un caso parecido se ha descrito en *R. meliloti* 41 que posee un locus, designado *lpsZ*⁺, que suprime mutaciones *exoB* aparentemente sin restauración de la producción del exopolisacárido ácido; *lpsZ*⁺ es un locus implicado en la síntesis de lipopolisacárido en *R. meliloti* 41 (Signer *et al.*, 1988; Williams *et al.*, 1990).

Otro punto a considerar es si la adición de EPS durante la inoculación puede eliminar el bloqueo simbiótico en los mutantes *exo*. De esta forma se ha restablecido en la interacción *R. trifolii*-trébol la capacidad simbiótica (Djordjevic, S. P. *et al.*, 1987). Esto sugiere que el EPS es necesario sólo en etapas iniciales de la invasión. En un principio no habían dado resultados tratamientos análogos en el sistema *R. meliloti*-alfalfa (Leigh *et al.*, 1987). Recientemente Battisti *et al.* (1990) han presentado la corrección parcial del defecto en la invasión del nódulo de los mutantes *exo* de *R. meliloti* SU47, añadiéndoles el EPSII o la fracción de bajo peso

molecular del EPSI obtenidos "in vitro" y purificados a partir de la cepa silvestre.

Recientemente en *R. meliloti* se ha descrito una pareja de genes reguladores, *exoX* y *exoF*, localizados en el segundo megaplásmido simbiótico (Zhan y Leigh, 1990). Estos genes parecen estar implicados en la inhibición de la síntesis de EPS en bacteroides. Se han descrito otros loci reguladores similares en *R. phaseoli*, *psr* y *psi* (Borthakur *et al.*, 1985; Borthakur y Johnston, 1987), y en *Rhizobium* sp. NGR234, *exoX* y *exoY* (Gray *et al.*, 1990).

LIPOPOLISACARIDOS:

El lipopolisacárido es un importante constituyente de la membrana externa de la bacteria e interviene en la interacción entre ésta y su medio externo. El LPS en *R. leguminosarum*, *R. trifolii* y *R. phaseoli* está constituido por una región polisacáridica relativamente conservada y un antígeno O variable.

Noel *et al.* (1986) obtuvieron por mutagénesis con Tn5 en *R. phaseoli* un mutante incapaz de desarrollar un cordón de infección normal en judía y designaron este fenotipo como Ndv- (por "nodule development"). Como en estos mutantes el antígeno O no se sintetizaba (Carlson *et al.*, 1987) se deduce que si bien un LPS completo no es fundamental para el reconocimiento y curvatura del pelo radical al comienzo de la infección en judía, sí que es absolutamente necesario para mantener y completar el proceso de infección. Los genes implicados en la síntesis de LPS en *R. phaseoli* CFN42 se han clonado recientemente (Cava *et al.*, 1989).

También por mutagénesis con Tn5 se han obtenido mutantes de lipopolisacárido en *R. leguminosarum* que carecen de antígeno O o sintetizan un antígeno O alterado. Además tienen alterada la motilidad e inducen nódulos no fijadores de nitrógeno en los que muy pocas células vegetales están infectadas por bacteroides (De Maag *et al.*, 1989). En *R. leguminosarum* se ha demostrado que los genes que intervienen en la producción de LPS están en el cromosoma. Se han identificado al menos tres regiones genéticas separadas en un fragmento de 20 Kb (Priefer, 1989).

De forma similar los mutantes de *B. japonicum* que carecen del antígeno O forman en soja cordones de infección que abortan prematuramente (Maier y Brill, 1978; Puvanesarajah *et al.*, 1987).

Existen varias hipótesis sobre la función del LPS durante la simbiosis. La primera de ellas sería la posible función de protección de la bacteria ante los mecanismos de defensa de la planta, bien en las primeras etapas de la infección o en el momento de la liberación del cordón de infección. Otra posibilidad sería que el propio LPS actuara como una señal para la planta. Esta hipótesis está apoyada por tests de coinoculación con mutantes de Nod⁻ y LPS⁻ de *R. leguminosarum* en los que se inducen nódulos fijadores de nitrógeno en *Vicia hirsuta* (Priefer, 1989).

β-1,2 GLUCANOS CICLICOS NEUTROS:

Además del lipopolisacárido y el exopolisacárido los rizobios producen un oligosacárido cíclico particular denominado β-1,2 glucano (Zevenhuizen y Scholten-Koerselman, 1979; York *et al.*, 1980). Esta molécula es un anillo de aproximadamente 20 residuos de glucosa unidos mediante enlace β-(1->2) y que generalmente no llevan sustituciones. El β-1,2 glucano se puede aislar tanto del medio extracelular como del espacio periplásmico de la bacteria (Abe *et al.*, 1982; Miller *et al.*, 1986).

Sutherland (1985) ha propuesto que los glucanos cíclicos β-(1->2) son una característica hasta ahora sólo descrita para los géneros *Rhizobium* y *Agrobacterium*.

Las bacterias pertenecientes al género *Agrobacterium* son patógenos de plantas que inducen tumores en una gran variedad de dicotiledóneas. La mayoría de los genes necesarios para la virulencia (*vir*) de *Agrobacterium tumefaciens* se han localizado en un plásmido denominado pTi (Klee *et al.*, 1983). Las mutaciones en genes *vir* impiden la transformación oncogénica de la planta, presumiblemente interfiriendo en la transferencia de otra región del plásmido Ti llamada T-DNA que codifica enzimas implicadas en la producción de fitohormonas (Akiyoshi *et al.*, 1984; Inze *et al.*, 1984; Schroeder *et al.*, 1984). Además de los genes plasmídicos *vir*

se han descrito dos loci muy próximos localizados en el cromosoma de *Agrobacterium* (Douglas *et al.*, 1985), estos loci designados *chvA* y *chvB* presentan la característica de que las mutaciones originadas en cualquiera de ellos conducen a la pérdida de la capacidad de las agrobacterias para unirse a las células de la planta e inducir la formación de tumores.

Dylan *et al.* (1986) han identificado genes simbióticos esenciales en *R. meliloti* que están relacionados estructural y funcionalmente con los genes de virulencia cromosómicos (*chv*) de *A. tumefaciens*. Las mutaciones en las regiones equivalentes a *chvA* y *chvB* en *R. meliloti* originan mutantes que inducen la formación en alfalfa de pseudonódulos que carecen de bacteroides, no tienen cordón de infección y por tanto no fijan nitrógeno. Los loci de *Rhizobium* se designaron como *ndv* por ser requeridos para el desarrollo del nódulo ("nodule development") siguiendo el ejemplo de Vandebosch *et al.* (1985). Müller *et al.* (1988b) han aislado mutantes de *R. meliloti* 2011 mediante mutagénesis con Tn5 que también inducen pseudonódulos en alfalfa y que producen cantidades de EPS superiores a las de la cepa silvestre, siendo además un EPS carente de sustituciones piruvato. Estas mutaciones mapean en un fragmento *Eco* RI de 6.4 Kb del cromosoma que presenta alta homología con *ndvB* (Müller *et al.*, 1988a).

En seis especies diferentes de *Rhizobium* y en *Bradyrhizobium*, se han detectado por hibridación y se ha demostrado la localización cromosómica de secuencias homólogas a los genes *ndv* de *R. meliloti* (Dylan *et al.*, 1986; Coronado *et al.*, 1989).

Los loci *chvAB* y *ndvAB* están relacionados con la capacidad de las bacterias de sintetizar y exportar β -1,2 glucano cíclico. El β -1,2 glucano en *Agrobacterium* se sintetiza por transferencias sucesivas de unidades de glucosa desde UDP-glucosa a una proteína intermediaria unida a membrana, cuyo tamaño molecular es de 235 KDa (Zorreguieta *et al.*, 1985; Zorreguieta y Ugalde, 1986). Esta proteína no existe en mutantes *chvB* (Zorreguieta y Ugalde, 1986), y se ha visto que una proteína similar actúa como intermediario en la síntesis de β -1,2 glucano en *R. meliloti* (Zorreguieta y Ugalde, 1986; Geremia *et al.*, 1987). Los genes estructurales que codifican

para la proteína de 235 KDa en *Rhizobium* y *Agrobacterium* son *ndvB* y *chvB* respectivamente (Zorreguieta *et al.*, 1988; Ielpi *et al.*, 1990).

Para *ndvA* y *chvA* se ha propuesto la función de excreción del β -1,2 glucano cíclico. La secuencia de *ndvA* revela la presencia de un solo ORF (secuencia abierta de lectura) que codifica una proteína de 67 KDa que presenta homología con un gran número de proteínas transportadoras que unen ATP, tal es el caso de HlyB de *Escherichia coli* implicada en el transporte de hemolisinas, o el producto de *mdr* en células de mamífero (Stanfield *et al.*, 1988). De igual forma la secuencia de *chvA* revela que su producto génico puede incluirse perfectamente en esta familia de proteínas de transporte (Cangelosi *et al.*, 1989). Estudios bioquímicos en mutantes *chvA* ponen de manifiesto que pese a conservar actividad la proteína intermediaria de 235 KDa, la bacteria no secreta el β -1,2 glucano sino que acumula una molécula alterada del mismo. (Iñón de Iannino y Ugalde, 1989).

Los β -1,2 glucanos cíclicos producidos por *Agrobacterium* y *Rhizobium* son muy similares a los oligosacáridos derivados de membrana (MDO) de *E. coli* en cuanto a su localización, tamaño molecular y tipo de uniones. Miller *et al.* (1986) han sugerido un papel general para los oligosacáridos periplásmicos a nivel de adaptación osmótica en bacterias gram negativas. Dylan *et al.* (1990a) han demostrado que cuando *R. meliloti* se cultiva en un medio de baja osmolaridad acumula β -1,2 glucano en el periplasma. Los mutantes *ndv* que no pueden acumularlo, cuando se cultivan en condiciones de baja osmolaridad reducen su tasa de crecimiento y sufren una serie de cambios fenotípicos indicativos de una superficie celular alterada. Por ejemplo, la disminución significativa de la motilidad y del número de flagelos con respecto a la cepa silvestre, así como distinto comportamiento frente a determinados fagos y antibióticos hidrófobos. Cangelosi *et al.* (1990) han observado estos mismos fenómenos en mutantes *chv* de *Agrobacterium*. Cuando los mutantes *ndv* o *chv* se cultivan en medios de alta osmolaridad, desaparecen los cambios fenotípicos superficiales pero no se recupera la capacidad simbiótica o la virulencia.

Actualmente no se conoce la implicación directa del β -1,2 glucano en la simbiosis. Podría pensarse que se trata de una señal molecular que puede requerirse una vez que la bacteria penetra en la planta ya que esta molécula se puede encontrar también en el fluido extracelular. Sin embargo, existen indicios que sugieren que el β -1,2 glucano, *per se*, no es necesario para la simbiosis como es el hecho del aislamiento de pseudorevertientes de mutantes *ndvB* que no producen el oligosacárido y en cambio forman nódulos fijadores de nitrógeno (Dylan *et al.*, 1990b).

En la simbiosis *R. trifolii*-trébol se ha comprobado que la adición de β -1,2 glucano incrementa la cinética de nodulación y estimula la formación de cordones de infección aunque se usaron niveles mucho más elevados que los que se encuentran normalmente en el sobrenadante de los cultivos (Abe *et al.*, 1982). En el caso de *R. meliloti* la adición de β -1,2 glucano durante la inoculación de la semilla con la cepa silvestre también aumenta la cinética de nodulación y dobla el número de nódulos. En cambio la adición del oligosacárido en la inoculación con mutantes *ndv* no corrige su defecto simbiótico, aunque esto no puede excluir la posibilidad de que sea necesaria una secreción localizada de β -1,2 glucano en algún momento posterior a la entrada en la planta. Estos datos sugieren que esta molécula no es absolutamente esencial para una nodulación efectiva pero puede estar implicada en la eficiencia del proceso (Dylan *et al.*, 1990b).

GENES IMPLICADOS EN LA FIJACION DE NITROGENO Y EL METABOLISMO DEL BACTEROIDE.

Una vez que la bacteria ha invadido con éxito el tejido del nódulo y se encuentra en el citoplasma de la célula vegetal, deben darse una serie de condiciones bioquímicas y fisiológicas para que tenga lugar la fijación de nitrógeno. La primera de ellas y quizás la más importante es el hecho de que el enzima nitrogenasa se inactiva de manera irreversible por el oxígeno mientras que los rizobios son aerobios obligados. La segunda es el consumo masivo de ATP por parte del bacteroide durante la fijación de nitrógeno. Y la tercera es

que la bacteria necesita de un aporte constante de nutrientes inorgánicos y compuestos carbonados y de un flujo hacia la planta de amonio que debe ser asimilado por ésta eficientemente.

Se ha identificado un gran número de genes que intervienen en estas últimas etapas del establecimiento de la simbiosis. Son los genes estructurales de la nitrogenasa, genes implicados en la síntesis y procesamiento de cofactores y donadores de electrones, así como genes relacionados con la diferenciación del bacteroide y la síntesis del grupo hemo para la producción de leghemoglobina. La leghemoglobina es una proteína específica del nódulo que actúa como regulador de la concentración de oxígeno (Appleby, 1984). Se produce de forma coordinada por la bacteria y por la planta; la planta aporta la apoproteína y la bacteria el grupo hemo (Leong *et al.*, 1982; Guerinot y Chelm, 1986). El primer gen en la ruta biosintética del grupo hemo (*hemA*) se ha aislado y caracterizado en *B. japonicum* (Mc Clung *et al.*, 1987; Somerville y Chelm, 1988).

La localización y organización de los genes *nif* y *fix* es muy variada. En *R. meliloti* los genes *nif* estructurales y otros genes *nif* y *fix* están localizados en varios "clusters" dispersos a lo largo de una región de 200 Kb del pSym. En *R. leguminosarum*, *R. trifolii* y *R. phaseoli* se presentan más estrechamente ligados los genes *nif* y *fix*, y en *Bradyrhizobium* se localizan en el cromosoma como el resto de los genes simbióticos. Los genes *nod* se encuentran ligados normalmente a uno de los "clusters" *nif-fix*. Los mutantes en genes *nif* y *fix* son capaces de inducir la formación del nódulo, pero estos nódulos no fijan nitrógeno.

Los genes estructurales de la nitrogenasa, *nifHDK*, se identificaron en base a su homología con los genes *nif* de *Klebsiella* (Ruvkun y Ausubel, 1980; Prakash *et al.*, 1981; Corbin *et al.*, 1982) y se han encontrado en todas las estirpes de *Rhizobium*, *Azorhizobium* y *Bradyrhizobium*. Otros genes descritos en *R. meliloti*, *R. leguminosarum* y *B. japonicum* son *nifN*, *nifE* y *nifB* que participan en la síntesis del cofactor de hierro-molibdeno (FeMoco) (Buikema *et al.*, 1987; Ebeling *et al.*, 1987; Hontelez *et al.*, 1987). En *B. japonicum* la organización de los genes *nif* es característica, ya que *nifH* se presenta por separado del operón *nifDK* (Kaluza *et al.*,

1983). Otro caso particular interesante es el de *R. phaseoli* que presenta múltiples copias de los genes *nif* (Quinto *et al.*, 1985; Soberón-Chávez *et al.*, 1986). Entre los genes *nif* se encuentra como elemento importante el gen *nifA* que actúa activando la transcripción del operón *nifHDK* y otros operones (Szeto *et al.*, 1987).

Otros genes que se requieren para la fijación simbiótica de nitrógeno y no tienen su equivalente en *K. pneumoniae* son *fixABC* (Fuhrmann *et al.*, 1985; Earl *et al.*, 1987; Grönger *et al.*, 1987), *fixF* (Aguilar *et al.*, 1985), *fixGHI* (Kahn *et al.*, 1989), *fixR* (Thony *et al.*, 1987), *fixK* y *fixN* (Renalier *et al.*, 1987; Batut *et al.*, 1989) y los genes reguladores *fixLJ* (David *et al.*, 1988). La activación simbiótica de los genes *nif* en *R. meliloti* es bien distinta a la activación de los genes *nif* en *K. pneumoniae*; aunque en ambos casos esta activación es dependiente de *nifA*. En *R. meliloti*, *nifA* no es activado por *ntrC* (Szeto *et al.*, 1987), la expresión de *nifA* es dependiente de la existencia de bajos niveles de oxígeno (Ditta *et al.*, 1987) cuyo efecto es mediado por genes *fix* (David *et al.*, 1987, 1988; Virts *et al.*, 1988). Estos genes *fix* se han secuenciado e identificado como dos genes, *fixL* y *fixJ*, cuyos productos pertenecen a la clase de proteínas reguladoras que actúan conjuntamente. Una como sensor de modificaciones del medio (FixL) que transmite una señal al componente regulador (FixJ) que a su vez origina la respuesta normalmente a nivel transcripcional (Nixon *et al.*, 1986; David *et al.*, 1988). El operón *fixLJ* está situado en el megaplásmido simbiótico pero distante del "cluster" *nod-nif*. Hertig *et al.* (1989) han demostrado que FixJ es el activador transcripcional de *fixK* y *nifA*. La activación de la expresión de ambos genes responde a los niveles de oxígeno. Por tanto la hipótesis más acertada sería que FixL fuese un sensor de la concentración de oxígeno. Philip *et al.* (1990) usando *E. coli* como un hospedador heterólogo han puesto de manifiesto que en presencia de FixL, la activación de los promotores de *fixK* y *nifA* mediada por FixJ responde a condiciones de microaerobiosis, ésto indica que FixL es un sensor de oxígeno.

Mediante mutagénesis al azar con Tn5 seguida de ensayo en planta, se han identificado otros loci *fix* de localización tanto plasmídica como cromosómica, que controlan el desarrollo del

nódulo (Forrai *et al.*, 1983; Kondorosi *et al.*, 1984). Putnoky *et al.* (1988) estudiando 64 mutantes *Fix⁻* de *R. meliloti*, obtenidos por este sistema, han descrito cuatro loci *fix* (*fix2*, *fix23*, *fix525* y *fix2153*) cuyas mutaciones conducen a la falta de expresión de nodulinas tardías. Recientemente Putnoky *et al.* (1990) han demostrado que la región *fix23* está implicada en la síntesis de lipopolisacárido (LPS). Las mutaciones en esta región originan mutantes *Fix⁻* en la estirpe AK631, un derivado de *R. meliloti* 41 deficiente en la síntesis de exopolisacárido (EPS). Sin embargo estas mutaciones no afectan el fenotipo en planta de la cepa silvestre; lo que implica la necesidad de la doble mutación para detectar el fenotipo *Fix⁻*. Estos resultados parecen indicar que el EPS y el LPS proporcionan una información equivalente a la planta hospedadora.

Otros loci que intervienen en el funcionamiento perfecto de la simbiosis son los responsables del transporte de ácidos dicarboxílicos tales como fumarato, malato y succinato. Los mutantes de distintos rizobios en estos loci denominados *dct* ("dicarboxilic transport") inducen la formación de nódulos no fijadores de nitrógeno (Ronson *et al.*, 1984; Engelke *et al.*, 1987; Finan *et al.*, 1988; Watson *et al.*, 1988). Los loci *dct* están localizados en el segundo megaplásmido simbiótico en *R. meliloti* (Finan *et al.*, 1988) y su expresión depende de *ntrA* (Ronson *et al.*, 1987).

BIBLIOGRAFIA:

Abe, M., Amemura, A. y Higashi, S. (1982). Studies on cyclic β -1,2 glucan obtained from the periplasmic space of *Rhizobium trifolii* cells. *Plant Soil*. **64**: 315-324.

Aguilar, O. M., Kapp, D. y Pühler, A. (1985). Characterization of a *Rhizobium meliloti* fixation gene (*fixF*) located near the common nodulation region. *J. Bacteriol.* **164**: 245-254.

Akiyoshi, D. E., Klee, H., Amasino, R. M., Nester, E. W. y Gordon, M. P. (1984). T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 5994-5998.

Aman, P., Mc Neil, H., Fronzen, L., Darvill, A. G. y Albersheim, P. (1981). Structural elucidation using HPLC-MS and GLC-MS of the acidic polysaccharide secreted by *Rhizobium meliloti* strain 1021. *Carbohydr. Res.* **95**: 263-282.

Appelbaum, E. R., Thompson, D. V., Idler, K. y Chartrain, N. (1988). *Rhizobium japonicum* USDA191 has two *nodD* genes that differ in primary structure and function. *J. Bacteriol.* **170**: 12-20.

Appleby, C. A. (1984). Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**: 443-478.

Battisti, L., Lee, C. C. y Leigh, J. A. (1990). Specific forms of exopolysaccharides from *Rhizobium meliloti* restore symbiotic effectiveness to *R. meliloti* *exo* mutants. 5th International Symposium on the Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. Interlaken, Suiza, 1990; p. 164.

Batut, J., Daveran-Mingot, M. -L., David, M., Jacobs, J., Garnerone, A. M. y Kahn, D. (1989). *fixK*, a gene homologous with *fnr* and *cpr* from *Escherichia coli*, regulates nitrogen fixation genes both positively and negatively in *Rhizobium meliloti*. *EMBO J.* **8**: 1279-1286.

Bender, G. L., Goydych, W., Rolfe, B. G. y Nayudu, M. (1987). The role of *Rhizobium* conserved and host specific nodulation genes in

the infection of the non-legume *Parasponia andersonii*. Mol. Gen. Genet. 210: 299-306.

Borthakur, D., Downie, J. A., Johnston, A. W. B. y Lamb, J. W. (1985). *Psi* a plasmid-linked *Rhizobium phaseoli* gene that inhibits exopolisaccharide production and wich is required for symbiotic nitrogen fixation. Mol. Gen. Genet. 200: 278-282.

Borthakur, D., Barber, C. E., Lamb, J. W., Daniels, M. J., Downie, J. A. y Johnston, A. W. B. (1986). A mutation that blocks exopolysaccharide synthesis prevents nodulation of peas by *Rhizobium leguminosarum* but not of beans by *Rhizobium phaseoli* and is corrected by cloned genes from *Rhizobium* or the phytopathogen *Xanthomonas*. Mol. Gen. Genet. 203: 320-323.

Borthakur, D. y Johnston, A. W. B. (1987). Sequence of *psi*, a gene that inhibits exopolysaccharide synthesis and nodulation and demonstration that its transcription is inhibited by *psr*, another gene on the symbiotic plasmid. Mol. Gen. Genet. 207: 149-154.

Buikema, W. J., Klingensmith, J. A., Gibbons, S. L. y Ausubel, F. M. (1987). Conservation of structure and location of *Rhizobium meliloti* and *Klebsiella pneumoniae nifB* genes. J. Bacteriol. 169: 1120-1126.

Callaham, D. A. y Torrey, J. G. (1981). The structural basis for infection of root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium*. Can. J. Bot. 59: 1647-1664.

Cangelosi, G. A., Martinetti, G., Leigh, J. A., Lee, C. C., Theines, C. y Nester, E. W. (1989). Role of *Agrobacterium tumefaciens* ChvA protein in export of β -1,2 glucan. J. Bacteriol. 171: 1609-1615.

Cangelosi, G. A., Martinetti, G. y Nester, E. W. (1990). Osmosensitivity phenotypes of *Agrobacterium tumefaciens* mutants that lack periplasmic β -1,2 glucan. J. Bacteriol. 172: 2172-2174.

Canter-Cremers, H. C. J., Van Brussel, A. A. N., Plazinski, J. y Rolfe, B. G. (1986). Sym plasmid and chromosomal gene products of *Rhizobium trifolii* elicit developmental responses on various legume roots. J. Plant Physiol. 122: 25-40.

Carlson, R. W., Kalembasa, S., Turowski, D., Pachori, P. y Noel, K. D. (1987). Characterization of the lipopolysaccharide from a *Rhizobium phaseoli* mutant that is defective in infection thread development. *J. Bacteriol.* 169: 4923-4928.

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

Cervantes, E., Sharma, S. B., Maillet, F., Vasse, J., Truchet, G. y Rosenberg, C. (1989). The *Rhizobium meliloti* host range *nodQ* genes encodes a protein wich shares homology with translation elongation and initiation factors. *Mol. Microbiol.* 3: 745-755.

Chakravorty, A. K., Zurkowski, W., Shine, J. y Rolfe, B. G. (1982). Symbiotic nitrogen fixation: molecular cloning of *Rhizobium* genes involved in exopolysaccharide synthesis and effective nodulation. *J. Mol. Appl. Genet.* 1: 585-596.

Chen, H., Batley, M., Redmond, J. y Rolfe, B. G. (1985). Alteration of the effective nodulation properties of a fast growing broad host range *Rhizobium* due to changes in exopolysaccharide synthesis. *J. Plant Physiol.* 120: 331-349.

Chen, H., Gray, J. X., Nayudu, M., Djordjevic, M. A., Batley, M., Redmon, J. W. y Rolfe, B. G. (1988). Five genetic loci involved in the synthesis of acidic exopolysaccharides are closely linked in the genome of *Rhizobium* sp. NGR234. *Mol. Gen. Genet.* 212: 310-316.

Corbin, D., Ditta, G. S. y Helinski, D. R. (1982). Clustering of nitrogen fixation (*nif*) genes in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 149: 221-228.

Coronado, C., Megias, M., Ruíz-Berraquero, F. y Palomares, A. J. (1989). Interspecies homology of nodule development genes in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* 59: 289-296.

David, M., Domergue, O., Pognonec, P. y Kahn, D. (1987). Transcription patterns of *Rhizobium meliloti* symbiotic plasmid pSym: identification of *nifA*-independent *fix* genes. *J. Bacteriol.* 169: 2239-2244.

David, M., Daveran, M. L., Batut, J., Dedieu, A., Domergue, O., Ghai, J., Hertig, C., Boistard, P. y Kahn, D. (1988). Cascade regulation of *nif* gen expression in *Rhizobium meliloti*. *Cell* 54: 671-683.

Davis, E. O., Evans, I. J. y Johnston, A. W. B. (1988). Identification of *nodX*, a gene that allows *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* strain TOM to nodulate Afghanistan peas. *Mol. Gen. Genet.* 212: 531-535.

Dazzo, F. B. y Gardiol, A. (1984). Host specificity in *Rhizobium*-legume interactions. En *Genes Involved in Microbe Plant Interactions*. Springer Publishers. New York. pp. 3-31.

Debellé, F., Rosenberg, C., Vasse, J., Maillet, F., Martinez, E., Dénarié, J. y Truchet, G. (1986). Assignment of symbiotic developmental phenotypes to common and specific nodulation (*nod*) genetic loci of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 168: 1075-1086.

Debellé, F. y Sharma, S. B. (1986). Nucleotide sequence of *Rhizobium meliloti* RCR2011 genes involved in host specificity of nodulation. *Nucleic Acids Res.* 14: 7453-7472.

De Maag, R. A., Rao, A. S., Mulders, I. H. M., Goosen de Roo, L., van Loosdrecht, M. C. M., Wijffelman, C. A. y Lugtenberg, B. J. J. (1989). Isolation and characterization of mutants of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 248 with altered lipopolysaccharides: possible role of surface charge or hydrophobicity in bacterial release from the infection thread. *J. Bacteriol.* 171: 1143-1150.

Diebold, R., y Noel, K. D. (1988). *Rhizobium leguminosarum* exopolysaccharide genetics and biovar-dependent role in symbiosis. 4th International Symposium on the Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. Acapulco, Mexico, 1988; p. Ia-8.

Diebold, R., y Noel, K. D. (1989). *Rhizobium leguminosarum* exopolysaccharide mutants: biochemical and genetic analysis and symbiotic behavior on the three hosts. *J. Bacteriol.* 171: 4821-4830.

Ditta, G. S., Virts, E., Palomares, A. y Kim, C. -H. (1987). The *nifA* gene of *Rhizobium meliloti* is oxygen regulated. *J. Bacteriol.* 169: 3217-3223.

Djordjevic, M. A., Schofield, P. R., Ridge, R. W., Morrison, N. A., Bassam, B. J., Plazinski, J., Watson, J. M. y Rolfe, B. G. (1985a). *Rhizobium* nodulation genes involved in root hair curling (Hac) are functionally conserved. *Plant Mol. Biol.* 4: 147-160.

Djordjevic, M. A., Schofield, P. R. y Rolfe, B. G. (1985b). Tn5 mutagenesis of *Rhizobium trifolii* host-specific nodulation genes result in mutants with altered host-range ability. *Mol. Gen. Genet.* 200: 463-471.

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

Djordjevic, S. P., Chen, H., Batley, M., Redmond, J. W. y Rolfe, B. G. (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.

Doherty, D., Leigh, J., Glazebrook, J. y Walker, G. C. (1988). *Rhizobium meliloti* mutants that overproduce the *R. meliloti* acidic calcofluor-binding exopolysaccharide. *J. Bacteriol.* 170: 4249-4256.

Douglas, C. J., Staneloni, R. J., Rubin, R. A. y Nester, E. W. (1985). Identification and genetic analysis of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence region. *J. Bacteriol.* 161: 850-860.

Downie, J. A. (1989). The *nodL* gene from *Rhizobium leguminosarum* is homologous to the acetyl transferases encoded by *lacA* and *cysE*. *Mol. Microbiol.* 3: 1649-1651.

Downie, J. A. y Johnston, A. W. B. (1988). Nodulation of legumes by *Rhizobium*. *Plant Cell Environ.* 11: 403-412.

Dreyfus, B., García, J. L. y Gillis, M. (1988). Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gene. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38:89-98.

Dudley, M. E., Jacobs, T. W. y Long, S. R. (1987). Microscopic studies of cell divisions induced in alfalfa roots by *Rhizobium meliloti*. *Planta* 171: 289-301.

Dylan, T., Ielpi, L., Stanfield, S., Kashyap, L., Douglas, C., Yanofsky, M., Nester, E., Helinski, D. R. y Ditta, G. (1986). *Rhizobium meliloti* genes required for nodule development are related to chromosomal virulence genes in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4403-4407.

Dylan, T., Helinski, D. R. y Ditta, G. S. (1990a). Hypoosmotic adaptation in *Rhizobium meliloti* requires β -(1->2)-glucan. *J. Bacteriol.* 172: 1400-1408.

Dylan, T., Nagpal, P., Helinski, D. R. y Ditta, G. S. (1990b). Symbiotic pseudorevertants of *Rhizobium meliloti ndv* mutants. *J. Bacteriol.* 172: 1409-1417.

Eardly, B. D., Hannaway, D. B. y Bottomley, P. J. (1985). Characterization of rhizobia from ineffective alfalfa nodules: ability to nodulate bean plants (*Phaseolus vulgaris* (L.) Savi.). *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 1422-1427.

Earl, C. D., Ronson, C. W. y Ausubel, F. M. (1987). Genetic and structural analysis of the *Rhizobium meliloti fixA*, *fixB*, *fixC* and *fixX* genes. *J. Bacteriol.* 169: 1127-1136.

Ebeling, S., Hahn, M., Fischer, H. M. y Hennecke, H. (1987). Identification of *nifE*-, *nifN*- and *nifS*-like genes in *Bradyrhizobium japonicum*. Mol. Gen. Genet. 207: 503-508.

Economou, A., Hamilton, W. D. O., Johnston, A. W. B. y Downie, J. A. (1989). The *Rhizobium* nodulation gene *nodO* encodes a Ca²⁺-binding protein that is exported without N-terminal cleavage and is homologous to haemolysin and related proteins. EMBO J. 9: 349-354.

Engelke, T., Jagdish, M. N. y Pühler, A. (1987). Biochemical and genetical analysis of *Rhizobium meliloti* mutants defective in C₄-dicarboxylate transport. J. Gen. Microbiol. 133: 3019-3029.

Finan, T. M., Hirsch, A. M., Leigh, J. A., Johansen, E., Kuldau, G. A., Deegan, S., Walker, G. C. y Signer, E. R. (1985). Symbiotic mutants of *Rhizobium meliloti* that uncouple plant from bacterial differentiation. Cell 40: 869-877.

Finan, T. M., Kunkel, B., De Vos, G. F. y Signer, E. R. (1986). Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. J. Bacteriol. 167: 66-72.

Finan, T. M., Oresnik, I. y Bottacin, A. (1988). Mutants of *Rhizobium meliloti* that are defective in succinate metabolism. J. Bacteriol. 170: 3396-3403.

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

Fisher, R. F., Tu, J. K. y Long, S. R. (1985). Conserved nodulation genes in *R. meliloti* and *R. trifolii*. Appl. Environ. Microbiol. 49: 1432-1435.

Fisher, R. F., Brierley, H. L., Mulligan, J. T. y Long, S. R. (1987). Transcription of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. Identification of a *nodD* transcription initiation site "in vitro" and "in vivo". J. Biol. Chem. 262: 6849-6855.

Fisher, R. F., Egelhoff, T. T., Mulligan, J. T. y Long, S. R. (1988). Specific binding of proteins from *Rhizobium meliloti* cell-free extracts containig NodD to DNA sequences upstream of inducible nodulation genes. *Genes Dev.* 2: 282-293.

Forrai, T., Vincze, E., Banfalvi, Z., Kiss, G. B., Randhawa, G. S. y Kondorosi, A. (1983). Localization of symbiotic mutations in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 153: 635-643.

Fuhrmann, M., Fischer, H. M. y Hennecke, H. (1985). Mapping of *Rhizobium japonicum* *nifB*, *fixBC*, and *fixA*-like genes and identification of the *fixA* promoter. *Mol. Gen. Genet.* 199: 315-322.

Geremia, R. A., Cavaignac, S., Zorreguieta, A., Toro, N., Olivares, J. y Ugalde, R. A. (1987). A *Rhizobium meliloti* mutant that forms ineffective pseudonodules in alfalfa produces exopolysaccharide but fails to form $\beta(1,2)$ glucan. *J. Bacteriol.* 169: 880-884.

Glazebrook, J. y Walker, G. C. (1989). A novel exopolysaccharide can function in place of the calcofluor-binding exopolysaccharide in nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *Cell* 56: 661-672.

Gray, J. X., Djordjevic, M. A. y Rolfe, B. G. (1990). Two genes that regulate exopolysaccharide production in *Rhizobium* sp. strain NGR234: DNA sequences and resultant phenotypes. *J. Bacteriol.* 172: 193-203.

Grönger, P., Manian, S. S., Reilander, H., O'Connell, M., Priefer, U. B. y Pühler, A. (1987). Organization and partial sequence of a DNA region of the *Rhizobium leguminosarum* symbiotic plasmid pRL6JI containing the genes *fixABC*, *nifA*, *nifB* and a novel open reading frame. *Nucleic Acids Res.* 15: 31-49.

Guerinot, M. L. y Chelm, B. K. (1986). Bacterial δ -aminolevulinic acid synthetase activity is not essential for leghemoglobin formation in the soybean/*Bradyrhizobium japonicum* symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 1837-1841.

Györgypal, Z., Iyer, N. y Kondorosi, A. (1988). Three regulatory *nodD* alleles of diverged flavonoid-specificity are involved in host-

dependent nodulation by *Rhizobium meliloti*. Mol. Gen. Genet. 212: 85-92.

Haaker, H., y Veeger, C. „April 1984. Enzymology of nitrogen fixation. TIBS „: pp. 188-192.

Henikoff, S., Haughn, G. W., Calvo, J. M. y Wallace, J. C. (1988). A large family of bacterial activators proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 6602-6606.

Hertig, C., Li, R. Y., Louarn, A. -M., Garnerone, A. M., David, M., Batut, J., Kahn, D. y Boistard, P. (1989). *Rhizobium meliloti* regulatory gene *fixJ* activates transcription of *R. meliloti nifA* and *fixK* genes in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 171: 1736-1738.

Hirsch, A. M., Bhuvanewari, T. V., Torrey, J. G. y Bisseling, T. (1989). Early nodulin genes are induced in alfalfa root outgrowths elicited by auxin transport inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1244-1248.

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

Hontelez, J., Lankhorst, R. K., Jansma, J.D., Jacobsen, E., van den Bos, R. C. y van Kammen, A. (1987). Characterization of symbiotic genes and regulation of their expression in *Rhizobium leguminosarum* PRE. En Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. Verma, D. P. S. y Brisson, N. (eds.). Martinus Nijhoff. Dordrecht-The Netherlands. pp. 241-243.

Horvath, B., Kondorosi, E., John, M., Schmidt, J., Török, I., Györgypal, Z., Barabas, I., Wieneka, U., Schell, J. y Kondorosi, A. (1986). Organization structure and symbiotic function of *Rhizobium meliloti* nodulation genes determining host specificity for alfalfa. Cell 46: 335-343.

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

Ielpi, L., Dylan, T., Ditta, G. S., Helinski, D. R. y Stanfield, S. W. (1990). The *ndvB* locus of *Rhizobium meliloti* encodes a 319 kDa protein involved in the production of β -(1- \rightarrow 2)-glucan. *J. Biol. Chem.* 265: 2843-2851.

Innes, R. W., Kuempel, P. L., Plazinski, J., Canter-Cremers, H., Rolfe, B. G. y Djordjevic, M. A. (1985). Plant factors induce expression of nodulation and host-range genes in *Rhizobium trifolii*. *Mol. Gen. Genet.* 201: 426-432.

Inze, D., Follin, A., Van Lijsebethens, M., Simoens, C., Genetello, C., Van Montagu, M. y Schell, J. (1984). Genetic analysis of the individual T-DNA genes of *Agrobacterium tumefaciens*; further evidence that two genes are involved in indole-3-acetic acid synthesis. *Mol. Gen. Genet.* 194: 265-274.

Iñon de Iannino, N. y Ugalde, R. A. (1989). Biochemical characterization of avirulent *Agrobacterium tumefaciens chvA* mutants: synthesis and excretion of β -1,2 glucan. *J. Bacteriol.* 171: 2842-2849.

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

Jordan, D. C. (1984). Rhizobiaceae. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Krieg, N. R. y Holt, J. G. (eds.). Williams & Wilkins. Baltimore-London. 1: 234-244.

Kahn, D., David, M., Domergue, O., Daveran, M. L., Ghai, J., Hirsch, P. R. y Batut, J. (1989). *Rhizobium meliloti fixGHI* sequence predicts involvement of a specific cation pump in symbiotic nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* 171: 929-939.

Kaluza, K., Fuhrmann, M., Hahn, M., Regensburger, B. y Hennecke, H. (1983). In *Rhizobium japonicum* the nitrogenase genes *nifH* and *nifDK* are separated. *J. Bacteriol.* 155: 915-918.

Kim, C. -H., Tully, R. E. y Keister, D. L. (1989). Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium fredii* HH303 wick are symbiotically effective. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1852-1854.

Klee, H.J., White, F. F., Iyer, V. N., Gordon, M. P. y Nester, E. W. (1983). Mutational analysis of the virulence region of an *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *J. Bacteriol.* 153: 878-883.

Kondorosi, E., Banfalvi, Z. y Kondorosi, A. (1984). Physical and genetic analisis of a symbiotic region of *Rhizobium meliloti*: identification of nodulation genes. *Mol. Gen. Genet.* 193: 445-452.

Kondorosi, E. y Kondorosi, A. (1986). Nodule induction on plant roots by *Rhizobium*. *Trends Biochem. Sci.* 11: 296-299.

Kondorosi, E., Gyuris, J., Schmidt, J., John, M., Duda, E., Hoffman, B., Schell, J. y Kondorosi, A. (1989). Positive and negative control of *nod* gene expression in *Rhizobium meliloti* is required for optimal nodulation. *EMBO J.* 8: 1331-1340.

Kosslak, R. M., Bookland, R., Barkei, J., Parren, H. E. y Appelbaum, E. R. (1987). Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common *nod* genes by isoflavones isolated from *Glycine max*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7428-7432.

Leigh, J. A., Signer, E. R. y Walker, G. C. (1985). Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6231-6235.

Leigh, J. A., Reed, J. W., Hanks, J. F., Hirsch, A. M. y Walker, C. G. (1987). *Rhizobium meliloti* mutants that fail to succinylate their calcofluor-binding exopolysaccharide are defective in nodule invasion. *Cell* 51: 579-587.

Leong, S. A., Ditta, G. S. y Helinski, D. R. (1982). Heme biosynthesis in *Rhizobium*. Identification of a cloned gene coding for δ -aminolevulinic acid synthetase from *Rhizobium meliloti*. *J. Biol. Chem.* 257: 8724-8730.

Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J. C. y Dénarié, J. (1990). Symbiotic host-specificity of *Rhizobium*

meliloti is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 344: 781-784.

Lewin, A., Rosenberg, C., Meyer, H., Wong, C. H., Nelson, L., Manen, J. F., Stanley, J., Dowling, D. N., Denarié, J. y Broughton, W. J. (1987). Multiple host-specificity loci of the broad host range *Rhizobium* sp. NGR234 selected using the widely compatible legume *Vigna unguiculata*. *Plant. Mol. Biol.* 8: 447-459.

Long, S., Mc Cune, S. y Walker, G. C. (1988a). Symbiotic loci of *Rhizobium meliloti* identified by random *TnphoA* mutagenesis. *J. Bacteriol.* 170: 4257-4265.

Long, S., Reed, J. W., Himawan, J. y Walker, G. C. (1988b). Genetic analysis of a cluster of genes required for synthesis of the calcofluor-binding exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 170: 4239-4248.

Long, S. R. (1984). Genetics of *Rhizobium* nodulation. En *Plant Microbe Interactions*. Kosuge, T. y Nester, E. (eds.). Macmillan. New York. pp. 265-306.

Long, S. R. (1989a). *Rhizobium*-legume nodulation: Life together in the underground. *Cell* 56: 203-214.

Long, S. R. (1989b). *Rhizobium* genetics. *Annu. Rev. Genet.* 23: 483-506.

Long, S. R. y Cooper, J. (1988). Overview of symbiosis. En *Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. Palacios, R. y Verma, D. P. S. (eds.). APS Press. St. Paul-Minnesota. pp. 163-178.

Maier, R. J. y Brill, W. J. (1978). Involvement of *Rhizobium japonicum* O antigen in soybean nodulation. *J. Bacteriol.* 133: 1295-1299.

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

Martinez, E., Romero, D. y Palacios, R. (1990). The *Rhizobium* genome. *Plant Sciences* 9: 59-93.

Marvel, D. J., Kuldau, G., Hirsch, A., Richards, E., Torrey, J. G. y Ausubel, F. M. (1985). Conservation of nodulation genes between *Rhizobium meliloti* and a slow-growing *Rhizobium* strain that nodulates a nonlegume host. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5841-5845.

Mc Clung, C. R., Somerville, J. E., Guerinot, M. L. y Chelm, B. K. (1987). Structure of the *Bradyrhizobium japonicum* gene *hemA* encoding δ -aminolevulinic acid synthetase. *Gene* 54: 133-139.

Miller, K. J., Kennedy, E. P. y Reinhold, V. N. (1986). Osmotic adaptation by gram-negative bacteria: possible role for periplasmic oligosaccharides. *Science* 231: 48-51.

Müller, P., Enenkel, B., Hilleman, A., Kapp, D., Keller, M., Quandt, J. y Pühler, A. (1988a). Genetic analysis of two DNA regions of the *Rhizobium meliloti* genome involved in the infection process of alfalfa nodules. En *Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. Palacios, R. y Verma, D. P. S. (eds.). APS Press. St. Paul-Minnesota. pp. 26-32.

Müller, P., Hynes, M., Kapp, D., Niehaus, K. y Pühler, A. (1988b). Two classes of *Rhizobium meliloti* infection mutants differ in exopolysaccharide production and in coinoculation properties with nodulation mutants. *Mol. Gen. Genet.* 211: 17-26.

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

Newcomb, W. (1981). Nodule morphogenesis. *International Review of Cytology*. Supplement 13. Bourne, G. H. y Danielli, J. F. (eds.). Academic Press. New York. pp. 246-298.

Nixon, B. T., Ronson, C. W. y Ausubel, F. M. (1986). Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 7850-7854.

Noel, K. D., Vandenbosch, K. A. y Kulpaca, B. (1986). Mutations in *Rhizobium phaseoli* that lead to arrested development of infection threads. J. Bacteriol. 169: 1392-1401.

Peters, N. K., Frost, J. W. y Long, S. R. (1986). A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. Science 233: 917-1008.

Peters, N. K. y Long, S. R. (1988). *Rhizobium meliloti* nodulation gene inducers and inhibitors. Plant Physiol. 88: 396-400.

Philip, P., Batut, J. y Boistard, P. (1990). *Rhizobium meliloti* FixL is an oxygen sensor and regulates *R. meliloti* *nifA* and *fixK* genes differently in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 172: 4255-4262.

Postgate, J. R. (1982). The fundamentals of nitrogen fixation. Cambridge Univ. Press. London.

Prakash, R. K., Schilperoort, R. A. y Nuti, M. P. (1981). Large plasmids of fast-growing rhizobia: homology studies and location of structural nitrogen fixation (*nif*) genes. J. Bacteriol. 145: 1129-1136.

Priefer, U. B. (1989). Genes involved in lipopolysaccharide production and symbiosis are clustered on the chromosome of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39. J. Bacteriol. 171: 6161-6168.

Putnoky, P., Grosskopf, E., Cam Ha, D. T., Kiss, G. B. y Kondorosi, A. (1988). *Rhizobium fix* genes mediate at least two communication steps in symbiotic nodule development. J. Cell Biol. 106: 597-607.

Putnoky, P., Petrovics, G., Kereszt, A., Grosskopf, E., Cam Ha, D., Banfalvi, Z. y Kondorosi, A. (1990). *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharide and exopolysaccharide can have the same

function in the plant-bacterium interaction. *J. Bacteriol.* **172**: 5450-5458.

Puvanesarajah, V., Schell, F. M., Gerhold, D. y Stacey, G. (1987). Cell surface polysaccharides from *Bradyrhizobium japonicum* and a non-nodulating mutant. *J. Bacteriol.* **169**: 137-141.

Quinto, C., de la Vega, H., Flores, M., Leemans, J., Cevallos, M. A., Pardo, M. A., Azpiroz, R., de Lourdes Girard, M., Calva, E. y Palacios, R. (1985). Nitrogenase reductase: a functional multigene family in *Rhizobium phaseoli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 1170-1174.

Redmond, J. W., Batley, M., Djordjevic, M. A., Innes, R. W., Kuempel, P. L. y Rolfe, B. G. (1986). Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*. *Nature* **323**: 632-634.

Renalier, M. H., Batut, J., Ghai, J., Terzaghi, B., Gherardi, M., David, M., Garnerone, A. M., Vasse, J., Truchet, G., Huguet, T. y Boistard, P. (1987). A new symbiotic cluster on the pSym megaplasmid of *Rhizobium meliloti* 2011 carries a functional *fix* gene repeat and a *nod* locus. *J. Bacteriol.* **169**: 2231-2238.

Ridge, R. W. y Rolfe, B. G. (1986). *Rhizobium* sp. degradation of legume root hair cell wall at the site of infection thread origin. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 717-720.

Rodriguez-Quiñones, F., Banfalvi, Z., Murphy, P. y Kondorosi, A. (1987). Interspecies homology of nodulation genes in *Rhizobium*. *Plant Mol. Biol.* **8**: 61-75.

Rolfe, B. G. y Gresshoff, P. M. (1988). Genetic analysis of legume nodule initiation. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **39**: 297-319.

Ronson, C. W., Astwood, P. M. y Downie J. A. (1984). Molecular cloning and genetic organization of 4-carbon dicarboxylate transport genes from *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.* **160**: 903-909.

Ronson, C. W., Nixon, B. T., Albright, L. M. y Ausubel, F. M. (1987). *Rhizobium meliloti ntrA (rpoN)* gene is required for diverse metabolic functions. *J. Bacteriol.* 169: 2424-2431.

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

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

Ruvkun, G. B. y Ausubel, F. M. (1980). Interspecies homology of nitrogenase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 191-195.

Schroeder, G., Waffenschmidt, S., Weiler, E. W. y Schroeder, J. (1984). The T-region of Ti plasmids codes for an enzyme synthesizing indole-3-acetic acid. *Eur. J. Biochem.* 138: 387-391.

Schwedock, J. y Long, S. R. (1989). Nucleotide sequence and proteins products of two new nodulation genes of *Rhizobium meliloti nodP* and *nodQ*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4: 181-194.

Signer, E. R., Sharma, S. B., Williams, M. N. V., Bent, A., Clover, R., Wacks, D. B., Kieber, J. y Klein, S. (1988). Search for new symbiotic genes in *Rhizobium meliloti*. En *Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. Palacios, R. y Verma, D. P. S. (eds.). APS Press. St. Paul-Minnesota. pp. 20-25.

Soberón-Chávez, G., Nájera, R., Olivera, H. y Segovia, L. (1986). Genetic rearrangements of a *Rhizobium phaseoli* symbiotic plasmid. *J. Bacteriol.* 167: 487-491.

Somerville, J. E. y Chelm, B. K. (1988). Regulation of heme biosynthesis in *Bradyrhizobium japonicum*. En *Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. Palacios, R. y Verma, D. P. S. (eds.). APS Press. St. Paul-Minnesota. pp. 111-112.

Spaink, H. P., Okker, R. J. H., Wijffelman, C. A., Tak, T., Goosen de Roo, L., Pees, E., Van Brussel, A. A. N. y Lugtenberg, B. J. J. (1989).

Symbiotic properties of rhizobia containing a flavonoid-independent hybrid *nodD* product. *J. Bacteriol.* 171: 4045-4053.

Stanfield, S. W., Ielpi, L., O'Brochta, D., Helinski, D. R. y Ditta, G. (1988). The *ndvA* gene product of *Rhizobium meliloti* is required for β -(1->2)-glucan production and has homology to the ATP-binding export protein HlyB. *J. Bacteriol.* 170: 3523-3530.

Sutherland, I. W. (1985). Biosynthesis and composition of gram negative bacterial extracellular and wall polysaccharides. *Ann. Rev. Microbiol.* 39: 243-270.

Szeto, W. W., Nixon, B. T., Ronson, C. W. y Ausubel, F. M. (1987). Identification and characterization of the *Rhizobium meliloti ntrC* gene: *R. meliloti* has separate regulatory pathways for activation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic cells. *J. Bacteriol.* 169: 1423-1432.

Thony, B., Fischer, H. M., Anthamatten, D., Bruderer, T. y Hennecke, H. (1987). The symbiotic nitrogen fixation regulatory operon (*fixR nifA*) of *Bradyrhizobium japonicum* is expressed aerobically and is subject to a novel, *nifA*-independent type of activation. *Nucleic Acids Res.* 15: 8479-8499.

Trinick M. J., y Galbraith, J. (1980). The *Rhizobium* requirements of the non-legume *Parasponia* in relation to the cross-inoculation group concept of legumes. *New Phytol.* 86: 17-26.

Truchet, G., Debelle, F., Vasse, J., Terzaghi, B., Garnerone, A. M., Rosenberg, C., Batut, J., Maillet, F. y Dénarié, J. (1985). Identification of a *Rhizobium meliloti* 2011 pSym region controlling the host specificity of root hair curling and nodulation. *J. Bacteriol.* 164: 1200-1210.

Turgeon, B. G. y Bauer, W. D. (1985). Ultrastructure of infection thread development during the infection of soybean by *Rhizobium japonicum*. *Planta* 163: 328-349.

Van Brussel, A. A. N., Zaat, S. A. J., Canter-Cremers, H. C. J., Wijffelman, A., Pees, E., Tak, T. y Lugtenberg, B. J. J. (1986). Role of plant root exudate and sym plasmid-localized nodulation genes in

the synthesis by *Rhizobium leguminosarum* of TSR factor which causes thick and short roots on common vetch. *J. Bacteriol.* **165**: 517-522.

Vandenbosch, K.A., Noel, K. D., Kaneko, Y. y Newcomb, E. H. (1985). Nodule initiation elicited by noninfective mutants of *Rhizobium phaseoli*. *J. Bacteriol.* **162**: 950-959.

Vincent, J. M. (1970). A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. International Biological Programme. Handbook N° 12. Blackwell Scientific. Oxford.

Virts, E. L., Stanfield, S. W., Helinski, D. R. y Ditta, G. S. (1988). Common regulatory elements control symbiotic and microaerobic induction of *nifA* in *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 3062-3065.

Watson, J. M. y Schofield, P. R. (1985). Species specific, symbiotic plasmid-located repeated DNA sequences in *Rhizobium trifolii*. *Mol. Gen. Genet.* **199**: 279-289.

Watson, R. J., Chan, Y. -H., Wheatcroft, R., Yang, A. -F. y Han, S. (1988). *Rhizobium meliloti* genes required for C₄-dicarboxylate transport and symbiotic nitrogen fixation are located on a megaplasmid. *J. Bacteriol.* **170**: 927-934.

Williams, M. N. V., Hollingsworth, R. I., Klein, S. y Signer, E. R. (1990). The symbiotic defect of *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide mutants is suppressed by *lpsZ*⁺, a gene involved in lipopolysaccharide biosynthesis. *J. Bacteriol.* **172**: 2622-2632.

Yao, P. Y. y Vincent, J. M. (1969). Host specificity in the root hair "curling factor" of *Rhizobium* sp. *Aust. J. Biol. Sci.* **22**: 413-423.

York, W. S., Mc Neil, M., Darvill, A. G. y Albersheim, P. (1980). Beta-2-linked glucans secreted by fast-growing species of *Rhizobium*. *J. Bacteriol.* **142**: 243-248.

Zaat, S. A. J., Wijffelman, C. A., Spaink, H. P., Van Brussel, A. A. N., Okker, R. J. H. y Lugtenberg, B. J. J. (1987). Induction of the *nodA*

promoter of *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid PRL1JI by plant flavonones and flavones. *J. Bacteriol.* 169: 198-204.

Zevenhuizen, L. P. T. M. y Scholten-Koerselman, H. J. (1979). Surface carbohydrates of *Rhizobium* I. β -1,2-glucans. *Antonie van Leeuwenhoek* 45: 165-175.

Zhan, H., Gray, J. X., Levery, S. B., Rolfe, B. G. y Leigh, J. A. (1990). Functional and evolutionary relatedness of genes for exopolysaccharide synthesis in *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium* sp. strain NGR234. *J. Bacteriol.* 172: 5245-5253.

Zhan, H. y Leigh, J. A. (1990). Two genes that regulate exopolysaccharide production in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 172: 5254-5259.

Zorreguieta, A., Ugalde, R. A. y Leloir, L. F. (1985). An intermediate in cyclic 1-2 β glucan biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 126: 352-357.

Zorreguieta, A. y Ugalde, R. A. (1986). Formation in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. of a 235-kilodalton protein intermediate in β -D(1,2) glucan synthesis. *J. Bacteriol.* 167: 947-951.

Zorreguieta, A., Geremia, R. A., Cavaignac, S., Cangelosi, G. A., Nester, E. W. y Ugalde, R. A. (1988). Identification of the product of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence gene. *Mol. Plant-Microbe Interactions.* 1: 121-127.

CAPITULO 2.

**Homología interespecífica de genes *ndv* en *Rhizobium*
y *Bradyrhizobium* spp.**

INTRODUCCION.

Una característica común en las bacterias pertenecientes a la familia Rhizobiaceae es la de presentar plásmidos de gran tamaño, que son en parte responsables de los efectos que la bacteria produce en la planta.

En las especies del género *Rhizobium*, la mayoría de los genes que intervienen en el proceso de la nodulación y de la fijación de nitrógeno se encuentran localizados en plásmidos de elevado peso molecular (Nuti *et al.*, 1979; Brewin *et al.*, 1980; Banfalvi *et al.*, 1981; Hooykaas *et al.*, 1981). A estos plásmidos se les ha denominado plásmidos *Sym* por simbióticos.

Aunque los plásmidos simbióticos son los elementos genéticos donde se encuentra localizada la mayor parte de la información necesaria para el establecimiento de la simbiosis, esto no excluye que otros elementos genéticos puedan llevar información simbiótica. De hecho se ha visto que otros loci simbióticos mapean en el cromosoma (Noel *et al.*, 1984; Dylan *et al.*, 1986) o en otros plásmidos (Toro y Olivares, 1986; Finan *et al.*, 1986; Martinez *et al.*, 1987). En especies de *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* la información genética simbiótica yace en el cromosoma (Noti *et al.*, 1985; Van den Eede *et al.*, 1987).

En distintas especies del género *Rhizobium*, se han identificado plásmidos cuyo tamaño molecular oscila entre 90 y 450 MDa. En *Rhizobium meliloti* se han encontrado plásmidos con tamaño molecular estimado alrededor de 1.000 MDa. En *Rhizobium trifolii* RS800 se han descrito tres plásmidos de tamaño molecular 190, 280 y 470 MDa. Resultados recientes (B. Sánchez, sin publicar) obtenidos usando la nueva técnica electroforética de campo pulsante parecen indicar que el plásmido de 470 MDa es doble. Algunas razas de *Bradyrhizobium japonicum* también tienen plásmidos grandes, mientras que otras aparentemente carecen de ellos. Normalmente el número de plásmidos dentro de una especie varía de uno a seis, lo que representa aproximadamente el 25% del total de ADN de *Rhizobium*. Por tanto una elevada proporción de la capacidad codificante de una raza se encuentra en el "pool" extracromosómico.

Mientras que la capacidad de los rizobios para inducir nódulos fijadores de nitrógeno en plantas leguminosas viene determinada por la presencia de plásmidos *Sym*, la formación de tumores en plantas dicotiledóneas por agrobacterias está mediada por plásmidos Ti. Estos plásmidos Ti tienen capacidad codificante para la mayoría de las funciones implicadas en la patogenicidad de *Agrobacterium*. Sin embargo, resultados de mutagénesis han demostrado que genes cromosómicos de *Agrobacterium tumefaciens* son también necesarios para la virulencia (Garfinkel *et al.*, 1980). La región de virulencia cromosómica incluye dos loci distintos denominados *chvA* y *chvB* (Douglas *et al.*, 1985).

En *R. meliloti* se han identificado dos loci esenciales para la simbiosis que han sido designados *ndvA* y *ndvB* relacionados estructural y funcionalmente con *chvA* y *chvB* (Dylan *et al.*, 1986). Mediante análisis por hibridación se han encontrado secuencias homólogas a *chvA* y *chvB* en el genomio de cuatro especies de *Rhizobium* de crecimiento rápido. En las especies *Rhizobium leguminosarum* y *Rhizobium phaseoli* se ha determinado que estas secuencias no se encuentran en el plásmido simbiótico (Dylan *et al.*, 1986).

En el presente Capítulo se muestra la homología interespecífica de genes *ndv* en bacterias pertenecientes a los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* usando como sondas los loci *ndvA* y *ndvB* pertenecientes a *R. meliloti* 102F34. Las hibridaciones se han realizado frente a ADN total de las distintas cepas; se realizaron tres digestiones con tres endonucleasas diferentes para hacer un análisis del número de copias presentes de cada gen. Otro objetivo de nuestro estudio ha sido la determinación de la localización genómica de loci *ndv* en las distintas especies objeto de este trabajo; para ello los plásmidos de las distintas cepas se aislaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se hibridaron posteriormente frente a sondas *ndvA* y *ndvB*.

TABLA 2.1. Bacterias y plásmidos.

A. Estirpes silvestres de <i>Rhizobium</i>		Referencias
<i>R. trifolii</i> RS800		Megias <i>et al.</i> (1988)
<i>R. phaseoli</i> CIAT899		Vargas <i>et al.</i> (en prensa)
<i>R. phaseoli</i> CFN42		Flores <i>et al.</i> (1987)
<i>R. phaseoli</i> 8002		Lamb <i>et al.</i> (1982)
<i>R. meliloti</i> AK631		A. Kondorosi
<i>R. meliloti</i> L5-30		J. Denarié
<i>R. leguminosarum</i> T83K3		A. W. B. Johnston
<i>R. fredii</i> USDA193		Prakash <i>et al.</i> (1984)
<i>Rhizobium</i> sp. NGR234		Trinick (1980)
<i>B. japonicum</i> RCR3407		J. Day

B. Estirpes Nod ⁻ de <i>Rhizobium</i>		
<i>R. trifolii</i> RS636	derivada curada del pSym	Este laboratorio
<i>R. trifolii</i> RS1042	derivada deletada del pSym	Rodríguez-Q. <i>et al.</i> (1989)
<i>R. phaseoli</i> RSP900	derivada curada del pSym	M. Megias
<i>R. phaseoli</i> CFN2001	derivada curada del pSym	R. Palacios

C. Estirpes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>		
A-136	derivada curada pTi ⁻ de C58	Schmidhauser <i>et al.</i> (1985)
GMI9023	derivada curada (pTa ⁻ , pTi ⁻) de la estirpe C58	C. Rosenberg

D. <i>Escherichia coli</i>		
HB101	<i>hsdS</i> , <i>hsdM</i> , <i>pro</i> , <i>leu</i> , <i>thi</i> , <i>gal</i> , <i>lacY</i> , <i>recA</i> , <i>str</i>	G. Ditta

E. Plásmidos		
pTy20	derivado de pUC19 portador del gen <i>ndvB</i> de <i>R. meliloti</i> 102F34	Dylan <i>et al.</i> (1986)
pDOB13	derivado de pUC19 portador del gen <i>ndvA</i> de <i>R. meliloti</i> 102F34	Stanfield <i>et al.</i> (1988)
pPP346	derivado de pLAFR1 portador de <i>hsn</i> y <i>nod</i> comunes de <i>R. meliloti</i> 41	Putnoky <i>et al.</i> (1986)
pCHK57	derivado de pGS926 portador de una fusión LacZ con la región promotora de <i>nifA</i> de <i>R. meliloti</i> 102F34	Ditta <i>et al.</i> (1987)

MATERIAL Y METODOS.

Bacterias y plásmidos.

Las bacterias y plásmidos utilizados en este trabajo se describen en la Tabla 2.1.

Medios y condiciones de cultivo.

Las cepas de *R. meliloti* se cultivaron a 30°C en medio YTA (Orosz *et al.*, 1973). Los restantes rizobios se cultivaron a 30°C en medio TY (Beringer *et al.*, 1974). *Escherichia coli* se cultivó a 37°C en medio LB (Kahn *et al.*, 1979). *A. tumefaciens* se cultivó en medio LB a 30°C. El medio LB en ocasiones se suplementó con 100 µg/ml de ampicilina.

Aislamiento de ADN.

El ADN plasmídico se aisló por el procedimiento de lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979) y posteriormente se purificó mediante gradiente de densidad en cloruro de cesio y bromuro de etidio.

La extracción de ADN genómico total de las cepas de *Rhizobium* y *Agrobacterium* se realizó según describe Better *et al.* (1983). 10 ml de un cultivo de 12 h en medio rico se centrifugaron a 8.000 rpm durante 10 min. Las células se resuspendieron en 2 ml de TE (50 mM Tris-ClH, pH 8.0, 20 mM EDTA). Se añadieron 2.5 ml de Sarkosyl al 2% en TE y 0.5 ml de Pronasa a 5 mg/ml en TE (predigerida a 37°C durante 90 min, conservada a -20°C). Se incubaron a 37°C de 30 a 60 min hasta observar que la lisis era completa, se agitaron vigorosamente durante dos min y se realizó una extracción con fenol saturado con NaCl al 3% y otra con cloroformo. Las muestras se dializaron frente a tampón DSB (6 mM Tris-ClH, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA) durante 24 h, con cuatro o cinco cambios de tampón, a temperatura ambiente. La solución de ADN se transfirió a un tubo de vidrio, se añadió NaCl hasta una concentración final 0.2 M y se precipitó a -20°C añadiendo igual volumen de isopropanol. Después de centrifugar a 10.000 rpm durante 15 min se secó el "pellet" y se disolvió el ADN en 0.5 ml de DSB.

Detección de plásmidos en gel de agarosa.

El ADN plasmídico de las distintas cepas de *Rhizobium* estudiadas, se detectó mediante electroforesis en gel de agarosa por el procedimiento de lisis en el pocillo de Eckhardt (1978), modificado por Rosenberg *et al.* (1982). Los geles horizontales de agarosa se prepararon al 0.6% en tampón TBB (Rosenberg *et al.*, 1982), con el sistema de doble pocillo y se cubrieron con 2 mm de tampón. Los geles se sometieron a electroforesis durante 1 h a 20 V y 3 h a 100 V. Después de teñir el ADN con bromuro de etidio se visualizó a la luz ultravioleta y fotografió.

Enzimas e isótopos.

Las endonucleasas de restricción se compraron a Böehringer Mannheim y se usaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El desoxinucleótido marcado radiactivamente (^{32}P -dCTP) fué suministrado por Amersham.

Análisis de hibridación.

El ADN genómico de las cepas de *Rhizobium* se digirió con distintas endonucleasas, se separó en geles de agarosa al 0.7% y se transfirió a filtros de nitrocelulosa (Millipore.HA, 0.45 μm) mediante el procedimiento de Southern (1975).

Las sondas de ADN preparadas por "nick-translation" (Meade *et al.*, 1982) se hibridaron durante una noche a 37°C en 5XSSC/50% v/v formamida, conteniendo 100 $\mu\text{g/ml}$ de heparina. Posteriormente se lavaron y procesaron para autoradiografía. (1XSSC = 0.15 M cloruro sódico, 0.015 M citrato sódico, pH 7.0).

Los geles horizontales con el ADN plasmídico de las distintas cepas de *Rhizobium* y *Agrobacterium* se usaron para transferencia a filtros de nitrocelulosa e hibridación tal como se ha descrito para el ADN genómico. Después de la electroforesis, el ADN fué hidrolizado parcialmente por depurinación ácida mediante tratamiento del gel durante 15 min en ácido clorhídrico 0.25 M a temperatura ambiente, antes de la desnaturalización alcalina. Esta rotura inducida por ácido ayuda a la transferencia de fragmentos de ADN de gran tamaño.

RESULTADOS.

Como sondas en la hibridación frente a ADN genómico de *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium japonicum* y seis especies diferentes de *Rhizobium*, que se relacionan en la Tabla 2.1, se usaron fragmentos de ADN pertenecientes a los loci *ndvA* y *ndvB* de *Rhizobium meliloti*.

Hibridación con *ndvA*.

La sonda *ndvA* es un fragmento *Sall* de 2.7 Kb, perteneciente al locus *ndvA* de *R. meliloti* 102F34, clonado en el sitio *Sall* de pUC19 (pDOB13, Tabla 2.1).

Como puede observarse en la Figura 2.1, en las seis especies de *Rhizobium* de crecimiento rápido estudiadas se encuentran presentes fragmentos de ADN homólogos a *ndvA*: *Rhizobium trifolii* (líneas 1-3), *Rhizobium meliloti* (líneas 4 y 5), *Rhizobium phaseoli* (líneas 6-9), *Rhizobium leguminosarum* (línea 10), *Rhizobium fredii* (línea 11) y *Rhizobium* sp. NGR234 (línea 13). En la línea 12 se muestra la hibridación de la cepa de crecimiento lento de *Bradyrhizobium japonicum* RCR3407. En las líneas 14 y 15 se observa la hibridación de *ndvA* frente a ADN genómico de *Agrobacterium*.

Se encontraron señales intensas de hibridación para todas las cepas, siendo las más fuertes para *R. meliloti*, *R. trifolii*, *R. fredii* y *B. japonicum*. No se encontraron bandas de hibridación en el ADN genómico de *E. coli* (Tabla 2.2, Figura 2.1).

En la mayoría de las especies está presente una banda única, específica y fuertemente homóloga. Sólo *R. meliloti* AK631 y *Rhizobium* sp. NGR234 presentan más de una banda, presumiblemente debido a reiteración de la secuencia, ya que estas bandas aparecen tras la digestión con tres endonucleasas distintas: *EcoRI*, *HindIII* y *BamHI* (Tabla 2.3, Figura 2.1).

TABLA 2.2. Homología de genes *ndv* en distintas especies de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium* y en *E. coli*.

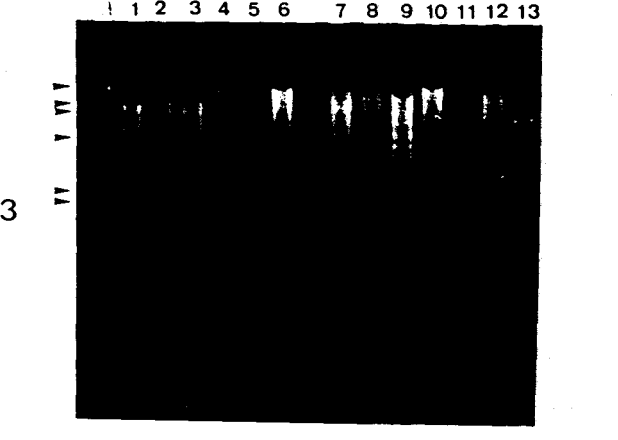
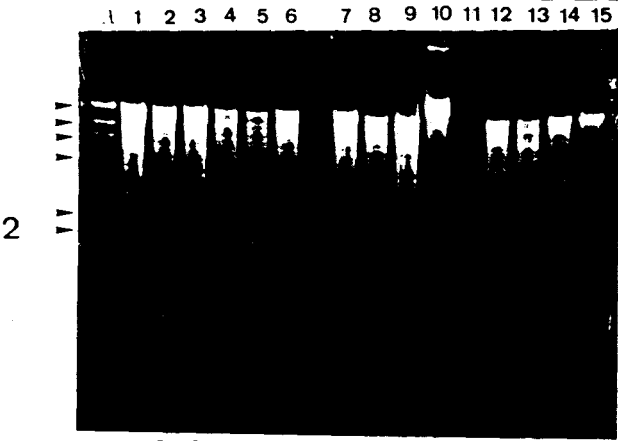
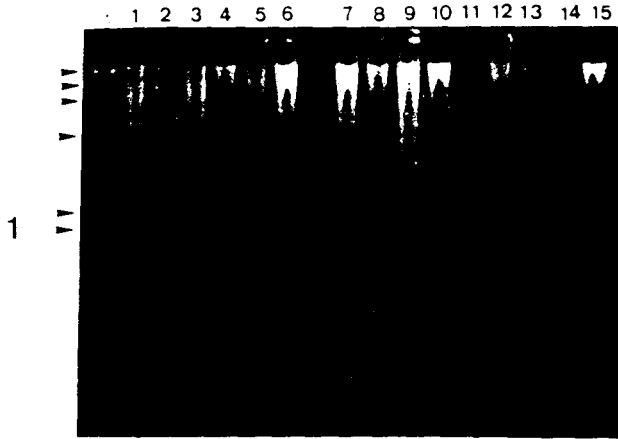
Estirpes	<i>ndvA</i>	<i>ndvB</i>
<i>R. trifolii</i> RS800	++++	++++
<i>R. trifolii</i> RS634	++++	++++
<i>R. trifolii</i> RS1042	++++	++++
<i>R. phaseoli</i> CIAT899	+++	+++
<i>R. phaseoli</i> RSP900	+++	+++
<i>R. phaseoli</i> CFN42	+++	++
<i>R. phaseoli</i> CFN2001	+++	++
<i>R. meliloti</i> L5-30	++++	++++
<i>R. meliloti</i> AK631	++++	++++
<i>R. leguminosarum</i> T83K3	+++	++
<i>R. fredii</i> USDA193	++++	++
<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	+++	++++
<i>B. japonicum</i> RCR3407	++++	+
<i>A. tumefaciens</i> A136	+++	++++
<i>A. tumefaciens</i> GMI9023	+++	++++
<i>E. coli</i> HB101	--	--

+ indica señal de hibridación positiva. El número de cruces hace referencia a la intensidad de la señal.

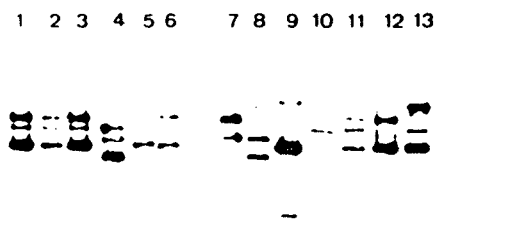
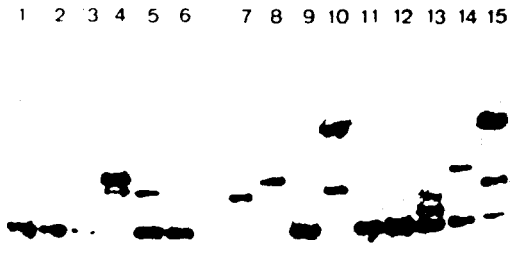
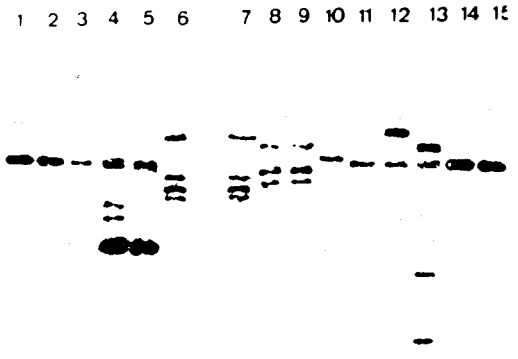
-- indica que no se detecta hibridación.

Figura 2.1. Hibridación de ADN *ndvA* específico perteneciente a *Rhizobium meliloti* 102F34 frente a ADN total de otras especies y cepas de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Agrobacterium*. Panel 1. A: ADN total de las distintas cepas de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Agrobacterium* digerido con *EcoRI*. Línea 1(RS800), línea 2(RS636), línea 3(RS1042), línea 4(AK631), línea 5(L5-30), línea 6 (CIAT899), línea 7(RSP900), línea 8(CFN42), línea 9(CFN2001), línea 10 (T83K3), línea 11(USDA193), línea 12(RCR3407), línea 13(NGR234), línea 14 (A-136), línea 15(GMI9023). B: Autorradiografía del filtro al que se ha transferido el ADN del gel A, tras la hibridación con la sonda *ndvA*. Las puntas de flecha en el margen izquierdo indican los fragmentos obtenidos por digestión de ADN del fago lambda con *HindIII*. Panel 2. A: ADN total de las distintas cepas de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Agrobacterium* digerido con *BamHI*, dispuesto en el mismo orden que en el panel 1. A. B: Hibridación con la sonda *ndvA* de la digestión de ADN total que se muestra en el panel 2. A. Panel 3. A: ADN total de las distintas cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* digerido con *HindIII*, dispuesto en el mismo orden que en el panel 1. A. B: Hibridación con la sonda *ndvA* de la digestión de ADN total que se muestra en el panel 3. A.

A



B



Hibridación con *ndvB*.

La sonda *ndvB* es un fragmento *EcoRI* de 6.2 Kb, que contiene casi la totalidad del locus *ndvB* de *R. meliloti* 102F34, clonado en el sitio *EcoRI* de pUC19 (pTy20, Tabla 2.1).

Con esta sonda se detectó homología en todas las especies y cepas estudiadas, con la excepción de *E. coli* HB101. *R. trifolii*, *R. meliloti*, *Rhizobium* sp. NGR234 y *Agrobacterium* dieron la señal más fuerte; mientras que *R. phaseoli*, *R. leguminosarum*, *R. fredii* y *B. japonicum* presentaron bandas de hibridación de menor intensidad (Tabla 2.2, Figura 2.2).

Salvo para *R. trifolii* y *R. phaseoli* CIAT899 sólo se ha detectado una única copia de *ndvB* en todas las cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (Tabla 2.3, Figura 2.2).

Localización cromosómica de genes *ndv*.

Para demostrar la localización genómica de *ndvA* y *ndvB*, el ADN plasmídico de las distintas especies de *Rhizobium* se separó mediante electroforesis en gel de agarosa. Una vez transferido a filtros de nitrocelulosa se hibridó frente a las sondas *ndvA* y *ndvB* anteriormente descritas, marcadas con ^{32}P -dCTP por "nick-translation". En ninguna de las cepas se encontró hibridación en las bandas de ADN plasmídico. La fuerte homología detectada en los pocillos indica la localización cromosómica de los loci *ndv*.

Como controles positivos de hibridación en plásmido, se usaron una sonda *nifA* y otra *nod* común. En ambos casos se detectó hibridación tanto en el pocillo como en la banda correspondiente al plásmido simbiótico de cada cepa estudiada. La Figura 2.3 muestra las autoradiografías obtenidas para *R. trifolii* RS800 como ejemplo de los resultados señalados.

DISCUSION.

En el presente Capítulo se muestra la homología interespecífica de los genes *ndv* en los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. Estos resultados se han obtenido usando sondas que contienen los genes

TABLA 2.3. Reiteración de genes *ndv* en distintas especies de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*.

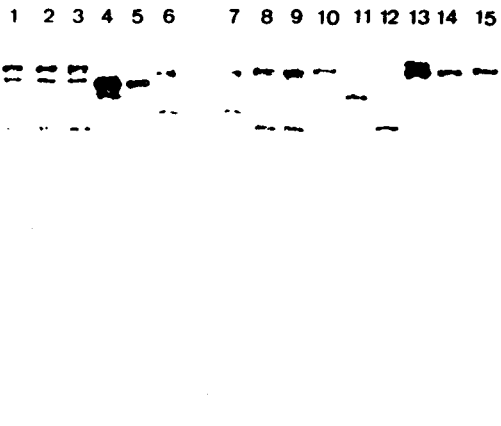
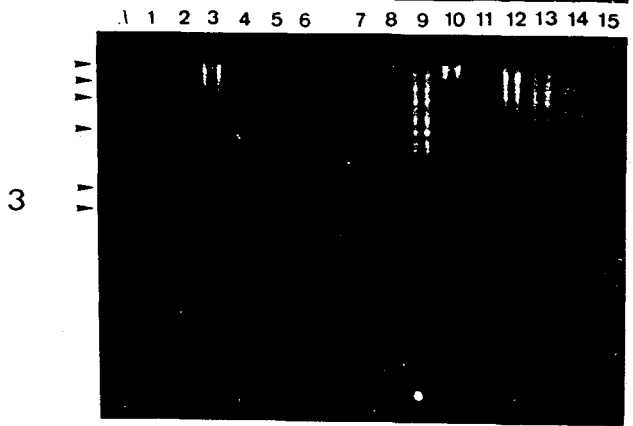
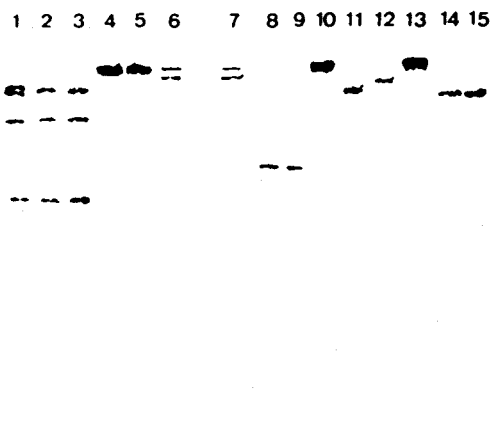
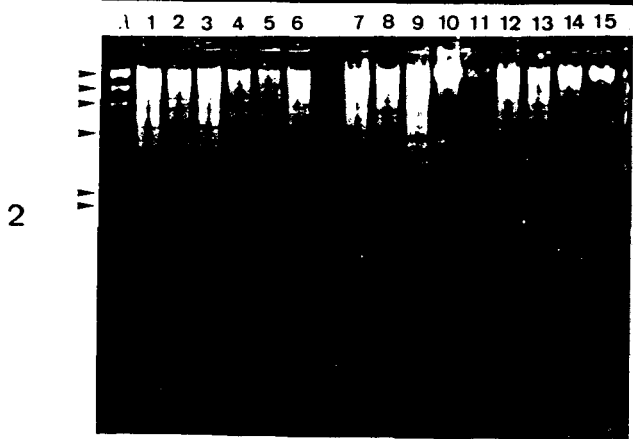
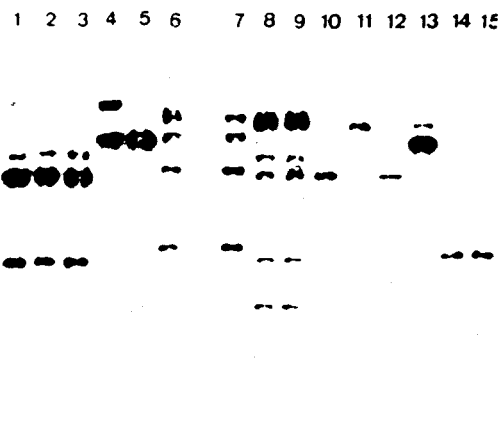
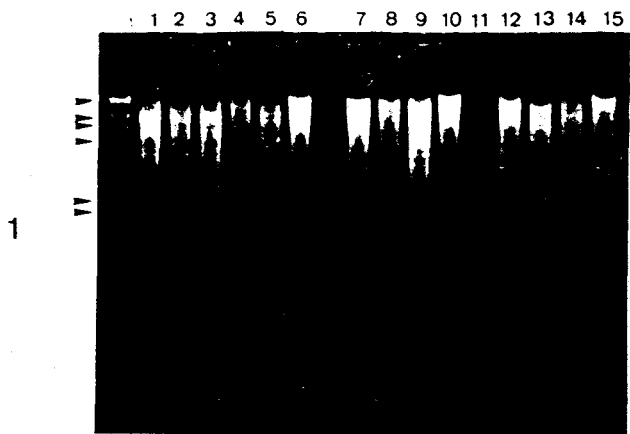
Estirpes	Número de copias de <i>ndvA</i>	Número de copias de <i>ndvB</i>
<i>R. trifolii</i> RS800	1	3
<i>R. phaseoli</i> CFN42	1	1
<i>R. phaseoli</i> CIAT899	1	2
<i>R. meliloti</i> L5-30	1	1
<i>R. meliloti</i> AK631	2	1
<i>R. leguminosarum</i> T83K3	1	1
<i>R. fredii</i> USDA193	1	1
<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	3	1
<i>B. japonicum</i> RCR3407	1	1

Estos valores se obtuvieron mediante hibridación de las sondas *ndvA* y *ndvB* frente a ADN genómico correspondiente a cada una de las cepas estudiadas, digerido con tres endonucleasas diferentes.

Figura 2.2. Hibridación de ADN *ndvB* específico perteneciente a *Rhizobium meliloti* 102F34 frente a ADN total de otras especies y cepas de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Agrobacterium*. Panel 1. A: ADN total de las distintas cepas de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Agrobacterium* digerido con *EcoRI*. Línea 1(RS800), línea 2(RS636), línea 3(RS1042), línea 4(AK631), línea 5(L5-30), línea 6 (CIAT899), línea 7(RSP900), línea 8(CFN42), línea 9(CFN2001), línea 10 (T83K3), línea 11(USDA193), línea 12(RCR3407), línea 13(NGR234), línea 14 (A-136), línea 15(GMI9023). B: Autorradiografía del filtro al que se ha transferido el ADN del gel A, tras la hibridación con la sonda *ndvB*. Las puntas de flecha en el margen izquierdo indican los fragmentos obtenidos por digestión de ADN del fago lambda con *HindIII*. Panel 2. A: ADN total de las distintas cepas de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Agrobacterium* digerido con *BamHI*, dispuesto en el mismo orden que en el panel 1. A. B: Hibridación con la sonda *ndvB* de la digestión de ADN total que se muestra en el panel 2. A. Panel 3. A: ADN total de las distintas cepas de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Agrobacterium* digerido con *HindIII*, dispuesto en el mismo orden que en el panel 1. A. B: Hibridación con la sonda *ndvB* de la digestión de ADN total que se muestra en el panel 3. A.

A

B



ndvA y *ndvB* pertenecientes a *R. meliloti* 102F34. Dylan *et al.* (1986) usando sondas *chvA* y *chvB* pertenecientes a *Agrobacterium tumefaciens*, han estudiado homología en *R. meliloti*, *R. trifolii*, *R. leguminosarum*, *R. phaseoli* y *B. japonicum*. Sus resultados señalan la presencia de fragmentos de ADN homólogos a *chvA* y *chvB* en el genomio de los cuatro rizobios de crecimiento rápido. Por el contrario, no se detecta hibridación significativa en la cepa de *Bradyrhizobium japonicum* estudiada. Nosotros hemos usado sondas *ndvA* y *ndvB* para detectar homología de *ndv* en otras cepas bien caracterizadas de estos cuatro rizobios de crecimiento rápido, más una cepa de *R. fredii*, la cepa NGR234 de *Rhizobium* sp., así como la de crecimiento lento *B. japonicum* RCR3407.

Los resultados revelan que *ndvA* está presente en todas las cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. La secuencia *ndvA* exhibe fuerte homología en todos los rizobios estudiados, incluso en la cepa de crecimiento lento. En *B. japonicum* USDA110 no se encontró homología usando *chvA* como sonda (Dylan *et al.*, 1986). En el presente estudio, usando otra sonda homóloga pero diferente a *chvA* (*ndvA*), frente a otra cepa de *B. japonicum* (RCR3407), hemos detectado homología en el genomio de la bacteria de crecimiento lento (Figura 2.1, línea 12).

Las hibridaciones con *ndvB* indican fuerte homología para la mayoría de las especies de *Rhizobium*. Se detectaron señales menos intensas en *R. phaseoli*, *R. leguminosarum* y *R. fredii*. La señal más débil correspondió a *B. japonicum* RCR3407. Estas diferencias en intensidad de hibridación no son debidas a diferencias en la concentración de ADN, ya que en todos los casos se usaron cantidades iguales de ADN digerido con la correspondiente enzima.

También se ha investigado la existencia de posibles reiteraciones de los loci *ndv*. Tras la digestión del ADN genómico de cada cepa con tres endonucleasas diferentes (*EcoRI*, *BamHI* y *HindIII*), y posterior hibridación con las sondas *ndv*, concluimos que en la mayoría de las especies y cepas, no está reiterado *ndvA*. Las excepciones son *Rhizobium* sp. NGR234 que presenta tres repeticiones y *R. meliloti* AK631 que muestra dos (Tabla 2.3, Figura 2.1). En el caso de *ndvB*, los resultados sugieren que *R. trifolii* presenta tres repeticiones

Figura 2.3. Localización cromosómica de genes *ndv* en *Rhizobium trifolii* RS800. Panel A: Separación de plásmidos en gel de agarosa en dos cepas de *R. trifolii* (técnica de Eckhardt). Línea 1(RS800), línea 2(RS636). Panel B: Autorradiografía del "blot" correspondiente al gel mostrado en el panel A después de ser hibridado con la sonda *ndvA*. Panel C:"Blot" e hibridación frente a la sonda *ndvB*. Panel D:"Blot" e hibridación frente a la sonda *nod* común. Panel E:"Blot" e hibridación frente a la sonda *nifA*.



mientras que las restantes cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, salvo las dos reiteraciones de *R. phaseoli* CIAT899 y su derivado curado del plásmido simbiótico, muestran una sola copia (Tabla 2.3, Figura 2.2).

Resultados recientes indican que la reiteración de ADN es una característica general del genomio de las bacterias pertenecientes a la familia Rhizobiaceae (Flores *et al.*, 1987). Las reiteraciones de ADN no son frecuentes en los organismos procarióticos; además de *Rhizobium* solo especies de *Halobacterium* (Sapienza y Doolittle, 1982) y *Streptomyces* (Schrempf, 1983) poseen en su genomio un alto grado de reiteración. Otro hecho relevante sobre las secuencias reiteradas en el género *Rhizobium* es su localización plasmídica y el presentarse fundamentalmente agrupadas. El agrupamiento de las secuencias reiteradas se ha descrito en otros procariotas como es el caso de las Archaeobacteria que presentan muchas secuencias reiteradas de ADN que parecen estar circunscritas a unas zonas denominadas "islas" cuyo contenido en A+T es superior al resto del genomio.

En *R. phaseoli* se han encontrado en el plásmido simbiótico tres regiones diferentes que poseen homología con el gen estructural de la nitrogenasa (Quinto *et al.*, 1982; Martínez *et al.*, 1985). Dos de estas regiones tienen completo el operón *nifHDK* y la tercera contiene sólo el gen *nifH*, pero en cualquier caso las tres son activas transcripcionalmente. En la estirpe ORS571 que nodula *Sesbania* también se han descrito dos copias funcionales de *nifH* (Norel y Elmerich, 1987).

En *R. meliloti* 1021 se han encontrado tres copias del gen *nodD* y mediante experimentos de mutagénesis se ha demostrado que las tres copias son funcionales (Honma y Ausubel, 1987; Mulligan y Long, 1989). Se han descrito resultados similares para *R. meliloti* 41 en el que son necesarios al menos dos genes *nodD* para que se dé una nodulación eficaz en alfalfa (Göttfert *et al.*, 1986; Györgypal *et al.*, 1988). Otro grupo de genes que se ha descrito como reiterado en *R. meliloti* es el formado por *fixKN* (David *et al.*, 1987; Renalier *et al.*, 1987).

Aunque es la primera vez que se describe la presencia de reiteraciones *ndv* en el género *Rhizobium*, la presencia de reiteraciones en el genoma de nuestra estirpe de *R. trifolii* no es una novedad. Rodríguez-Quñones *et al.* (1989) han encontrado tres bandas de hibridación en la cepa RS1051 (derivada rifampicina resistente de la cepa silvestre RS800) cuando usaron como sonda un fragmento de 1.45 Kb de un locus *nod* de la propia cepa. Por otro lado y también mediante análisis de hibridación han demostrado que RS1051 lleva dos copias de *nodD*, una de las cuales se encuentra localizada en un replicón distinto del plásmido simbiótico. Esta es una característica de *R. trifolii* RS800 ya que otra raza (ANU843) bien estudiada de *R. trifolii* (Spaink *et al.*, 1987) así como *R. leguminosarum* contienen una sólo copia del gen *nodD*.

Bradyrhizobium japonicum también presenta reiteraciones para genes de localización cromosómica que intervienen en el proceso simbiótico y en oposición a lo antes comentado presentan una localización irregular, esto es, sin estar agrupadas (Hahn y Hennecke, 1987).

Los resultados que se presentan en la Figura 2.3 indican la localización cromosómica de *ndv* en *R. trifolii* RS800. Idénticos resultados se obtuvieron en el estudio del resto de las especies de *Rhizobium* que se relacionan en la Tabla 2.1. Aunque los experimentos se realizaron varias veces, la señal de hibridación aparecía siempre en el pocillo, no obteniéndose ninguna señal en la posición de los plásmidos. Dylan *et al.* (1986) habían demostrado para *R. leguminosarum* y *R. phaseoli* que los genes *ndv* no estaban localizados en el plásmido simbiótico. Nuestros resultados indican que no se localizan en el plásmido simbiótico ni en ninguno de los restantes plásmidos que presentan los distintos rizobios incluidos en este estudio.

AGRADECIMIENTOS:

Me gustaría agradecer al Doctor Ditta la cesión de los plásmidos pTy20 y pDOB13, utilizados para la obtención de las sondas empleadas en este trabajo. Así mismo mi agradecimiento a todas aquellas personas que me facilitaron las estirpes de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* para realizar el estudio de homología interespecífica de genes *ndv*.

BIBLIOGRAFIA:

Banfalvi, Z., Sakanyan, V., Konck, C., Kiss, A., Dusha, I. y Kondorosi, A. (1981). Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of *R. meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* **184**: 318-325.

Beringer, J. E. (1974). R-factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **84**: 188-198.

Better, M., Lewis, B., Corbin, D., Ditta, G. y Helinski, D.R. (1983). Structural relationships among *Rhizobium meliloti* symbiotic promoters. *Cell* **35**: 479-485.

Birnboim, H. C. y Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.

Brewin, N. J., Beringer, J. E., Buchanan-Wollaston, A. V., Johnston, A. W. B. y Hirsch, P. R. (1980). Transfer of symbiotic genes with bacteriocinogenic plasmids in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **116**: 261-270.

David, M., Domergue, O., Pognonec P., y Kahn, D. (1987). Transcription patterns of *Rhizobium meliloti* symbiotic plasmid pSym: identification of *nifA*-independent *fix* genes. *J. Bacteriol.* **169**: 671-683.

Ditta, G., Virts, E., Palomares, A. J. y Kim, Ch. H. (1987). The *nifA* gene of *Rhizobium meliloti* is oxygen regulated. *J. Bacteriol.* **169**: 3217-3223.

Douglas, C. J., Staneloni, R., J., Rubin, R. A. y Nester, E. W. (1985). Identification and genetic analysis of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence region. *J. Bacteriol.* **161**: 850-860.

Dylan, T., Ielpi, L., Stanfield, S., Kashyap, L., Douglas, C., Yanofsky, M., Nester, E., Helinski, D. R. y Ditta, G. (1986). *Rhizobium meliloti* genes required for nodule development are related to chromosomal

virulence genes in *Agrobacterium tumefaciens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 4403-4407.

Eckhardt, T. (1978). A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. Plasmid 11: 584-588.

Finan, T. M., Kunkel, B., de Vos, G. F. y Signer, E. R. (1986). Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. J. Bacteriol. 167: 66-72.

Flores, M., Gonzalez, V., Brom, S., Martinez, E., Piñero, D., Romero, D., Dávila, G. y Palacios, R. (1987). Reiterated DNA sequences in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. J. Bacteriol. 169: 5782-5788.

Garfinkel, D. J. y Nester, E. W. (1980). *Agrobacterium tumefaciens* mutants affected in crown gall tumorigenesis and octopine catabolism. J. Bacteriol. 144: 732-743.

Göttfert, M., Horvath, B., Kondorosi, E., Putnoky, P., Rodriguez-Quñones, F. y Kondorosi, A. (1986). At least two *nodD* genes are necessary for efficient nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. J. Mol. Biol. 191: 411-420.

Györgypal, Z., Narayan, I. y Kondorosi, A. (1988). Three regulatory *nodD* alleles of diverged flavonoid-specificity are involved in host-dependent nodulation by *Rhizobium meliloti*. Mol. Gen. Genet. 212: 85-92.

Hahn, M. y Hennecke, H. (1987). Mapping of a *Bradyrhizobium japonicum* DNA region carrying genes for symbiosis and a asymmetric accumulation of reiterated sequences. Appl. Environ. Microbiol. 53: 2247-2252.

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

Hooykaas, P. J. J., van Brussel, A. A. N., den Dulk-Ras, H., van Slogteren, G. M. S. y Schilperoort, R. A. (1981). *Sym* plasmid of

Rhizobium trifolii expressed in different rhizobial species and *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 291: 351-353.

Kahn, M., Kolter, R., Thomas, C., Figursky, D., Meyer, R., Remaut, D. y Helinski, D. R. (1979). Plasmid cloning vehicles derived from plasmid Col E1, F, R6K, RK2. *Methods Enzymol.* 68: 268-280.

Lamb, J. M., Hombrecher, G. y Johnston, A. W. B. (1982). Plasmid determined nodulation and nitrogen fixation abilities in *Rhizobium phaseoli*. *Mol. Gen. Genet.* 186: 449-452.

Martinez, E., Pardo, M. A., Palacios, R. y Cevallos, M. A. (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. y Sanchez, F. (1987). Nitrogen fixing nodules induced by *Agrobacterium* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. *J. Bacteriol.* 169: 2828-2834.

Meade, H. M., Long, S. R., Ruvkun, G. B., Brown, S. E. y Ausubel, F. M. (1982). Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J. Bacteriol.* 149: 114-122.

Megias, M., Caviedes, M. A., Andrés, M., Sousa, C., Ruíz-Berraquero, F. y Palomares, A. J. (1988). Localization of *his* genes on the *Rhizobium trifolii* RS800 linkage map. *Mol. Gen. Genet.* 211: 369-372.

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

Noel, K. D., Sanchez A., Fernandez, L., Leemans, J. y Cevallos, M. A. (1984). *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertion. *J. Bacteriol.* 158: 148-155.

Norel, F. y Elmerich, C. (1987). Nucleotide sequence and functional analysis of the two *nifH* copies of *Rhizobium* ORS571. *J. Gen. Microbiol.* 133: 1563-1576.

Noti, J. D., Dudas, B. y Szalay, A. A. (1985). Isolation and characterization of nodulation genes from *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) strain IRC78. Proc. Natl. Acad., Sci. U. S. A. 82: 7379-7383.

Nuti, M. P., Leipidi, A. A., Praskash, R. K., Schilperoort, R. A. y Cannon, F. A. (1979). Evidence for nitrogen fixation (*nif*) genes on indigenous *Rhizobium* plasmids. Nature 282: 533-535.

Orosz, L., Svab, Z., Kondorosi, A. y Sik, T. (1973). Genetic studies on *Rhizobiophage* 16-3. I. Genes and functions on the chromosome. Mol. Gen. Genet. 125: 341-350.

Praskash, R. K. y Atherly, A. G. (1984). Reiteration of genes involved in symbiotic nitrogen fixation by fast-growing *Rhizobium japonicum*. J. Bacteriol. 160: 785-787.

Putnoky, P. y Kondorosi, A. (1986). Two gene clusters of *Rhizobium meliloti* code for early essential nodulation functions, a third influences nodulation efficiency. J. Bacteriol. 169: 102-106.

Quinto, C., de la Vega, H., Flores, M., Fernandez, L., Ballado, T., Soberón, G. y Shine, J. (1982). Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli*. Nature 299: 724-726.

Renalier, M. H., Batut, J., Ghai, J., Terzaghi, B., Gherardi, M., David, M., Garnerone, A. M., Vasse, J., Truchet, G., Huguet, T. y Boistard, P. (1987). A new symbiotic cluster on the pSym megaplasmid of *Rhizobium meliloti* 2011 carries a functional *fix* gene repeat and a *nod* locus. J. Bacteriol. 169: 2231-2238.

Rodriguez-Quiñones, F., Fernandez, M., Banfalvi, Z., Megias, M. y Kondorosi, A. (1989). Identification of a conserved, reiterated DNA region that influences the efficiencies of nodulation in strain RS1051 of *Rhizobium leguminosarum* biovar. *trifolii*. Mol. Plant-Microbe Interact. 2: 75-83.

Rosenberg, C., Casse-Delbart, F., Dusha, I., David, M. y Boucher, C. (1982). Megaplasmid in the plant-associated bacteria *Rhizobium meliloti* and *Pseudomonas solanacearum*. J. Bacteriol. 150: 402-406.

Sapienza, C. y Doolittle, W. F. (1982). Unusual physical organization of the *Halobacterium* genome. *Nature* 295: 384-389.

Schmidhauser, T. J. y Helinski, D. R. (1985). Regions of broad-host-range plasmid RK2 involved in replication and stable maintenance in nine species of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 164: 446-455.

Schrempf, H. (1983). Reiterated sequences within the genome of *Streptomyces*. En *Genetic Rearrangements: the Fifth John Innes Symposium*. K. F. Charter, C. A. Cullis, D. A. Hopwood, D. A., Johnston, A. W. B. y Woolhous, N. W. (eds.). Croom-Helm. London. p. 131.

Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.

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

Stanfield, S. W., Ielpi, L., O'Brochta, D., Helinski, D. R. y Ditta, G. (1988). The *ndvA* gene product of *Rhizobium meliloti* is required for β -(1->2)-glucan production and has homology to the ATP-binding export protein HlyB. *J. Bacteriol.* 170: 3523-3530.

Toro, N. y Olivares, J. (1986). Analysis of *Rhizobium meliloti* sym mutants obtained by heat treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 1148-1150.

Trinick, M. J. (1980). Relationship amongst the fast-growing rhizobia of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* spp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other rhizobial groups. *J. Appl. Bacteriol.* 49: 39-53.

Van den Eede, G., Dreyfus, B., Goethals, K., Van Montagu, M. y Holsters, M. (1987). Identification and cloning of nodulation genes from the stem-nodulating bacterium ORS571. *Mol. Gen. Genet.* 206: 291-299.

Vargas, C., Martinez, L. J., Megias, M. y Quinto, C. Identification and cloning of nodulation genes and host specificity determinants of the broad host range *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* strain CIAT899. Mol. Microbiol. en prensa.

CAPITULO 3

**Aislamiento de dos loci de *Rhizobium trifolii* RS800
homólogos estructural y funcionalmente a *ndvA* y *ndvB*,
que complementan mutantes avirulentos de
Agrobacterium tumefaciens.**

INTRODUCCION.

Desde hace pocos años, las estrategias genéticas utilizadas para realizar un análisis funcional del genomio de *Rhizobium* incluyen desde típicos métodos de genética de procariotas hasta una serie de técnicas no muy ortodoxas que combinan la mayoría de los nuevos avances producidos en genética molecular; y que incluyen tecnologías de ingeniería genética, mutagénesis por transposición y técnicas de fusión génica. Estos desarrollos se han producido indudablemente por la complejidad de los sistemas que se están analizando así como por su importancia. En cualquier caso, la llegada de estas estrategias ha enriquecido no solo la genética de *Rhizobium* sino la de todos los procariotas en general. Desde un punto de vista funcional, los métodos que se usan en estudios genéticos en *Rhizobium* se pueden clasificar en: métodos de pérdida de función, métodos de adquisición de función y métodos de inhibición o activación específica.

Los métodos de pérdida de función se basan fundamentalmente en mutagénesis bien química o biológica y posterior análisis. El caso más drástico de esta metodología consiste en la supresión total de las secuencias de interés, ya que esto determina la eliminación de la función.

Para los métodos de ganancia de función el principio fundamental del proceso consiste en la construcción de razas a las que se ha transferido ADN. La transferencia de plásmidos es una estrategia frecuente para obtener razas de *Rhizobium* con nuevas capacidades simbióticas. Las razas receptoras pueden ser silvestres o tener alteradas sus características simbióticas o incluso pueden ser otras especies bacterianas como *Agrobacterium tumefaciens*. La localización de regiones simbióticas, ya sea en un plásmido de gran tamaño o en el cromosoma, implica la transferencia de fragmentos de ADN de pequeño tamaño a un fondo genético de *Rhizobium*. Una estrategia útil consiste en clonar estos fragmentos en vectores que sean mobilizables y mantenidos de manera estable en *Rhizobium* tales como pRK290 (Ditta *et al.*, 1980) y sus derivados (Friedman *et al.*, 1982; Knauf y Nester, 1982; Ditta *et al.*, 1985). Esta estrategia

permite la clonación de genes simbióticos por complementación directa de mutantes de *Rhizobium* (Long *et al.*, 1982) tras la transferencia de ADN por conjugación y el estudio de la recuperación de la capacidad simbiótica de los transconjugantes. De particular interés es el trabajo de Innes *et al.* (1988) en el que mediante este método se ha determinado que un fragmento de 32 Kb del genomio de *Rhizobium trifolii* es capaz de conferir nodulación y fijación de nitrógeno a un fondo genético curado de plásmido simbiótico.

Los métodos de activación o inhibición específica tienen por objeto la identificación de genes que responden a una serie de estímulos entre los que se encuentran los exudados radiculares. Están pensados para aquellos genes que no se han podido identificar previamente o bien cuando el producto génico es difícil, si no imposible de determinar por técnicas sencillas. En este caso, los promotores de los genes en estudio se fusionan a genes estructurales sin promotor, cuyo producto génico es fácil de ensayar. Los genes estructurales más utilizados en *Rhizobium* son los genes *lac* (Sundaresan *et al.*, 1983; Szeto *et al.*, 1984; Mulligan y Long, 1985), *cat* (Kim *et al.*, 1986), *lux* (O'Kane *et al.*, 1988) y *luc* (Cebolla *et al.*, sometido a publicación).

Los estudios realizados en el presente Capítulo se han basado en la utilización del segundo método mencionado para el análisis del genomio de *Rhizobium trifolii* RS800.

Rhizobium trifolii RS800-trébol es la interacción rizobio-leguminosa que viene siendo estudiada desde hace algunos años en nuestro laboratorio. Megias *et al.* (1982) establecieron el mapa circular de ligamiento del cromosoma de esta cepa, situando 17 marcadores nutricionales y de resistencia usando R68.45 como plásmido movilizador (Beringer y Hopwood, 1976; Kondorosi *et al.*, 1977; Casadesús y Olivares, 1979). Ha sido posible ampliar el conocimiento del mapa de ligamiento, localizando *hisGE*, *hisD* e *hisH* en el mismo, mediante el aislamiento y caracterización de mutantes auxotróficos de histidina obtenidos por mutagénesis con nitrosoguanidina y por transposición con Tn5 (Megias *et al.*, 1988).

Rodríguez-Quñones *et al.* (1989) comenzaron los estudios moleculares sobre la información genética de nuestra cepa de *Rhizobium trifolii* que participa específicamente en el proceso simbiótico. Usaron para ello un derivado rifampicina resistente de la estirpe silvestre RS800. Mediante electroforesis horizontales en gel de agarosa se puso de manifiesto la existencia de tres plásmidos de tamaño molecular aproximado de 190, 280 y 470 MDa. Por aislamiento de derivados curados, por movilización de plásmidos a *Agrobacterium* y por hibridaciones con sondas *nod* y *nif*, se ha demostrado que el plásmido más pequeño es el pSym. Así mismo en el cósmido pVK102 (Knauf y Nester, 1982) se ha construido una genoteca a partir de la cual se ha aislado un fragmento de ADN de 11.45 Kb, perteneciente al pSym, que lleva la información necesaria para nodular trébol blanco (*Trifolium repens*) y trébol rojo (*Trifolium pratense*) (Rodríguez-Quñones *et al.*, 1989). Nuestros resultados indican que en el rango de hospedador de esta cepa también se incluye el trébol subterráneo (*Trifolium subterraneum*).

Profundizando en el estudio de las características simbióticas de *R. trifolii* RS800 se ha puesto de manifiesto, tal como se describe en el Capítulo 2 del presente trabajo, la existencia de homología entre las regiones *ndvA* y *ndvB* de *Rhizobium meliloti* 102F34 y el cromosoma de RS800.

En el presente Capítulo se describe el aislamiento y caracterización de los loci *ndvA* y *ndvB* en *R. trifolii* RS800 mediante complementación heteróloga funcional de mutantes *ndvA* y *ndvB* de *R. meliloti*. Siguiendo una estrategia análoga estos loci *ndv* pertenecientes a RS800 se transfirieron a mutantes *chvA* y *chvB* de *Agrobacterium tumefaciens* para estudiar en éstos la restauración de la virulencia.

MATERIAL Y METODOS.

Bacterias y plásmidos.

Los microorganismos y plásmidos utilizados en el presente estudio se incluyen en la Tabla 3.1, especificando sus características y procedencia.

Plantas.

Se emplearon semillas de alfalfa (*Medicago sativa* cv. Moapa) para los ensayos de nodulación y plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) para los ensayos de virulencia

Medios y condiciones de cultivo.

Los medios y condiciones de cultivo fueron los que se describen en el Capítulo 2. Cuando fué necesario los medios se suplementaron con los antibióticos apropiados. La tetraciclina se disolvió en una mezcla 1:1 etanol 96%-agua destilada y se añadió al medio previamente esterilizado. La espectinomicina, ampicilina y el quimioterápico ácido nalidíxico, se disolvieron en agua destilada y se esterilizaron por filtración utilizando nitrocelulosa Millipore. HA 0.45µm de diámetro de poro antes de ser añadidos al medio de cultivo estéril. Las concentraciones finales utilizadas fueron las siguientes:

Tetraciclina	(Tc)	15 µg/ml para <i>E. coli</i> 5 µg/ml para <i>Rhizobium</i>
Espectinomicina	(Spc)	80 µg/ml
Ampicilina	(Amp)	100µg/ml para <i>E. coli</i> 25 µg/ml para <i>A. tumefaciens</i>
Ac. Nalidíxico	(Nal)	10 µg/ml

Se prepararon placas de LB/X-gal/IPTG añadiendo a medio litro de medio LB esterilizado previamente en el autoclave 1 ml de una solución al 2% p/v de X-gal en dimetilformamida, y 2.5 ml de una solución estéril por filtración 100 mM IPTG en agua destilada.

TABLA 3.1. Bacterias y plásmidos.

A. <i>Rhizobium meliloti</i>		Referencias
102F34	silvestre, Nal ^r	Ditta <i>et al.</i> (1980)
LI1	mutante <i>ndvA</i>	Stanfield <i>et al.</i> (1988)
Ty7	mutante <i>ndvB</i>	Dylan <i>et al.</i> (1986)
B. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>		
ABT109	silvestre	CIDA Sevilla
ME45	mutante <i>chvA</i>	Douglas <i>et al.</i> (1985)
ME66	mutante <i>chvA</i>	Douglas <i>et al.</i> (1985)
ME73	mutante <i>chvB</i>	Douglas <i>et al.</i> (1985)
ME103	mutante <i>chvB</i>	Douglas <i>et al.</i> (1985)
A-136	derivada pTi ⁻ de C58	E. W. Nester
C. <i>Escherichia coli</i>		
HB101	<i>hsdS</i> , <i>hsdM</i> , <i>pro</i> , <i>leu</i> , <i>thi</i> <i>gal</i> , <i>lacY</i> , <i>recA</i> , <i>str</i>	G. Ditta
JM109	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , $\Delta(lac-proAB)$ F'(traD36, <i>proAB</i> , <i>lacY</i> ^{qZ} Δ M15)	J. Messing
D. Plásmidos		
pRK2073	plásmido "helper" Spc ^r	Ditta <i>et al.</i> (1980)
pVK102, genoteca	fragmentos <i>Hind</i> III de ADN de <i>Rhizobium trifolii</i> clonados en el cósmido pVK102, Tc ^r	Rodriguez-Q. <i>et al.</i> (1989)
pTy20	derivado de pUC19 portador del gen <i>ndvB</i> de <i>R. meliloti</i> 102F34	Dylan <i>et al.</i> (1986)
pDOB13	derivado de pUC19 portador del gen <i>ndvA</i> de <i>R. meliloti</i> 102F34	Stanfield <i>et al.</i> (1988)
pCC11	cósmido portador de la región <i>ndvA</i> de RS800	Este trabajo
pCC71	cósmido portador de la región <i>ndvB</i> de RS800	Este trabajo
pUC19	plásmido vector, Amp ^r	Yanish-Perron <i>et al.</i> (1985)
pCC119	derivado de pUC19 portador del locus <i>ndvA</i> de RS800	Este trabajo
pCC719	derivado de pUC19 portador del locus <i>ndvB</i> de RS800	Este trabajo

Enzimas e isótopos.

Las endonucleasas de restricción se compraron a Böehringer Mannheim y se usaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El ^{32}P -dCTP fué suministrado por Amersham.

Ensayo de nodulación.

Las semillas de alfalfa se esterilizaron superficialmente del siguiente modo: se lavaron con etanol durante 30 segundos y a continuación se lavaron con agua destilada estéril. Después se colocaron en una solución al 1% p/v de cloruro mercúrico en etanol al 10% durante dos minutos y medio, y finalmente se lavaron 8 ó 9 veces con agua destilada estéril.

Una vez estériles y lavadas, las semillas se hicieron germinar sobre placas de agar agua (0.8% de agar Oxoid N°1 en agua destilada).

El ensayo de nodulación se realizó en jarros Leonard, para su preparación se usaron frascos de vidrio de 400 ml de boca ancha, donde se colocó la solución nutritiva utilizada para plantas. Sobre estos frascos se colocaron botellas pequeñas de cerveza, invertidas y sin fondo, que se llenaron con vermiculita empapada en la solución nutritiva. Ambos recipientes estaban conectados por una mecha de gasa, lo que permitía que la vermiculita siempre estuviese húmeda. Los jarros Leonard una vez preparados se esterilizaron en el autoclave.

Solución nutritiva para plantas:

Soluciones stock:

A) 250X KCl/KH₂PO₄

KCl	125 g
KH ₂ PO ₄	50 g
Agua destilada	1 litro

B) 500X MgSO₄

MgSO ₄100 g
Agua destilada1 litro

C) 200X Oligoelementos

H ₃ BO ₃ (sol. 1% p/v)	20 ml
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O (sol. 1% p/v)	20 ml
CuSO ₄ . 5 H ₂ O (sol. 1% p/v)	10 ml
MnCl ₂ . 4 H ₂ O (sol. 1% p/v)	10 ml
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O (sol. 1% p/v)	2 ml
Agua destilada csp	1 litro

D) 5000X FeEDTA

FeEDTA	46.40 g
Agua destilada1 litro

Solución estéril por filtración.

Preparación:

Para 1 litro de solución nutritiva.

250X KCl/KH ₂ PO ₄	4 ml
500X MgSO ₄	2 ml
200X Oligoelementos	5 ml
CaSO ₄	0.2 g

Autoclavar y cuando esté frío añadir 0.2 ml de 5000X FeEDTA.

A continuación se colocaron por jarro doce semillas de alfalfa pregerminadas y se inocularon con 2 ml del inóculo correspondiente. Cuando las plantitas se elevaron un centímetro sobre la superficie, se cubrió la vermiculita con una capa de arena parafinada estéril.

Los jarros se colocaron en la cámara de plantas a 22°C y fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. El ensayo se mantuvo en estas condiciones durante cinco semanas después de la inoculación; pasado este tiempo se realizó el correspondiente análisis.

Reaislamiento de bacterias a partir de nódulos.

Los nódulos se esterilizaron superficialmente con una solución al 0.1% p/v de cloruro mercúrico durante 30 segundos y a continuación se lavaron con abundante agua destilada estéril. Los nódulos se colocaron en una placa de petri estéril a la que se adicionaron una gotas de solución salina y se aplastaron con una

varilla de vidrio previamente flameada. El líquido resultante se tomó con un asa de platino y se sembró en medio rico YTA. Las colonias resultantes se probaron siempre en los medios selectivos apropiados.

Ensayo de virulencia.

Se utilizaron macetas que contenían turba convenientemente humedecida con agua. En cada maceta se plantaron dos plántulas de tomate y se mantuvieron en invernadero durante una semana. Pasado este tiempo, se repusieron aquellas plantas que no estaban firmes y sanas, y se procedió a la inoculación con las distintas estirpes de *A. tumefaciens* a ensayar.

Se prepararon inóculos de cada estirpe cultivando en medio líquido LB durante tres días. La inoculación se realizó utilizando jeringuillas estériles de 1 ml. En una de las plantas se inyectaron unas gotas del inóculo en distintos pinchazos en el tallo desde 1 cm del ras de la maceta hacia arriba. En la otra planta se realizó con la aguja una incisión longitudinal en el tallo, dejando resbalar el inóculo por la herida.

Las plantas se regaron periódicamente durante dos semanas con agua, y el resto del tiempo que duró el ensayo se alternaron los riegos con agua y con solución nutritiva de Rigaud y Puppo (1975) adicionada de 1.72 g/litro de nitrato amónico. Los tumores se observaron y fotografiaron a los veinticinco días de la inoculación.

Mecanismos de transferencia de ADN.

A) CONJUGACION.- La transferencia conjugativa se realizó según lo descrito por Ditta (1986). Se mezclaron 0.05 ml de un cultivo de cada tipo de célula (receptora, donadora y "helper" en caso de conjugación triparental), aproximadamente 5×10^9 células por alícuota, en la superficie de una placa. Los cultivos que se emplearon eran cultivos recientes, y se utilizaron bien cultivos en medio líquido, bien células resuspendidas obtenidas de cultivos en placa. Tras incubar 8 horas a 30°C la masa bacteriana se recogió resuspendiéndola en solución salina al 0.85% estéril y se sembró en los medios selectivos tras las diluciones apropiadas.

B) TRANSFORMACION.- Las células de *E. coli* se hicieron competentes mediante tratamiento con cloruro cálcico en frío. Se centrifugaron 50 ml de cultivo celular (D.O. 0.4-0.6 a 600 nm) a 5.000 rpm durante 5 min. Las células se resuspendieron en 25 ml de CaCl_2 100 mM preenfriado en hielo. Después de mantenerlas 20 min en hielo, las células se sedimentaron y resuspendieron de nuevo en 5 ml de la misma solución de cloruro cálcico.

Para la transformación se añadieron entre 0.4 y 0.6 μg de ADN por cada 100 μl de células competentes, y se mantuvo esta mezcla en hielo durante 30 min. A continuación se expuso la mezcla a un choque térmico de 42°C durante dos minutos y medio. Posteriormente, una vez pasados 5 ó 10 min a temperatura ambiente, se añadió 1 ml de LB sin antibiótico y se incubó durante 1 h a 37°C para permitir la expresión génica de la resistencia al marcador, antes de la siembra en el medio selectivo.

Aislamiento de ADN.

A) ADN PLASMIDICO.- El ADN plasmídico de *E. coli* se aisló por un procedimiento que es una modificación del descrito originalmente por Birnboim y Doly (1979). Se recogieron por centrifugación las células de 5 ml de un cultivo de 16-18 h, y se resuspendieron en 100 μl de solución A (25 mM Tris-ClH, pH 8.0, 10 mM EDTA). Se adicionaron 200 μl de solución B (0.2 N NaOH, 1% SDS) preparada recientemente y se agitó vigorosamente, incubándose entre 5 y 10 min en hielo. Se añadieron 150 μl de solución C (3 M acetato sódico, pH 4.8) y se mezcló con suavidad, manteniéndose seguidamente durante 15 min en hielo. Pasado este tiempo mínimo, se centrifugó durante tres minutos y se añadió al sobrenadante 1ml de etanol frío, se dejó precipitando 30 min a -20°C y se centrifugó 2 min. Se resuspendió el precipitado en 400 μl de solución D (10 mM Tris-ClH, pH 8.0, 0.1 M acetato sódico) y se precipitó con dos volúmenes de etanol durante 10 min a -20°C. Se centrifugó durante 2 min y se secó bien el precipitado, resuspendiéndose finalmente en 40 μl de DSB (6 mM Tris-ClH, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA).

B) PLASMIDOS DE RHIZOBIUM.- Los plásmidos recombinantes transferidos a *Rhizobium* se aislaron por una modificación del método de Ish-Horowick y Burke (1981). Se recogieron las células

de un cultivo en fase estacionaria temprana y se lavaron con 150 μ l de TEN (10 mM Tris-ClH, pH 8.0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl) con un 1% de Sarkosyl. Después de centrifugar las células se resuspendieron en 160 μ l de solución I (25 mM Tris-ClH, pH 8.0, 10 mM EDTA, 50 mM glucosa) y se mantuvieron 15 min a temperatura ambiente. Se añaden 200 μ l de solución II (0.2 N NaOH, 1% SDS) recién preparado y tras 10 min en hielo se adicionaron 250 μ l de solución III (5 M acetato potásico, pH 4.8), dejando de nuevo 10 min en hielo. Se centrifugó y posteriormente se fenolizó el sobrenadante precipitándose el ADN con etanol frío. El precipitado se lavó con etanol de 70%, se desecó y se disolvió en 40 μ l de DSB.

Electroforesis en gel de agarosa y recuperación de ADN de un gel.

El ADN purificado y digerido con las correspondientes endonucleasas, se separó mediante electroforesis en geles de agarosa. Los geles se sumergieron en tampón TBB y se prepararon por lo general al 0.7% en el mismo tampón y como indican Maniatis *et al.* (1982).

El gel, para teñir el ADN, se preparó adicionado de 0.6 μ g/ml de bromuro de etidio. El ADN se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta de longitud de onda 320 nm y fotografió en película Kodak Tri-X Pan 400 ASA con filtro Kodak Wratten 23A.

Los pesos moleculares de los fragmentos de ADN se calcularon según la curva log Pmol-movilidad electroforética obtenida de acuerdo con las distancias de migración de los fragmentos *Hind*III del estándar λ cI857 Sam7 (Boehringer Mannheim): 23.1, 9.5, 6.7, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5 Kb.

Los fragmentos de ADN se recuperaron de los geles por medio de la técnica de electroelución, tal como está descrita por Maniatis *et al.* (1982), seguida de purificación por una primera extracción con fenol saturado con NaCl al 3%, y otra con una mezcla 24:1 cloroformo-alcohol isoamílico, antes de precipitar con etanol de 96%.

Ligamiento de ADN.

El plásmido vector se linearizó por digestión con la enzima indicada y después se purificó mediante extracción con fenol/cloroformo y precipitación con etanol. El fragmento de ADN

que se debía clonar en cada caso se aisló de un gel de agarosa por electroelución.

La reacción de ligamiento se realizó con la enzima T4 ADN ligasa (Böehringer Mannheim) poniendo dos moléculas de inserto por cada una de las moléculas de vector y 1 µl de tampón 10X (200 mM Tris-ClH, pH 7.6; 100 mM MgCl₂; 100 mM DTT; 6 mM ATP) en un volumen final de 10 µl.

En el caso de ligamiento de moléculas de extremos planos se mantuvo la reacción 16 h a 15°C, y en el caso de extremos cohesivos durante 6-8 h a 20°C. Posteriormente los 10 µl de reacción se transformaron en células competentes de la cepa de *E. coli* apropiada.

Análisis de hibridación.

Las hibridaciones de ADN se realizaron como se describe en el Capítulo 2, con algunas modificaciones en lo que se refiere a la solución de hibridación y marcaje del ADN sonda.

Se empleó la solución de hibridación utilizada por Kondorosi *et al.* (1982) compuesta por: 3XSSC, 50% formamida, 25 mM Na₂HPO₄, 25 mM NaH₂PO₄, 0.02% BSA, PVP, Ficoll 400 y 0.5 mg/ml de ADN de esperma de salmón previamente desnaturalizado con NaOH, desproteinizado con proteinasa K y fenolizado.

Los fragmentos de ADN que se utilizaron como sondas, se marcaron con el kit "Multiprime DNA labelling system" de Amersham, según las indicaciones del proveedor.

RESULTADOS.

Aislamiento de cósmidos recombinantes portadores de las regiones *ndvA* y *ndvB* de *Rhizobium trifolii* RS800.

Para el aislamiento de cósmidos portadores de los loci *ndv* de *R. trifolii* se disponía de una genoteca construida en el cósmido vector pVK102 (Rodríguez-Quñones *et al.*, 1989). El cósmido pVK102 es un derivado de pRK290, caracterizado por su amplio rango de hospedador y por conferir resistencia a tetraciclina y

kanamicina. La construcción de la genoteca se hizo clonando los fragmentos resultantes de la digestión parcial con *Hind*III del genomio de una estirpe Rif^r derivada de RS800, en el punto único *Hind*III del vector situado en el gen de resistencia a kanamicina; y por ello, los clones resultantes que componen la genoteca son Tc^r y Km^s.

La existencia de homología entre ADN específico de las regiones *ndv* pertenecientes a *Rhizobium meliloti* 102F34 y ADN genómico de *R. trifolii* RS800 (Capítulo 1) nos permitía identificar cósmidos recombinantes portadores de secuencias homólogas a *ndv* a partir de la genoteca de RS800.

Para aislar los cósmidos *ndv* se realizaron dos estrategias diferentes:

a) Hibridación de colonias. El método de hibridación de colonias se usó para detectar aquellos clones pertenecientes a la genoteca que mostraban homología frente a las sondas *ndv* de *R. meliloti* 102F34. Por este método se aislaron una serie de clones que daban una señal de hibridación (datos no mostrados).

b) Complementación del fenotipo Ndv⁻ que presentan los mutantes *ndv* de *R. meliloti*. Los mutantes *ndv* de *R. meliloti* se caracterizan por inducir en alfalfa la formación de nódulos que se diferencian de los producidos por la cepa silvestre en que son mucho más numerosos y pequeños, de color blanco, carecen de cordón de infección y de bacteroides, y no fijan nitrógeno. Por ello las plantas inoculadas con el mutante son de bajo porte y de color amarillento, distinguiéndose así fácilmente de las plantas inoculadas con la estirpe silvestre. La Figura 3.1 muestra un esquema del desarrollo de esta estrategia de complementación.

La genoteca de *R. trifolii* RS800 se transfirió en masa mediante conjugación triparental a los mutantes *ndvA* y *ndvB* de *R. meliloti*. Los transconjugantes se seleccionaron en medio YTA adicionado de tetraciclina y ácido nalidíxico. De acuerdo con la fórmula de Clark y Carbon (1979), se deben seleccionar al menos unos 800 clones para que todos los genes de RS800 se encuentren representados. En este experimento se seleccionaron por encima de 4.000 clones para

Figura 3.1. Esquema del aislamiento de loci *ndv* por complementación de mutantes. Los loci *ndv* pertenecientes a *Rhizobium trifolii* RS800 se aislaron mediante una estrategia basada en la complementación del fenotipo Ndv^- que presentan los mutantes *ndv* de *Rhizobium meliloti*.

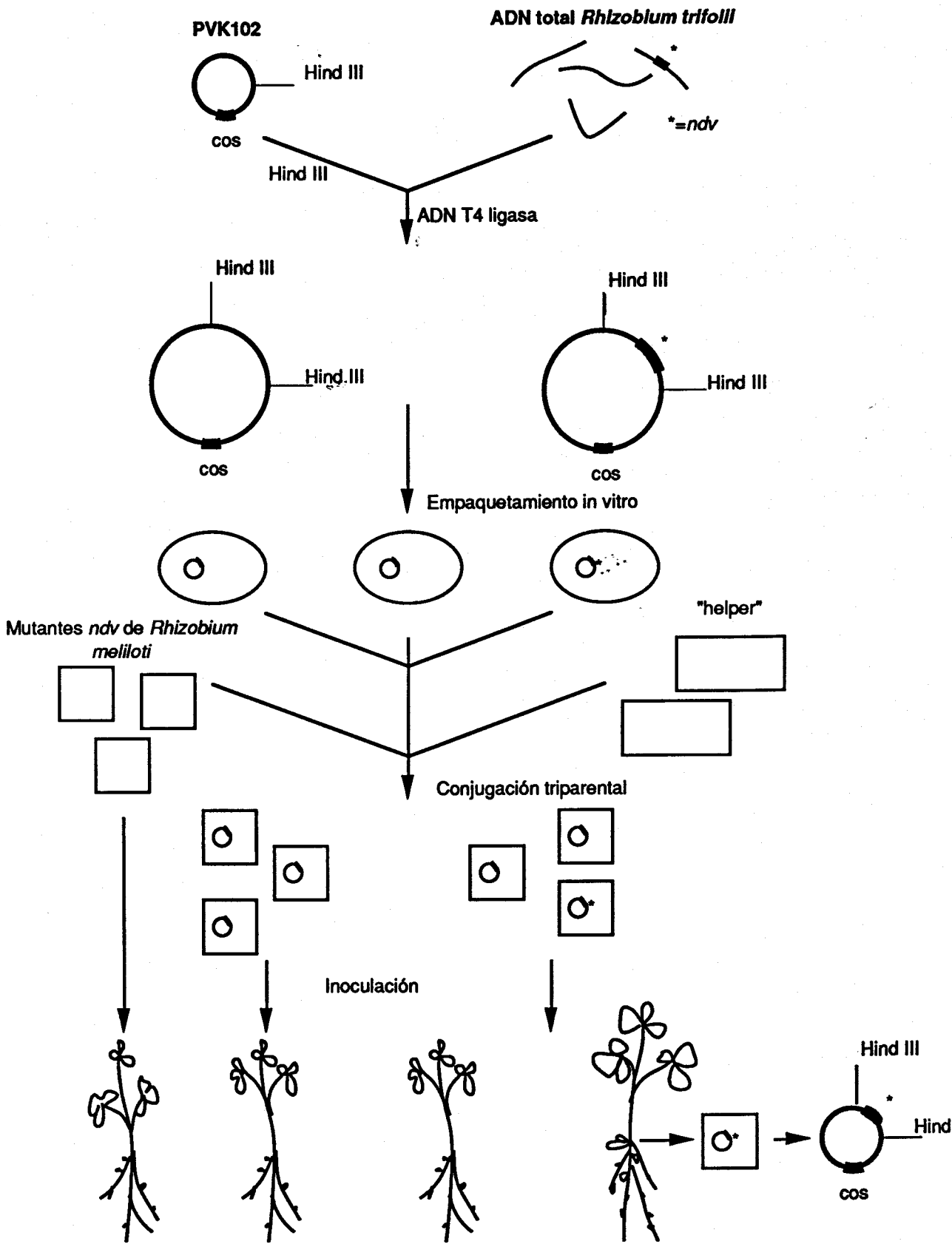


Figura 3.2. Plantas de alfalfa inoculadas con la mezcla de transconjugantes del mutante *ndvB*. Las plantas de alfalfa (*Medicago sativa* cv. Moapa) se cultivaron en jarros Leonard en un medio libre de nitrógeno. En el Panel A se muestra, a la izquierda un jarro inoculado con el mutante *ndvB*, Ty7; a la derecha un jarro inoculado con la mezcla de transconjugantes de Ty7 y la genoteca de *R. trifolii* RS800, donde puede observarse una planta cuyo fenotipo ha sido complementado. En el Panel B se presentan las plantas una vez extraídas de los correspondientes jarros; a la izquierda una planta inoculada con el mutante, a la derecha inoculada con el silvestre y en el centro una planta complementada. Las plantas fueron fotografiadas a las cinco semanas de la inoculación.

preparar un único inóculo con el que se inocularon 30 jarros Leonard. Tras cinco semanas en cámara iluminada, la mayoría de las plantas presentaba el porte característico de las plantas inoculadas con el mutante. Sin embargo, alguna de ellas fué de porte elevado y coloración verde, lo que indicaba la presencia de nódulos fijadores de nitrógeno (Figura 3.2). Cuando se observó el sistema radicular de estas plantas, se encontraron gran cantidad de nódulos que presentaban el fenotipo mutante, mientras que al menos uno o dos de ellos eran rojos, de mayor tamaño y de forma similar a los que se obtienen inoculando con la cepa silvestre.

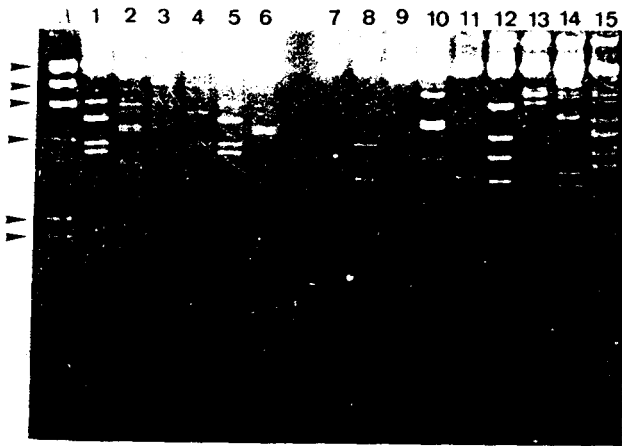
A partir de estos nódulos se aislaron los rizobios portadores de los cósmidos recombinantes que contenían las regiones *ndv* de *R. trifolii*. El hecho de que esta estrategia de complementación nos permitía demostrar la homología funcional de los cósmidos que portaban estos transconjugantes con los genes *ndv* de *R. meliloti*, hizo que se utilizaran estos cósmidos para el resto del estudio.

En el caso del mutante *ndvB* (Ty7), el fenotipo *Ndv*⁻ se complementó en tres plantas halladas en tres jarros distintos. Después del aislamiento de los rizobios que ocupaban los nódulos (1 ó 2 por planta) fijadores de nitrógeno, los cósmidos recombinantes se transfirieron a *E. coli* HB101 para ser estudiados. Esto se realizó mediante conjugación triparental usando HB101 como receptor o por extracción del ADN plasmídico de *Rhizobium* y posterior transformación en HB101. Se analizaron de esta forma doce de los clones de *Rhizobium* aislados en cada una de las plantas. Una vez que los cósmidos recombinantes se encontraban en HB101, se realizó una extracción por lisis alcalina y se estudió el perfil de restricción de todos los clones. Para ello, se realizaron digestiones con *EcoRI*, *HindIII*, *PstI* y *Sall*. Como resultado de este análisis físico determinamos que los doce clones procedentes de cada planta eran idénticos. Además se comprobó que de los tres clones finales aislados de las tres plantas (pCC71, pCC72 y pCC73), dos presentaban un perfil de restricción coincidente (pCC71 y pCC72), siendo el tercero un cósmido solapado de mayor tamaño (pCC73).

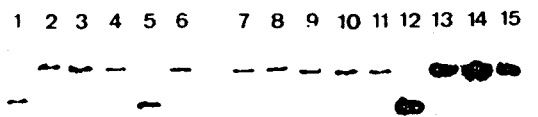
En el caso del mutante *ndvA* (LI1), en el total de los jarros inoculados con la mezcla de transconjugantes sólo se encontró una

Figura 3.3. Hibridación de ADN *ndv*-específico de *Rhizobium meliloti* 102F34 frente a cósmidos recombinantes de *Rhizobium trifolii* RS800. Panel A: Electroforesis en gel de agarosa de los distintos cósmidos recombinantes aislados por complementación de mutantes *ndv*, digeridos con diferentes endonucleasas de restricción (*EcoRI*, *HindIII*, *PstI* y *SalI*). Líneas 1, 2, 3 y 4 (pCC71), líneas 5, 6, 7 y 8 (pCC72), líneas 9, 10 y 11 (pCC73) y líneas 12, 13, 14 y 15 (pCC11). Panel B: Hibridación correspondiente al "blotting" del gel mostrado en el panel A frente a la sonda *ndvB* (líneas 1-11) y *ndvA* (líneas 12-15).

A



B



planta complementada. A partir de sus nódulos se siguió un análisis idéntico al descrito para el caso de la complementación de *ndvB* y se aisló un único cósmido (pCC11) cuyo perfil de restricción fué estudiado.

Dado que disponíamos de las sondas correspondientes a los genes *ndv* de *R. meliloti* (descritas en el Capítulo 1) el siguiente paso consistió en demostrar la existencia de homología estructural en los cósmidos aislados, cuya homología funcional habíamos evidenciado. Los distintos cósmidos aislados se digirieron con diferentes enzimas y tras la transferencia a filtro de nitrocelulosa, se hibridaron con la sonda *ndv* correspondiente previamente marcada con fósforo radiactivo.

La Figura 3.3 muestra a la izquierda la electroforesis en gel de agarosa de los cósmidos pCC71, pCC72, pCC73 y pCC11; y a la derecha la hibridación de los tres primeros frente a la sonda *ndvB* y del cuarto frente a la sonda *ndvA*. Los cósmidos pCC11 y pCC71 fueron seleccionados para realizar los estudios posteriores.

Complementación heteróloga funcional de mutantes avirulentos de *Agrobacterium tumefaciens*.

Para determinar si los cósmidos aislados que contenían las regiones *ndv* de *R. trifolii* RS800 eran funcionalmente equivalentes a los genes *chv* de *Agrobacterium tumefaciens*, se transfirieron conjugativamente a cuatro representantes de los mutantes *chvA* y *chvB* de *A. tumefaciens* A-348 (Douglas *et al.*, 1985). Los transconjugantes se utilizaron para infectar tallos de *Lycopersicon esculentum*. A las cuatro semanas de la inoculación se pudieron observar los tumores; pCC71, portador de la región *ndvB*, restauró la capacidad de producir tumores en los dos mutantes *chvB* ensayados, mientras que pCC11, portador de la región *ndvA*, restituyó la virulencia a uno de los dos mutantes *chvA*. En la Tabla 3.2 se resumen los resultados del ensayo de virulencia, y en la Figura 3.4 se muestran los tumores formados por las cepas que recuperaron su capacidad oncogénica y pueden apreciarse los resultados según cada una de las técnicas de inoculación empleadas.

TABLA 3.2. Complementación de mutantes *chvA* y *chvB* de *Agrobacterium tumefaciens*.

Estirpe	Características	Formación de tumores
ME45	mutante <i>chvA</i> de A-348	-
ME66	mutante <i>chvA</i> de A-348	-
ME103	mutante <i>chvB</i> de A-348	-
ME73	mutante <i>chvB</i> de A-348	-
A-136	derivada pTi ⁻ de C58	-
ABT109	silvestre (CIDA Sevilla)	+
ME45 (pCC11)	ME45 portador del cósmido <i>ndvA</i> de <i>R. trifolii</i>	+
ME66 (pCC11)	ME66 portador del cósmido <i>ndvA</i> de <i>R. trifolii</i>	-
ME103 (pCC71)	ME103 portador del cósmido <i>ndvB</i> de <i>R. trifolii</i>	+
ME73 (pCC71)	ME73 portador del cósmido <i>ndvB</i> de <i>R. trifolii</i>	+

Figura 3.4. Complementación de mutantes avirulentos de *Agrobacterium tumefaciens*. Panel 1. Tallos de tomate tras 25 días de la inoculación con: A.- ME45 (pCC11), B.- ME45 y C.- ME66 (pCC11). Panel 2. Tallos de tomate tras 25 días de la inoculación con: A.- ME103 (pCC71), B.- ME103 y C.- ME73 (pCC71).

Caracterización de los loci *ndvA* y *ndvB* de *R. trifolii* RS800.

Habiéndose establecido que los cósmidos recombinantes aislados de la genoteca de *R. trifolii* RS800 presentaban homología estructural y funcional con los loci *ndv* de *R. meliloti*, nos propusimos avanzar en la caracterización y conocimiento de estos loci *ndv*. Para ello los cósmidos pCC11 y pCC71 se digirieron con cinco endonucleasas de restricción (*EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *XhoI* y *Sall*), mediante electroforesis en gel de agarosa se separaron los distintos fragmentos obtenidos y tras el "blotting" correspondiente se hibridaron frente a las sondas *ndv*. En la Figura 3.5 se muestra una fotografía del gel a la izquierda y el resultado de la hibridación a la derecha.

El cósmido pCC11 presenta una banda *EcoRI* de aproximadamente 7 Kb que muestra una fuerte homología con el gen *ndvA* de *R. meliloti*. El cósmido pCC71 presenta así mismo una banda *EcoRV* de 8 Kb aproximadamente que hibrida fuertemente con el gen *ndvB* de *R. meliloti*. Estos dos fragmentos se han subclonado en un plásmido vector de alto número de copias, pUC19.

El plásmido pCC119 es un derivado de pUC19 que tiene clonado en el sitio *EcoRI* del "polilinker" el fragmento *EcoRI* de 7 Kb que lleva la región *ndvA*; pCC119 se ha mapeado con siete endonucleasas distintas (*PstI*, *HindIII*, *BglII*, *Sall*, *BamHI*, *ClaI* y *XhoI*), su mapa físico se muestra en la Figura 3.6.

El plásmido pCC719 es un derivado de pUC19 que tiene clonado en el sitio *SmaI* del "polilinker" el fragmento *EcoRV* de 8 Kb que lleva la región *ndvB*; pCC719 se ha mapeado con seis enzimas (*PstI*, *HindIII*, *BglII*, *ClaI*, *XhoI* y *Sall*), su mapa físico se muestra en la Figura 3.6.

Figura 3.5. Estudio físico e hibridación frente a ADN *ndv*-específico de los cósmidos pCC11 y pCC71. Panel 1. A: Digestión de pCC11 con distintas enzimas de restricción. Línea 1 (*EcoRV*), línea 2 (*EcoRI*), línea 3 (*HindIII*), línea 4 (*XhoI*) y línea 5 (*SalI*). B: Hibridación frente a la sonda *ndvA* del gel mostrado en el panel 1. A. Panel 2. A: Digestión de pCC71 con distintas enzimas de restricción. Línea 1 (*EcoRI*), línea 2 (*EcoRV*), línea 3 (*HindIII*), línea 4 (*XhoI*) y línea 5 (*SalI*). B: Hibridación frente a la sonda *ndvB* del gel mostrado en el panel 2. A.

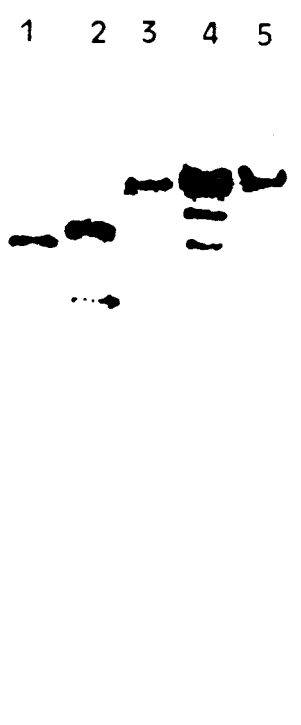
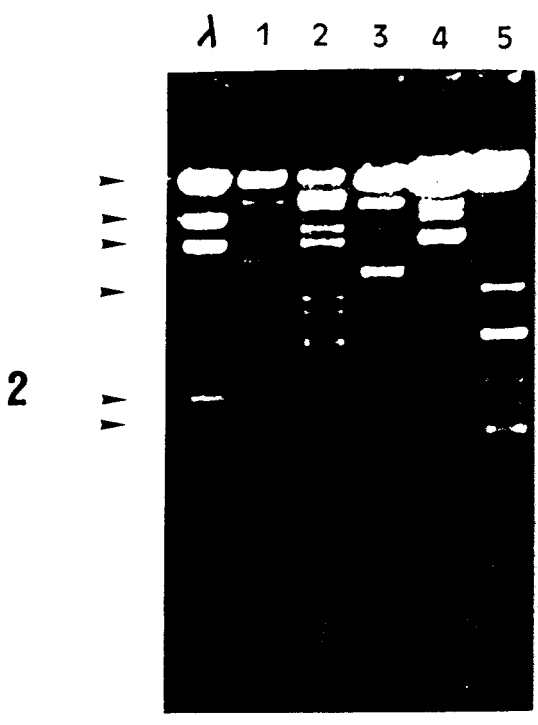
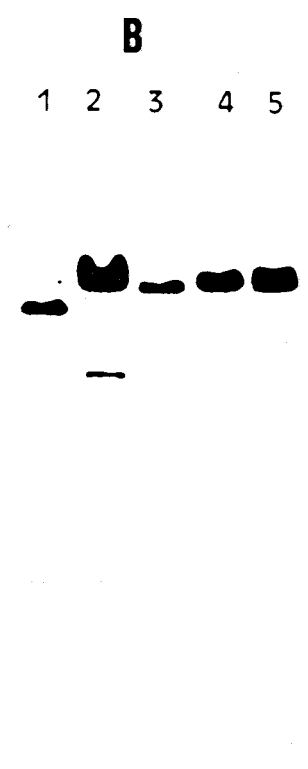
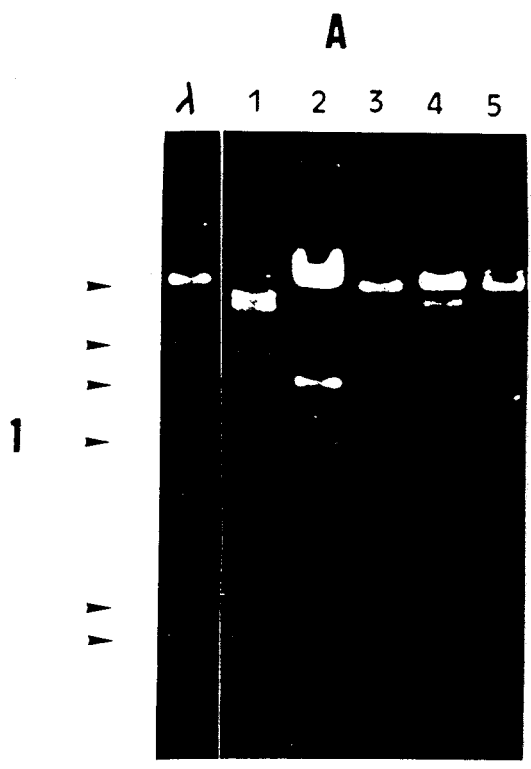
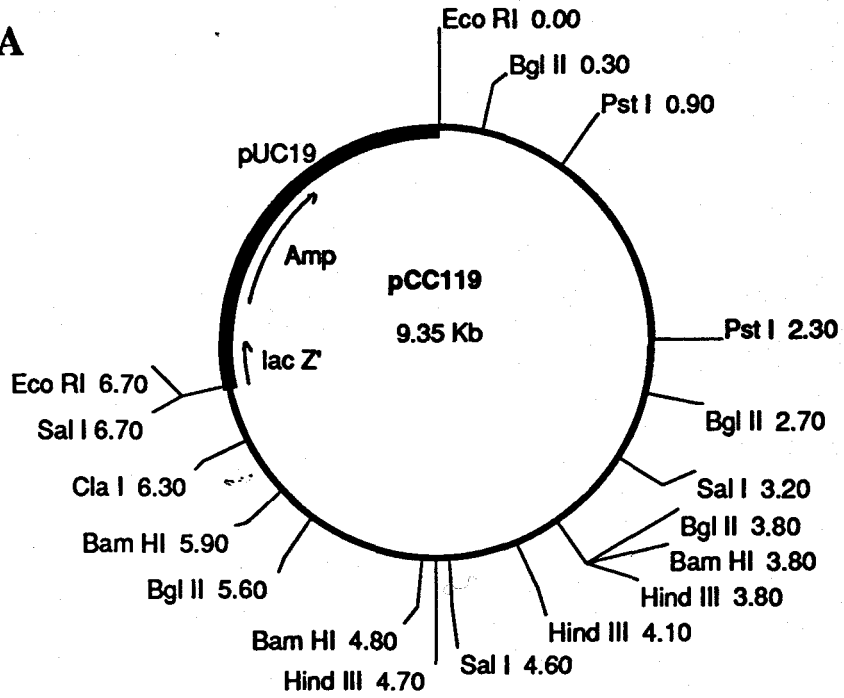
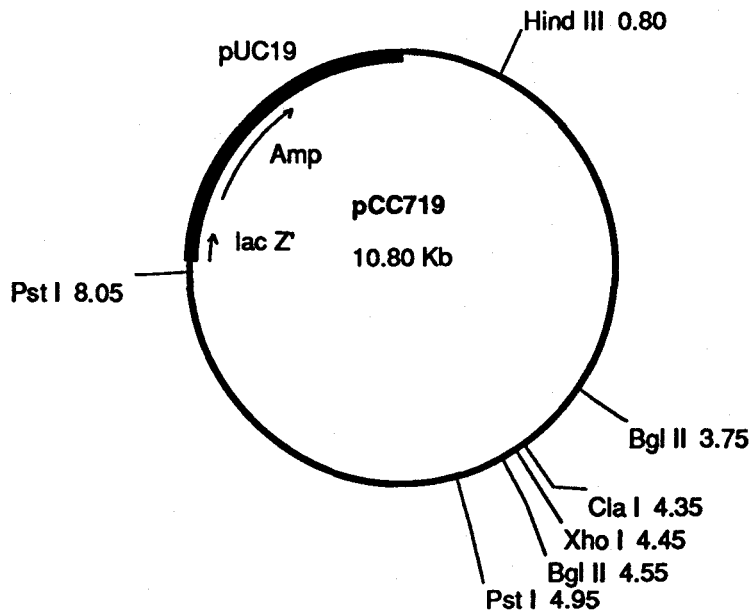


Figura 3.6. Mapa físico de restricción de pCC119 y pCC719. Se indican los puntos de corte de las distintas endonucleasas utilizadas, en el fragmento de ADN perteneciente a *R. trifolii* RS800. Se toma como punto 0.00 el sitio del "polilinker" de pUC19 donde está hecha la clonación. Panel A: Mapa físico de restricción de pCC119. *XhoI* no corta el inserto. Panel B: Mapa físico de restricción de pCC719. *SalI* no corta el inserto.

A



B



DISCUSION.

La existencia de una homología elevada entre secuencias de ADN *ndv*-específicas pertenecientes a *R. meliloti* y el ADN genómico total de *R. trifolii* RS800 (Coronado *et al.*, 1989), nos ha permitido aislar cósmidos recombinantes (pCC11 y pCC71), que contienen secuencias de ADN homólogas a las regiones *ndv* de *R. meliloti*, a partir de un banco de genes de *R. trifolii* construido en el cósmido vector de amplio rango de hospedador pVK102 (Rodríguez-Quiñones *et al.*, 1989).

Fragmentos de restricción pertenecientes a los loci *ndvA* y *ndvB* de *R. meliloti* 102F34 (Dylan *et al.*, 1986; Stanfield *et al.*, 1988) presentan hibridación frente a fragmentos de ADN clonados en los cósmidos pCC11 y pCC71. Un fragmento *SalI* de 2.7 Kb del locus *ndvA* de 102F34 hibrida con un fragmento *EcoRI* de 7 Kb de pCC11; y un fragmento *EcoRI* de 6.2 Kb que contiene casi la totalidad del gen *ndvB* de 102F34, hibrida con un fragmento *EcoRV* de 8 Kb de pCC71. Se ha establecido el mapa físico de restricción de ambos fragmentos del ADN genómico de *R. trifolii* RS800.

Dada la relación filogenética entre *Rhizobium* y *Agrobacterium*, no resulta extraño que compartan alguna información genética que pueda intervenir en los dos procesos infecciosos que ambas bacterias llevan a cabo. Clásicamente se han venido realizando estudios de transferencia de material genético entre estirpes pertenecientes a ambos géneros. Sobre todo se han establecido plásmidos simbióticos de *Rhizobium* en estirpes de *Agrobacterium* libres de cualquier plásmido (Kondorosi *et al.*, 1982). Esta técnica es muy útil cuando se quieren purificar e identificar plásmidos simbióticos, si bien, el grado de adquisición de función en la raza transconjugante de *Agrobacterium* portadora del plásmido simbiótico depende del tipo de raza parental de *Rhizobium*. Así mientras que Martínez *et al.* (1987) han encontrado que el plásmido *Sym* de una raza de *Rhizobium phaseoli* confiere capacidad de nodular y fijar nitrógeno a *Agrobacterium*, otros plásmidos simbióticos sólo le confieren la capacidad de nodular pero no de fijar nitrógeno (Brom *et al.*, 1988).

En los últimos años, esta relación entre *Agrobacterium* y *Rhizobium* se ha estudiado fundamentalmente entre *A. tumefaciens* y *R. meliloti*, haciendo particular hincapié en los genes implicados en la síntesis de polisacáridos producidos por ambas bacterias, que puedan intervenir de alguna forma en su interacción con plantas superiores. Un ejemplo bien estudiado es el de los genes de virulencia (*chv*) de *A. tumefaciens* que se requieren para la formación de tumores (Douglas *et al.*, 1985) y los genes *ndv* de *R. meliloti* que son necesarios para que se establezca una simbiosis efectiva en alfalfa. Los genes *chv* y *ndv* están implicados en ambas bacterias en la síntesis de β -1,2 glucano y una característica fundamental a tener en cuenta es que se trata de genes cuya secuencia es significativamente homóloga y además son funcionalmente intercambiables en experimentos de complementación heteróloga (Dylan *et al.*, 1986).

Otro ejemplo en el que *A. tumefaciens* y *R. meliloti* comparten cierta información genética es la síntesis del polisacárido extracelular. Se han complementado mutantes afectados en la producción del EPS de *A. tumefaciens* por cósmidos portadores de genes *exo* de *R. meliloti* y al contrario (Cangelosi *et al.*, 1987; Uttaro *et al.*, 1990), aunque existen diferencias en cuanto a la distribución genómica de genes *exo*, y al fenotipo de los mutantes; en *A. tumefaciens*, excepto en el caso de mutantes en *exoC*, no se altera la patogenicidad mientras que los mutantes *exo* de *R. meliloti* si ven afectadas sus características simbióticas.

En el presente trabajo se han aislado por complementación heteróloga de mutantes *ndv* de *R. meliloti* dos cósmidos, pCC11 y pCC71, portadores de las regiones *ndv* de *R. trifolii*; que se han comportado como funcionalmente intercambiables por los genes *chv* de *A. tumefaciens*. Esto nos lleva a pensar que la cercanía filogenética entre *Agrobacterium* y *Rhizobium* se hace extensiva también para la especie *R. trifolii*, de manera suficiente como para que compartan cierta información genética importante en sus respectivas asociaciones con plantas superiores. También parece indicar que estos loci se han conservado bastante durante la evolución.

AGRADECIMIENTOS.

Me gustaría hacer constar mi agradecimiento al Dr. Ditta por haberme cedido los mutantes *ndv* (Ty7 y LI1), así como los plásmidos pTy20 y pDOB13 portadores de las regiones *ndv* de *R. meliloti* 102F34; al Dr. Nester por facilitarme los mutantes *chv* de *Agrobacterium tumefaciens* (ME73, ME103, ME66 y ME45); y al Dr. Orive por sus indicaciones y su colaboración en el ensayo de virulencia en tomate.

BIBLIOGRAFIA.

Beringer, J. E. y Hopwood, D. A. (1976). Chromosomal recombination and mapping in *Rhizobium leguminosarum*. *Nature* 264: 291-294.

Birnboim, H. C. y Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.

Brom, S., Martínez, E., Dávila, G. y Palacios, R. (1988). Narrow- and broad-host range symbiotic plasmids of *Rhizobium* spp. strains that nodulate *Phaseolus vulgaris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1280-1283.

Cangelosi, G. A., Hung, L., Puvanesarajah, V., Stacey, G., Ozga, D. A., Leigh, J. A. y Nester, E. W. (1987). Common loci for *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide synthesis and their roles in plant interactions. *J. Bacteriol.* 169: 2086-2091.

Casadesús, J. y Olivares, J. (1979). Rough and fine linkage mapping of the *Rhizobium meliloti* chromosome. *Mol. Gen. Genet.* 174: 203-209.

Cebolla, A., Ruíz-Berraquero, F. y Palomares, A. J. (sometido a publicación). Expression and quantification of firefly luciferase under *Rhizobium meliloti* symbiotic promoters. *J. Bioluminescence and Chemiluminescence*.

Clark, L. y Carbon, J. (1979). Selection of specific clones from colony banks by suppression or complementation tests. *Methods Enzymol.* 68: 396-408.

Coronado, C., Megias, M. Ruíz-Berraquero, F. y Palomares, A. J. (1989). Interspecies homology of nodule development genes in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* 59: 289-296.

Ditta, G. (1986). Tn5 Mapping of *Rhizobium* nitrogen fixation genes. *Methods Enzymol.* 118: 519-528.

Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D. y Helinski, D. R. (1980). Broad host-range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 7347-7351.

Ditta, G., Schmidhauser, T., Yakobson, E., Lu, P., Liang, X. -W., Finlay, D. R., Guiney, D. y Helinski, D. R. (1985). Plasmids related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. Plasmid 13: 149-153.

Douglas, C. J., Staneloni, R., J., Rubin, R. A. and Nester, E. W. (1985). Identification and genetic analysis of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence region. J. Bacteriol. 161: 850-860.

Dylan, T., Ielpi, L., Stanfield, S., Kashyap, L., Douglas, C., Yanofsky, M., Nester, E., Helinski, D. R. and Ditta, G. (1986). *Rhizobium meliloti* genes required for nodule development are related to chromosomal virulence genes in *Agrobacterium tumefaciens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4403-4407.

Friedman, A. M., Long, S. R., Brown, S. E., Buikema, J. W. y Ausubel, F. M. (1982). Construction of the broad cosmid cloning vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium* mutants. Gene 18: 289-296.

Innes, R. W., Hirose, M. A. y Kuempel, P. L. (1988). Induction of nitrogen-fixing nodules on clover requires only 32 kilobase pairs of DNA from the *Rhizobium trifolii* symbiosis plasmid. J. Bacteriol. 170: 3793-3802.

Ish-Horowicz, D. y Burke, J. F. (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. Nucleic Acids Res. 9: 2989-2998.

Kim, C. -H., Helinski, D. R. y Ditta, G. (1986). Overlapping transcription of the *nifA* regulatory gene in *Rhizobium meliloti*. Gene 50: 141-148.

Knauf, V. C. y Nester, E. W. (1982). Wide host range cloning vectors: A cosmid clone bank of an *Agrobacterium* Ti plasmid. *Plasmid* 8: 45-54.

Kondorosi, A., Kiss, G. B., Forrai, T. I., Vinze, E. y Banfalvi, Z. (1977). Circular linkage map of *R. meliloti* chromosome. *Nature* 268: 525-528.

Kondorosi, A., Kondorosi, E., Pankhurst, C. E., Broughton, W. y Banfalvi, Z. (1982). Mobilization of a *Rhizobium meliloti* megaplasmid carrying nodulation and nitrogen fixation genes into other rizobia and *Agrobacterium*. *Mol. Gen. Genet.* 188: 433-439.

Long, S. R., Buikema, J. W. y Ausubel, F. M. (1982). Cloning of *Rhizobium meliloti* nodulation genes by direct complementation of Nod⁻ mutants. *Nature* 298: 485-488.

Maniatis, T., Fritsch, E. F. y Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

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

Megias, M., Caviedes, M. A., Palomares, A. y Perez-Silva, J. (1982). Use of plasmid R68.45 for constructing a circular linkage map of the *Rhizobium trifolii* chromosome. *J. Bacteriol.* 149: 59-64.

Megias, M., Caviedes, M. A., Andrés, M., Sousa, C., Ruíz-Berraquero, F. y Palomares, A. J. (1988). Localization of *his* genes on the *Rhizobium trifolii* RS800 linkage map. *Mol. Gen. Genet.* 211: 369-372.

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

O'Kane, D. J., Lingle, W. L., Wampler, J. E., Legocki, M., Legocki, R. P. y Szalay, A. A. (1988). Visualization of bioluminescence as a

marker of gene expression in *Rhizobium*-infected soybean root nodules. *Plant Mol. Biol.* 10: 387-399.

Rigaud, J. y Puppo, A. (1975). Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacteroids. *J. Gen. Microbiol.* 88: 223-228.

Rodriguez-Quiñones, F., Fernandez-Burriel, M., Banfalvi, Z., Megias, M. y Kondorosi, A. (1989). Identification of a conserved, reiterated DNA region that influences the efficiency of nodulation in strain RS1051 of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2: 75-83.

Stanfield, S. W., Ielpi, L., O'Brochta, D., Helinski, D. R. and Ditta, G. (1988). The *ndvA* gene product of *Rhizobium meliloti* is required for β -(1->2)-glucan production and has homology to the ATP-binding export protein HlyB. *J. Bacteriol.* 170: 3523-3530.

Sundaresan, V., Ow, D. W. y Ausubel, F. M. (1983). Activation of *Klebsiella pneumoniae* and *Rhizobium meliloti* nitrogenase promoters by (*ntr*) regulatory proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 4030-4034.

Szeto, W. W., Zimmerman, J. L., Sundaresan, V. y Ausubel, F. M. (1984). A *Rhizobium meliloti* symbiotic regulatory gene. *Cell* 36: 1035-1043.

Uttaro, A. D., Cangelosi, G. A., Geremia, R. A., Nester, E. W. y Ugalde, R. A. (1990). Biochemical characterization of avirulent *exoC* mutants of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 172: 1640-1646.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. y Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119.

CAPITULO 4

**Aislamiento y caracterización de mutantes *ndvB* de
Rhizobium trifolii RS800**

INTRODUCCION.

La mutagénesis por transposición es un método extremadamente útil para el análisis genético de *Rhizobium* y de otras bacterias Gram-negativas. Los transposones son secuencias pequeñas de ADN que son incapaces de replicarse por sí mismas y que pueden integrarse en replicones de ADN tales como cromosomas o plásmidos. El transposon Tn5 es el mutágeno biológico preferido para la mutagénesis transposicional en *Rhizobium*. El Tn5 confiere resistencia a kanamicina y neomicina, y en el caso de *Rhizobium* también confiere resistencia a estreptomicina.

Entre las ventajas de la mutagénesis con Tn5 se encuentran: la inactivación génica por inserción del marcador de resistencia a kanamicina en el lugar de la mutación, la facilidad para localizar la mutación mediante análisis con enzimas de restricción, la localización al azar de las mutaciones, el efecto polar, y la baja frecuencia de reversión de las mismas (De Bruijn y Lupski, 1984).

En *Rhizobium* se han usado dos técnicas diferentes para obtener mutantes simbióticamente defectuosos usando el transposón Tn5. La mutagénesis generalizada implica la introducción de Tn5 mediante la utilización de plásmidos suicidas, inestables en *Rhizobium*, transferidos por conjugación a la estirpe silvestre; por selección en medios adicionados de neomicina se aíslan mutantes con inserciones al azar del transposón. La mutagénesis dirigida permite la alteración de determinadas secuencias clonadas, utilizando *E. coli* como hospedador intermediario. La inserción de Tn5 seleccionada se transfiere posteriormente al genomio del hospedador original por recombinación homóloga.

Mediante mutagénesis dirigida por transposición con Tn5, Dylan *et al.* (1986) originaron inserciones del transposón en las regiones *ndvA* y *ndvB* del genomio de *Rhizobium meliloti* 102F34. Este proceso dió lugar a la creación de mutantes, en ambos locus, simbióticamente defectuosos y cuyo fenotipo en planta era Nod⁺ Fix⁻. Aparentemente el crecimiento vegetativo de los mutantes no se veía afectado; las células crecían en presencia de manitol o succinato como fuente de carbono y no mostraban diferencias en su

capacidad para unir calcofluor, que es un colorante fluorescente específico de polisacáridos con uniones β .

La inoculación de plantas de alfalfa con mutantes *ndvA* o *ndvB* conduce a la formación de nódulos amarillentos o blancos, pequeños, más numerosos que los inducidos por la cepa silvestre, carentes de bacteroides y por tanto no fijadores de nitrógeno. Estos nódulos son similares a los producidos por mutantes de *R. meliloti* defectuosos en la producción de exopolisacárido ácido (Finan *et al.*, 1985; Leigh *et al.*, 1985; Leigh *et al.*, 1987). Los mutantes *ndv* inducen curvatura del pelo radical, son ligeramente deficientes en adhesividad e inician la formación de un pequeño número de cordones de infección (Dylan *et al.*, 1990b), pero no se han observado bacterias ni cordones de infección en pseudonódulos maduros (Dylan *et al.*, 1986).

Dylan *et al.* (1990b) detectaron además una serie de alteraciones vegetativas en los mutantes *ndv* como son un descenso en la motilidad, menor sensibilidad a bacteriófagos y un incremento en la sensibilidad a antibióticos hidrófobos y a condiciones de baja osmolaridad.

El mutante *ndvA* no produce β -1,2 glucano periplásmico ni extracelular (Stanfield *et al.*, 1988) aunque está presente el complejo intermediario azúcar-proteína implicado en la síntesis del glucano cíclico en *Agrobacterium tumefaciens* y *R. meliloti* (Zorreguieta y Ugalde, 1986). En el caso del mutante *ndvB*, no se produce el β -1,2 glucano debido a la ausencia de esta proteína de membrana de gran tamaño (Ielpi *et al.*, 1990). En el mutante *ndvB* (Ty7) se cuantificó la producción de exopolisacárido y ésta fue comparable con la de la cepa silvestre (Dylan *et al.*, 1986); en cuanto a la composición química del exopolisacárido ácido producido por los mutantes *ndv*, Ielpi *et al.* (1990) han determinado mediante estudios de RMN que no presenta ninguna variación con respecto al producido por la cepa silvestre.

Dylan *et al.* (1990a) han demostrado que el β -1,2 glucano es necesario en *R. meliloti* para la adaptación a condiciones de baja osmolaridad y que los mutantes *ndv* presentan una serie de características fenotípicas que sugieren la existencia de alteraciones

en la superficie celular derivadas de un fallo en la osmoadaptación. Mediante el aislamiento de pseudorevertientes se ha podido separar la deficiencia simbiótica del resto del fenotipo mutante; así los pseudorevertientes aislados por restauración de la motilidad (característica vegetativa) recuperan en parte la adhesividad y la capacidad simbiótica, y sólo ligeramente la capacidad de iniciación de cordones de infección. Por otro lado los pseudorevertientes aislados por restauración en la simbiosis no recuperaron ninguna propiedad vegetativa, ni la capacidad de iniciación de cordones de infección, ni tampoco la adhesividad. Estos resultados sugieren que la cepa silvestre presenta sobradas condiciones para la adhesión e iniciación del cordón de infección, y que el bloqueo simbiótico de los mutantes *ndv* no radica en estas primeras etapas del proceso simbiótico, sino probablemente a nivel de la extensión del cordón de infección. En ninguno de los pseudorevertientes aislados se recuperó la capacidad de producir β -1,2 glucano, lo que parece indicar la posibilidad de que este oligosacárido no esté implicado directamente en el desarrollo del nódulo (Dylan *et al.*, 1990b).

Toro y Olivares (1986) mediante incubación a temperatura supraóptima de la cepa GR4 de *R. meliloti* obtuvieron un mutante, GRT21s que produce el doble de exopolisacárido que la cepa silvestre y no produce β -1,2 glucano debido a la carencia de la proteína intermediaria de 235 KDa (Geremia *et al.*, 1987). GRT21s produce pseudonódulos en alfalfa, induce curvatura del pelo radical pero no se detecta cordón de infección y carecen de bacteroides. La mutación de GRT21s se ha localizado en el locus *ndvB* y el fenotipo simbiótico y vegetativo del mutante se complementa por un gen *ndvB* funcional (Soto *et al.*, 1990). Se han aislado revertientes genéticos verdaderos de GRT21s que recuperan la capacidad simbiótica y la producción de β -1,2 glucano.

En *R. meliloti* 2011 se aislaron por mutagénesis con Tn5, mutantes defectuosos en simbiosis que inducían la formación de nódulos carentes de cordón de infección y bacteroides (Inf⁻). Estos mutantes producían cantidades de exopolisacárido ácido superiores a las de la cepa silvestre (EPS*), y el polisacárido carecía del resto piruvato de la cadena lateral de la unidad octosacarídica que se repite (Müller *et al.*, 1988b). Las inserciones de Tn5 en estos

mutantes se localizaron en un fragmento *Eco* RI de 6.4 Kb de origen cromosómico que presentaba homología con el locus *ndvB* de *R. meliloti* 102F34 (Müller *et al.*, 1988a). Quandt *et al.* (1990) han estudiado un mutante por delección del locus *ndvB* de *R. meliloti* 2011 que induce pseudonódulos en alfalfa, no produce β -1,2 glucano y presenta problemas de osmotolerancia; por mutación espontánea se han aislado pseudorevertientes osmotolerantes que inducen la formación de nódulos Fix⁻ con cortos cordones de infección. En experimentos de coinoculación con mutantes Nod⁻ de *R. meliloti*, los mutantes Inf⁻ EPS* no dieron lugar a la formación de nódulos Fix⁺ (Müller *et al.*, 1988b), en cambio cuando se inoculó con la mezcla del mutante Nod⁺ y un pseudorevertiente osmotolerante se establecieron nódulos fijadores de nitrógeno en alfalfa, aunque estaban ocupados en su mayor parte por el mutante Nod⁻ (Quandt *et al.*, 1990).

En este Capítulo presentamos la estrategia seguida para la mutagénesis del locus *ndvB* de *Rhizobium trifolii* RS800 y la caracterización fenotípica de las mutaciones.

MATERIAL Y METODOS.

Bacterias y plásmidos.

En este estudio se utilizó la estirpe silvestre *Rhizobium trifolii* RS800 (Megias *et al.*, 1988) y la estirpe HB101 de *Escherichia coli*. Los plásmidos utilizados se describen en la Tabla 4.1.

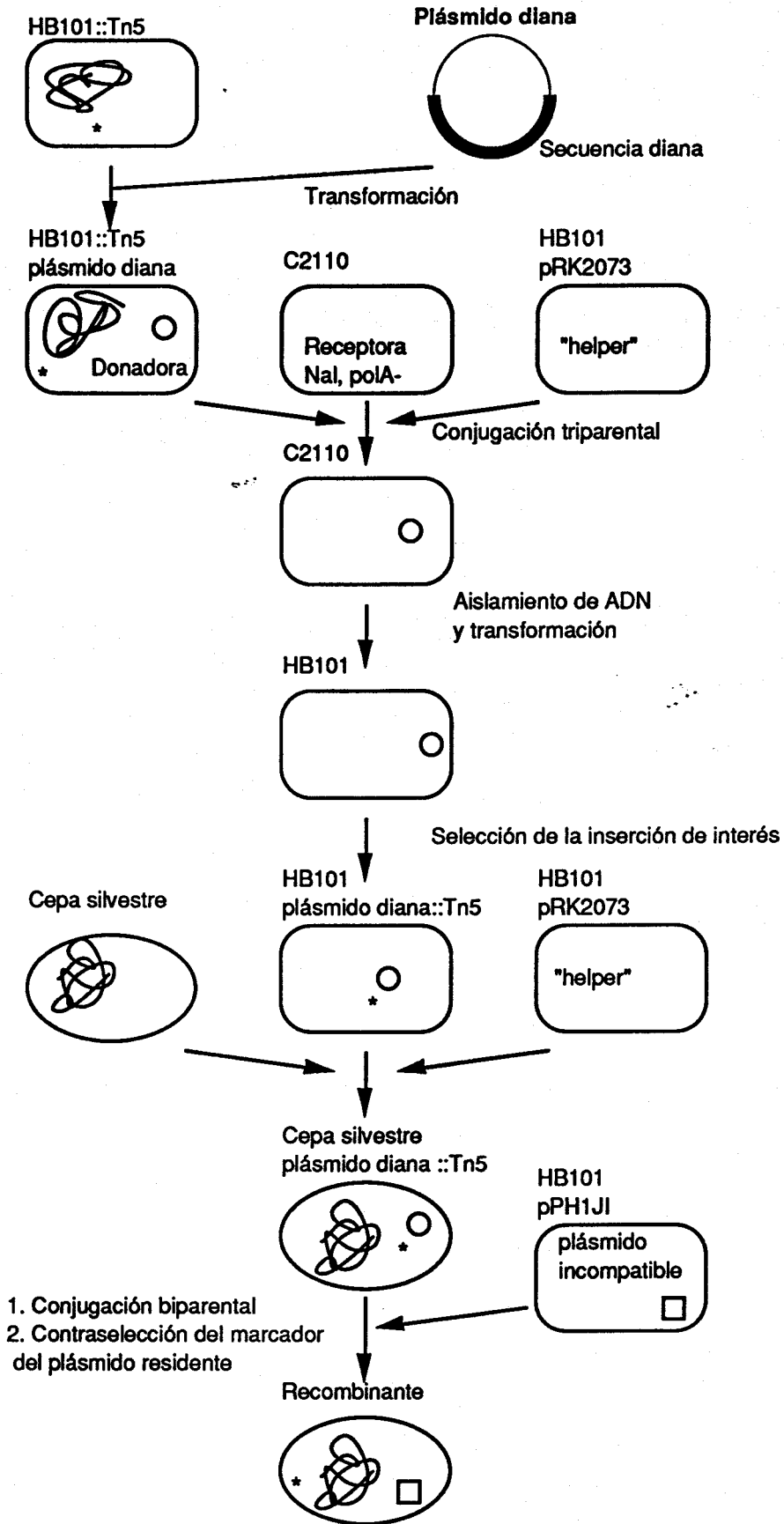
Medios y condiciones de cultivo.

Se emplearon los medios y condiciones de cultivo descritos en el Capítulo 2; y se adicionaron los antibióticos apropiados a las concentraciones finales reflejadas en el Capítulo 3 preparados de la forma que allí se indica. Para seleccionar las estirpes marcadas con el gen de la aminoglicósido 3' fosfotransferasa se utilizó una concentración final de 50 μ g/ml de kanamicina para *E. coli* y de 50 μ g/ml de neomicina para *R. trifolii*. Estos antibióticos se disolvieron en agua destilada y se esterilizaron por filtración. Para la extracción del β -1,2 glucano de *R. trifolii* se utilizó el medio GYM descrito por Dylan *et al.* (1990a) que contiene 1 mM glutamato,

TABLA 4.1. Plásmidos.

Plásmidos		Referencias
pRK293	derivado de pRK290 Tc ^r y Km ^r	Ditta <i>et al.</i> (1985)
pRK2073	plásmido "helper" Spc ^r	Ditta <i>et al.</i> (1980)
pBR322	plásmido vector Tc ^r y Amp ^r	Bolivar <i>et al.</i> (1977)
pPH1JI	plásmido Spc ^r perteneciente al grupo de incompatibilidad Inc P	Hirsch y Beringer (1984)
pCC714	derivado de pBR322 portador del fragmento <i>EcoRV</i> de 8Kb que contiene el locus <i>ndvB</i> de RS800	Este trabajo
pCC718	derivado de pRK293 portador del locus <i>ndvB</i> de RS800	Este trabajo
pCC7181	derivado de pCC718 que contiene una inserción del cassette de la Km en el locus <i>ndvB</i>	Este trabajo
pCC119	derivado de pUC19 que contiene el locus <i>ndvA</i> de RS800	Este trabajo
pCC911	derivado de pUC19 que contiene el locus <i>ndvA</i> de RS800 en la orientación contraria a pCC119	Este trabajo
pCC719	derivado de pUC19 que contiene el locus <i>ndvB</i> de RS800	Este trabajo
pCC917	derivado de pUC19 que contiene el locus <i>ndvB</i> de RS800 en la orientación contraria a pCC719	Este trabajo

Figura 4.1. Técnica de mutagénesis dirigida. Esquema de la creación de mutantes mediante la técnica de mutagénesis dirigida, siguiendo las indicaciones de Ditta (1986). *= Tn5.



0.02% p/v extracto de levadura, 20 mM manitol, 1 mM K₂HPO₄ (pH 6.8), 0.5 mM CaCl₂ y 0.5 mM MgSO₄. Para estudiar la motilidad se utilizó medio TY adicionado de un 0.3% de agar Oxoid N°1.

Mutagénesis dirigida mediante la técnica de marcador de cambio.

La mutagénesis dirigida es una técnica que combina la metodología de ADN recombinante con el uso de transposones. La estrategia consiste en obtener inserciones de un transposón en un fragmento clonado de ADN mantenido en *E. coli* como organismo intermediario para transferir a continuación determinadas inserciones al genomio del organismo original por recombinación homóloga. Esta técnica fue descrita por Ruvkun y Anisimov (1981). En el presente trabajo la técnica se ha realizado siguiendo las especificaciones de Ditta (1986) y se ha utilizado pRK293 como vehículo para la clonación de la región que se quería mutagenizar y pPH1JI como plásmido incompatible para forzar la recombinación. Los recombinantes se seleccionaron en medio TY conteniendo Spc y Nm. A continuación se investigó la sensibilidad de éstos a tetraciclina. En la Figura 4.1 se muestra un esquema de la realización de esta técnica.

Ligamiento de ADN.

Se realizó siguiendo los procedimientos descritos en el Capítulo 3. Para convertir en extremos planos los extremos originados al digerir pRK293 con *Hind*III, se realizó un tratamiento con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa de *E. coli* (Boehringer Mannheim). Se trataron 5 µg de vector, previamente digerido con el enzima y purificado a continuación por fenolización, con 10 unidades enzimáticas de polimerasa Klenow en un volumen final de 20 µl de reacción de concentración final 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM MgCl₂, 10 mM β-mercaptoetanol, 100 µg/ml BSA, 0.25 mM dCTP, 0.25 mM dGTP, 0.25 mM dATP y 0.25 mM dTTP. La reacción se mantuvo 60 min a temperatura ambiente y pasado este tiempo se detuvo añadiendo 1 µl de EDTA 0.5 M y se purificó el ADN mediante fenolización seguida de precipitación con etanol.

Ensayo de nodulación.

Para los ensayos de nodulación en trébol se usaron semillas de trébol blanco (*Trifolium repens* cv. Huia) y de trébol subterráneo (*Trifolium subterraneum* cv. Seaton Park). Los ensayos se realizaron

en jarros Leonard siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo 3. También en algunas ocasiones en tubo, para lo que se utilizó la misma solución nutritiva y una tira de papel de filtro donde tras esterilización en el autoclave se colocaron dos semillas por tubo.

Microscopía de cortes de nódulos.

Se seleccionaron nódulos formados por cada una de las cepas objeto de este estudio a las cuatro semanas de la inoculación. Para cada cepa se recolectaron al menos seis nódulos provenientes de plantas distintas.

Los nódulos se fijaron a 4°C durante dos horas en una solución de glutaraldehído al 3% en cacodilato sódico 100 mM pH 7.2-7.4. La solución de glutaraldehído se eliminó mediante dos lavados de 15 min y uno de 2 h a 4°C con el tampón cacodilato sódico 100 mM. A continuación se realizó una postfijación con una solución de tetróxido de osmio al 1% p/v en cacodilato sódico 100 mM pH 7.2 durante 2 h. Pasado este tiempo se lavaron tres veces con el mismo tampón para eliminar la solución fijadora.

Una vez fijados los nódulos se procedió a la deshidratación de los mismos mediante sucesivos pases por acetona de concentración gradualmente creciente (50%, 70%, 80%, 90% y 100%) durante 15 min cada vez y finalmente dos veces en acetona 100% durante 30 min. En el momento de la deshidratación con acetona 70% se hizo un tratamiento con acetato de uranilo al 1% p/v en acetona 70% durante 2 h. Antes de continuar la deshidratación se eliminaron los residuos de acetato de uranilo mediante lavados con acetona 70%.

Para la inclusión se utilizó resina Spurr que se preparó mezclando 10 g de dióxido de vinil ciclohexano (V. C. D.), 26 g de norenil succínico anhidro (N. S. A.), 7 g de epoxi-resina (D. E. R.) y 0.4 g de dimetilaminoetanol (D. M. A. E.). La inclusión de los nódulos, previamente deshidratados, se realizó manteniéndolos inicialmente en una mezcla 1:1 acetona-resina y a continuación durante 12 h en resina. Los nódulos se colocaron en recipientes adecuados y se les añadió resina pura recién preparada, pasándolos a una estufa a 70°C durante 8 h, tiempo preciso para la solidificación de la resina.

Se realizaron cortes semifinos de 0.5 a 1 μm de espesor, se tiñeron con una solución de azul de toluidina 0.1% p/v y se observaron en un microscopio óptico.

Microscopía de epifluorescencia.

Se utilizaron cultivos en medio TY incubados durante 4 días a 30°C. A 1 ml de cultivo se añadieron 10 μl de una solución 1 % p/v de naranja de acridina en agua destilada. Pasados 5 min se colocaron 20 μl entre porta y cubre y se observaron en un microscopio de epifluorescencia con una luz incidente de 450-495 nm. Las preparaciones se fotografiaron con película Ektachrome 400 ASA.

Extracción de β -1,2 glucano.

Para la extracción de β -1,2 glucano periplásmico se utilizó la técnica descrita por Dylan *et al.* (1990a). Se obtuvo un cultivo de *Rhizobium* de 500 ml en medio GYM conteniendo manitol a una concentración final de 20 mM incubado durante 4 días a 30°C.

Las células se recogieron por centrifugación a 18.000 x g durante 30 min a 5°C y a continuación se lavaron con una solución 1 mM K_2HPO_4 (pH 6.8)/0.5 mM CaCl_2 /0.5 mM MgSO_4 . Tras centrifugación a 30.000 x g durante 20 min a 5°C, se realizó una extracción con una solución de ácido tricloroacético al 1% (Miller *et al.*, 1986). El extracto se neutralizó a pH 7.0 con hidróxido amónico y se concentró por liofilización.

Esta preparación se purificó por intercambio iónico y cromatografía de filtración en gel (Stanfield *et al.*, 1988). Se utilizó una columna de resina de intercambio iónico (10 x 80 mm; AG1-X4, 50-100 mesh; Bio-Rad Laboratories) y se utilizó acetato de trietanolamina 10 mM pH 5.5 como eluyente. Se recogieron fracciones de 1 ml y se determinó en ellas la presencia de carbohidratos por el método de la antrona (Mokrasch, 1954). Las fracciones que contenían carbohidratos se reunieron y liofilizaron para posteriormente disolverse en 0.5 ml de agua destilada y pasarse por una columna de gel de poliacrilamida (10 x 120 mm; Biogel P4, Medium; Bio-Rad Laboratories). Se empleó como eluyente una solución de acetato de trietanolamina 100 mM pH 5.5

adicionada de un 0.02% de azida sódica. Se recolectaron fracciones de 1.5 ml y analizaron por el método de la antrona.

Análisis de transcripción y traducción in vitro.

Se utilizó un kit de transcripción y traducción in vitro procariótico suministrado por Amersham. La reacción de síntesis in vitro de proteínas se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante y se emplearon 20 μ Ci de L-(S³⁵) metionina para marcar los péptidos formados.

Las proteínas se separaron mediante electroforesis en gel SDS-10% poliacrilamida, utilizando un tampón 25 mM Tris-HCl (pH 8.3)/192 mM glicina/0.1% SDS y una intensidad de corriente constante de 35 mA. A continuación se fijó el gel en acético al 7% durante 30 min, se trató dos veces con dimetilsulfóxido (DMSO) y se mantuvo después durante 3 h en difenil oxazol (PPO) al 12 % p/v en DMSO antes de secarlo y exponerlo para fluorografía.

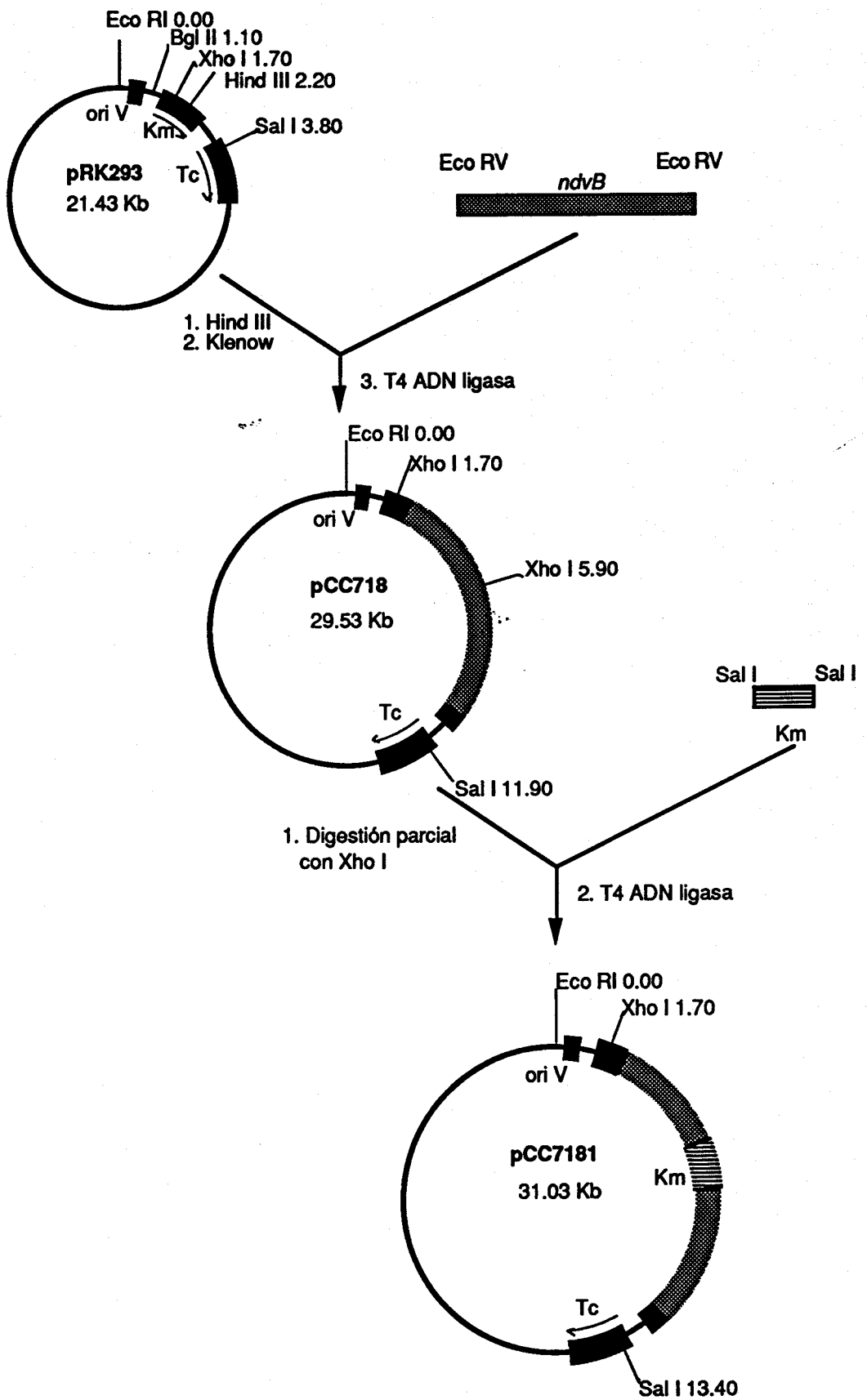
RESULTADOS.

Creación de mutantes *ndvB* de *R. trifolii* RS800.

Tal como se describe en el Capítulo 3, el cósmido pCC71, que complementa funcionalmente mutantes *ndvB* de *R. meliloti* y mutantes *chvB* de *Agrobacterium tumefaciens*, contiene un fragmento *EcoRV* de aproximadamente 8 Kb que hibrida fuertemente con la sonda *ndvB* de *R. meliloti* 102F34 descrita en el Capítulo 2. Este fragmento se ha subclonado en el sitio *EcoRV* de pBR322 originándose el nuevo plásmido pCC714.

Para mutagenizar el locus *ndvB* de *R. trifolii* RS800 decidimos utilizar este fragmento e introducir la mutación en el genomio de la cepa silvestre mediante la técnica de marcador de cambio. Para ello necesitábamos disponer del locus *ndvB* clonado en un plásmido estable en *Rhizobium*. En la Figura 4.2 se esquematiza el procedimiento seguido. Elegimos el vector pRK293, plásmido derivado de pRK290, de amplio rango de hospedador y perteneciente al grupo de incompatibilidad P1. pRK293 se digirió con *HindIII* y posteriormente se trató con Klenow de forma que se

Figura 4.2. Construcción de pCC7181. Esquema de la construcción del plásmido pCC7181 utilizado en la creación de la mutación en el locus *ndvB* de *R. trifolii* RS800.



rellenaron sus extremos y quedaron preparados para ligarse a los extremos planos del fragmento *ndvB* obtenidos del plásmido pCC714 por digestión con *EcoRV*. Esta clonación dió lugar al plásmido pCC718 que posteriormente fué objeto de la mutagénesis.

Con el fin de obtener de forma rápida y directa una mutación localizada en el fragmento y dado que conocíamos el mapa físico de restricción del mismo, realizamos la clonación del cassette que codifica el gen de resistencia a kanamicina (*Kan^r Gen BlockTM* (*EcoRI*), Pharmacia) en el punto interno *XhoI*. Para ello hubo de hacerse una digestión parcial con *XhoI* del plásmido pCC718 ya que presenta otro punto de corte *XhoI* en la parte que procede de pRK293. Se seleccionaron los clones resistentes a kanamicina y se analizaron para conocer la localización del cassette. En el nuevo plásmido pCC7181 el gen de resistencia a kanamicina se sitúa en el punto interno *XhoI* del locus *ndvB*. En la Figura 4.2 se muestra un esquema de la estrategia seguida para la construcción de pCC7181.

A continuación se introdujo la mutación del locus *ndvB* en el cromosoma de *R. trifolii* RS800 por la técnica de marcador de cambio (Figura 4.1). Mediante conjugación triparental usando pRK2073 como plásmido "helper" se creó una estirpe merodiploide al introducir pCC7181 en *R. trifolii* RS800. Se forzó la homogenotización por la entrada mediante conjugación biparental del plásmido pPH1JI, perteneciente al mismo grupo de incompatibilidad que pCC7181, seleccionando los transconjugantes en medio TY con Spc y Nm.

Por último se comprobó la sensibilidad a tetraciclina de los transconjugantes obtenidos, observándose que el 8% de ellos era tetraciclina sensible. Así mismo se verificó por hibridación la recombinación del cassette de resistencia a Km en el genomio de la estirpe CAR1 de *R. trifolii*. Para ello se extrajo el ADN genómico total de las estirpes RS800 y CAR1 y se digirió con *EcoRI*. El ADN se transfirió a un filtro de nitrocelulosa e hibridó frente al cassette de resistencia a Km. No se encontró ninguna señal de hibridación en el ADN total de RS800. Sin embargo en el carril correspondiente al ADN total digerido con *EcoRI* de la estirpe CAR1, se detectó una banda única de hibridación.

Figura 4.3. Floculación en medio líquido de la estirpe CAR1 de *Rhizobium trifolii*. Panel A: Cultivos en medio rico TY incubados durante 4 días; a la derecha un cultivo de la estirpe RS800 y a la izquierda un cultivo de la estirpe CAR1. Panel B: Células individualizadas de un cultivo de la estirpe RS800 observadas por epifluorescencia. Panel C: Agrupación de células de un cultivo de la estirpe CAR1 observada por epifluorescencia.

De esta forma se obtuvo un mutante denominado CAR1 cuyo crecimiento en medio rico TY es bastante más lento que el de la cepa silvestre y presenta una marcada tendencia a la autoaglutinación en medio líquido. Este fenómeno de autoaglutinación o floculación puede observarse a nivel microscópico y también a simple vista en el cultivo. En la Figura 4.3 se presentan fotografías de los cultivos de las estirpes RS800 y CAR1, obtenidas tanto en los tubos, como al microscopio de epifluorescencia utilizando naranja de acridina como colorante fluorescente. En el cultivo de la estirpe RS800 se observan al microscopio células individualizadas, mientras que en el cultivo de la estirpe CAR1 se pueden apreciar aglomeraciones de células atrapadas en una malla de aspecto laxo.

La motilidad de la estirpe CAR1 se observó en placas de agar blando y no se detectó ninguna diferencia con respecto a la motilidad de la estirpe silvestre RS800.

Fenotipo en planta de la estirpe CAR1.

Se investigó la interacción de la estirpe CAR1 con plantas de trébol utilizando tanto trébol blanco (*Trifolium repens*) como trébol subterráneo (*Trifolium subterraneum*) que son dos hospedadores habituales de la estirpe silvestre *R. trifolii* RS800.

Se realizó un ensayo en jarros Leonard que se mantuvieron en cámara iluminada durante cuatro semanas. En el porte de las plantas sólo se pudo apreciar una ligera diferencia en el desarrollo de las plantas inoculadas con la estirpe CAR1 y la estirpe silvestre. Las raíces de las plantas inoculadas con RS800 presentaban nódulos de morfología típica, color rojo y tamaño normal situados en la raíz principal. En las plantas inoculadas con la estirpe CAR1 se detectó la presencia de mayor número de nódulos cuya morfología era variada. Se podían observar nódulos rosados situados en la raíz principal aunque de menor tamaño que los observados en las plantas inoculadas con la cepa silvestre, y nódulos blanquecinos más pequeños y numerosos, frecuentemente localizados en los puntos donde emergen las raíces secundarias (Figura 4.4).

Figura 4.4. Plantas de trébol inoculadas con las estirpes RS800 y CAR1 de *Rhizobium trifolii*. Panel A: Raíces inoculadas con *R. trifolii* RS800 (izquierda) y CAR1 (derecha). Panel B: Raíz inoculada con la estirpe RS800. Panel C: Raíz inoculada con la estirpe CAR1.

Se comprobó mediante medidas de reducción de acetileno que en las plantas inoculadas con la estirpe CAR1 se detectaba capacidad para fijar nitrógeno.

Estudio de la estructura de los nódulos formados por RS800 y CAR1.

El estudio de la estructura de los nódulos se realizó en plantas de trébol subterráneo seleccionando nódulos formados por la estirpe silvestre *R. trifolii* RS800 y nódulos formados por la estirpe CAR1, pertenecientes a los dos tipos macromorfológicamente diferentes que se pueden observar, para realizar así un estudio comparativo.

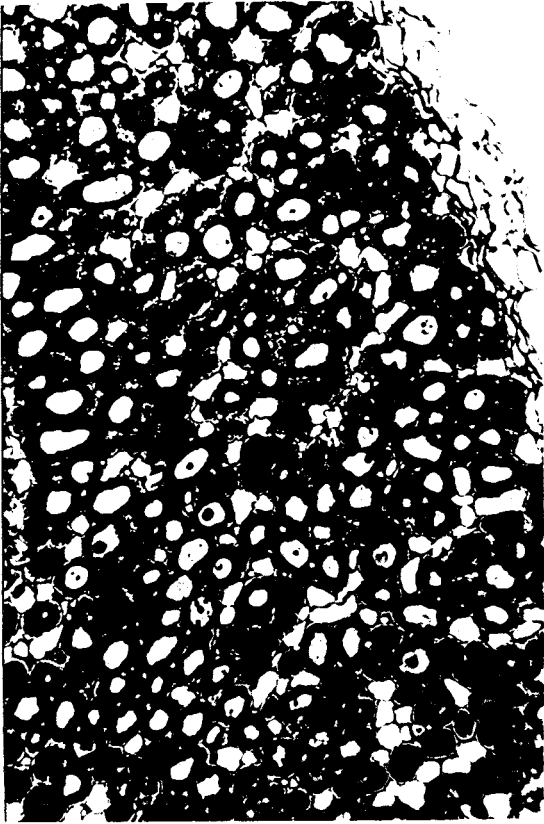
Se trataron como tres muestras diferentes. Se recolectaron seis nódulos de cada tipo provenientes de distintas plantas. La observación de los cortes semifinos al microscopio óptico nos permitió apreciar diferencias en la estructura interna de los nódulos.

En el caso de la cepa silvestre los nódulos formados presentan una morfología típica de los nódulos efectivos de tipo indeterminado formados por exodermis y endodermis, una zona de células procedentes del córtex de la raíz con trazas de canales vasculares periféricos y una zona central que contiene células invadidas y células no invadidas, siendo mucho mayor el número de las primeras. Las células infectadas contienen numerosos bacteroides y la invasión es uniforme en las células de las distintas zonas del nódulo. Entre las células quedan espacios intercelulares carentes de bacterias y no demasiado amplios. En las células invadidas existen pequeñas vacuolas periféricas y a veces una central, y en las células no invadidas se observan pequeños gránulos de almidón (Figura 4.5).

El estudio microscópico de la estructura de aquéllos nódulos formados por la estirpe CAR1, cuyo aspecto era similar al de los inducidos por la estirpe silvestre, permitió la observación de una serie de características que establecían diferencias entre ambos tipos de nódulos. Así el número de células no invadidas es considerablemente superior en los nódulos inducidos por CAR1. El número de bacteroides, en las distintas células invadidas, es

Figura 4.5. Microscopía de nódulos formados por la estirpe RS800 de *Rhizobium trifolii*. Corte semifino de un nódulo, teñido con azul de toluidina, observado en el microscopio óptico con objetivo 10X (Panel A), 40X (Panel B) y 100X (Panel C).

A



B



C

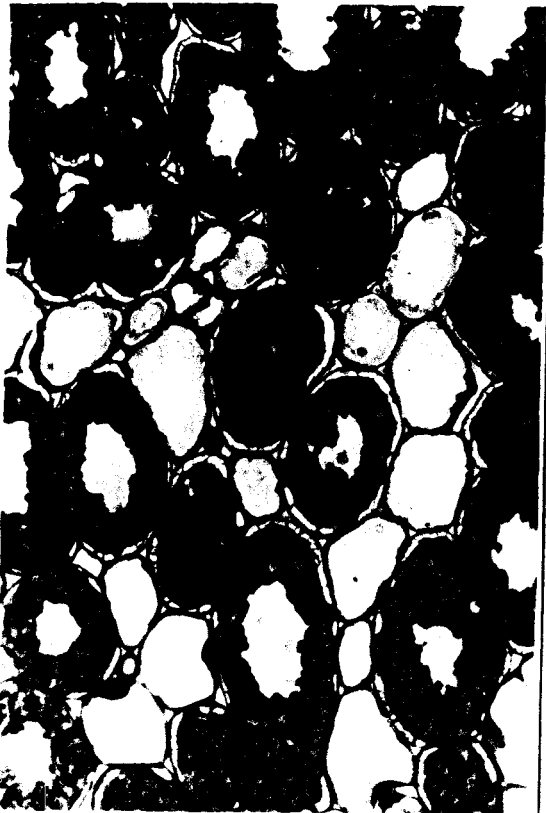


Figura 4.6. Microscopía de nódulos, similares a los inducidos por la cepa silvestre, formados por la estirpe CAR1 de *Rhizobium trifolii*. Corte semifino de un nódulo, teñido con azul de toluidina, observado en el microscopio óptico con objetivo 10X (Panel A), 40X (Panel B) y 100X (Panel C).

A



B

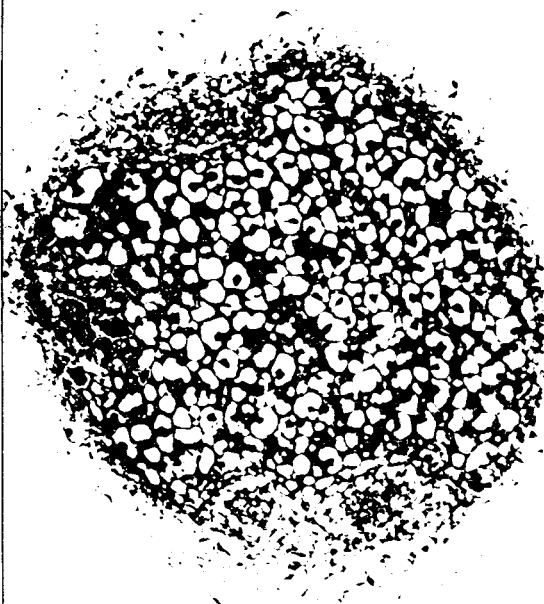


C

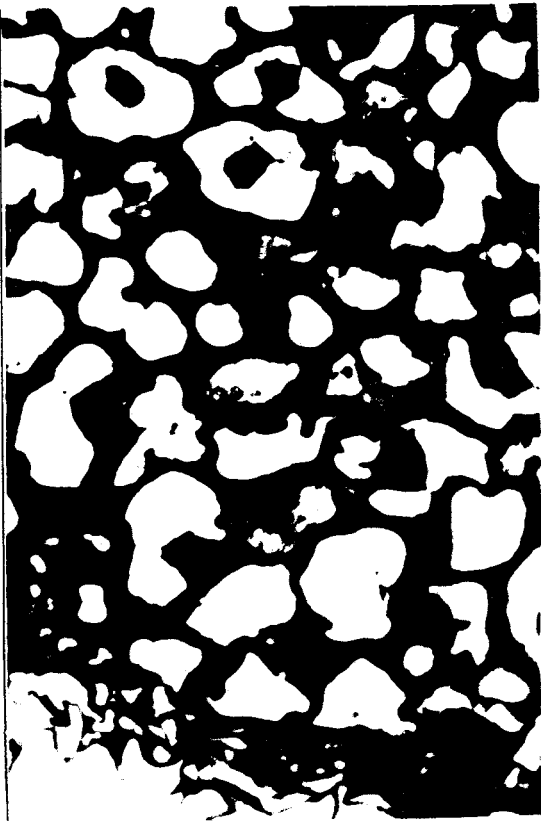


Figura 4.7. Microscopía de nódulos, diferentes a los inducidos por la cepa silvestre, formados por la estirpe CAR1 de *Rhizobium trifolii*. Corte semifino de un nódulo, teñido con azul de toluidina, observado en el microscopio óptico con objetivo 10X (Panel A), 40X (Panel B) y 100X (Panel C).

A



B



C



irregular y éstos ocupan en muchas de las células un reducido espacio citoplasmático. Las células invadidas presentan vacuolas centrales de gran tamaño o grupos de pequeñas vacuolas también en el centro de la célula. Los espacios intercelulares no contienen bacteroides y son de mayor tamaño que en la cepa silvestre (Figura 4.6).

Los nódulos más numerosos, pequeños y blancos inducidos también por la estirpe CAR1, son nódulos vacíos. Aunque, en ocasiones, se pueden detectar algunas bacterias en la región subepidérmica y 2 ó 3 células invadidas cercanas al córtex. Presentan estructura típica de nódulos con una región meristemática distal y una región proximal cuyas células presentan gránulos de almidón de gran tamaño, así mismo poseen haces vasculares periféricos. (Figura 4.7).

Producción de β -1,2 glucano por la estirpe CAR1 de *R. trifolii*.

Para este estudio se prepararon cultivos de las estirpes RS800 y CAR1 en medio GYM y se realizó la extracción del β -1,2 glucano periplásmico de la forma que se describe en el apartado de Materiales y Métodos.

No se encontraron diferencias significativas en la cantidad de oligosacárido producido por ambas cepas; se detectó en forma de un único pico muy cercano al volumen vacío de la columna.

Identificación del producto génico del locus *ndvB*.

Las dos regiones del genomio de *R. trifolii* RS800 que presentaban fuerte homología con los locus *ndvA* y *ndvB* de *R. meliloti* 102F34, se clonaron en el plásmido pUC19 utilizando puntos únicos de restricción del "polilinker" (pCC119 y pCC719, Capítulo 3).

De esta forma disponíamos de una serie de construcciones en las que las regiones *ndvA* y *ndvB* de *R. trifolii* RS800 se colocaban bajo el control del promotor *lac*. Dado que en principio no conocíamos la dirección de transcripción de los genes *ndv*, las dos regiones se insertaron en pUC19 en las dos posibles orientaciones.

Figura 4.8. Análisis de transcripción y traducción in vitro de loci *ndv*. Fluorograma obtenido tras electroforesis en gel SDS-poliacrilamida de los péptidos radiactivos sintetizados in vitro a partir de las siguientes moléculas de ADN: Línea 1 (pUC19), línea 2 (pCC119), línea 3 (pCC911), línea 4(pCC719), línea 5 (pCC917). Las puntas de flecha en el margen izquierdo indican los patrones utilizados cuyos tamaños moleculares son: 180, 116, 84, 58, 48, 36 y 26 KDa.

1 2 3 4 5



Utilizando L-(S³⁵)metionina y un sistema de transcripción y traducción in vitro que utiliza ARN polimerasa de *E. coli*, marcamos radiactivamente los péptidos obtenidos a partir de cada uno de los clones. En la Figura 4.8 se muestra el fluorograma obtenido en el que se puede observar una banda claramente visible en el clon pCC917 cuyo tamaño molecular podría ser de aproximadamente 70 KDa. No se observaron con claridad bandas reactivas en ningún otro plásmido, salvo una extremadamente débil en el carril correspondiente a pCC119 a la altura de aproximadamente 50 KDa que no puede apreciarse en la Figura 4.8, pero sí en el film original.

DISCUSION.

El presente estudio se dirigió a la obtención de mutantes de la estirpe *Rhizobium trifolii* RS800 en el locus *ndvB* descrito por Dylan *et al.* (1986). Este locus es necesario para la síntesis de β -1,2 glucano en *R. meliloti* (Ielpi *et al.*, 1990), al igual que el locus *chvB* en *A. tumefaciens* (Zorreguieta *et al.*, 1988).

Los mutantes en *ndvAB* forman nódulos vacíos y por tanto Fix⁻, y presentan además alteraciones en la movilidad, sensibilidad a fagos y a antibióticos. Los mutantes en *chvAB* son avirulentos y es interesante señalar que los transconjugantes de *Agrobacterium* portadores del *pSym* de *Rhizobium phaseoli*, sólo nodulan *Phaseolus* si *chvAB* son funcionales (van Veen *et al.*, 1987), lo que parece indicar una mayor dependencia en *Agrobacterium* de la función de *chvAB*.

Hoying *et al.* (1990) han estudiado el fenotipo simbiótico de una mutación en un locus de función desconocida localizado en un megaplásmido (Buikema *et al.*, 1983). La estirpe mutante Rm1045 está afectada en la biosíntesis de leucina y en varias etapas del desarrollo del nódulo. Aproximadamente dos tercios de los nódulos inducidos por Rm1045 carecen de bacterias y el resto presenta distintos grados de infección, aunque estas bacterias aparentemente no fijan nitrógeno. Los resultados del estudio indican que al menos parte del locus mutado en Rm1045 está duplicado, lo que puede

explicar que invada la tercera parte de los nódulos formados. Se ha demostrado que las mutaciones en una única copia de genes funcionalmente homólogos puede dar lugar a una reducción de la eficiencia simbiótica (Györgypal *et al.*, 1988; Morett *et al.*, 1988).

En la estirpe silvestre *R. trifolii* RS800 por hibridación con la sonda *ndvB* de *R. meliloti* se ha detectado la presencia de tres copias del locus *ndvB* (Coronado *et al.*, 1989). La presencia de reiteraciones de ADN en el genomio de esta estirpe no es un dato nuevo; Rodríguez-Quiñones *et al.* (1989) pusieron de manifiesto la existencia de dos copias del gen *nodD* y la reiteración de un locus de la cepa, que hibrida con una sonda *nodL* de *R. meliloti*, en una estirpe rifampicina resistente derivada de la estirpe silvestre RS800.

Esta repetición al menos parcial del locus *ndvB* en *R. trifolii* RS800 podría explicar el fenotipo simbiótico de la mutación en la estirpe CAR1 obtenida en este estudio. El 70% de los nódulos inducidos por CAR1 son nódulos vacíos y el resto presentan un grado de invasión variable, pero es posible detectar la capacidad de fijar nitrógeno mediante medidas de reducción de acetileno. Probablemente será necesario conseguir mutaciones en cada una de las copias *ndvB* en la estirpe silvestre para conseguir un fenotipo simbiótico claramente defectuoso. Se podrían emplear nuevas metodologías como es el caso de ARN antisentido para bloquear a un tiempo la función de todas las copias del gen (Simons y Kleckner, 1988).

Los datos derivados de la secuencia de *ndvB* en *R. meliloti* indican que este locus contiene un solo ORF que codifica una proteína de 319 KDa (Ielpi *et al.*, 1990). En cambio, el producto NdvB migra en geles SDS-poliacrilamida con una masa molecular aparente de 235 KDa, como lo hace el producto homólogo y funcionalmente equivalente del locus *chvB* de *A. tumefaciens* (Zorreguieta y Ugalde, 1986). Zorreguieta *et al.* (1988) han encontrado que el gen *chvB* codifica una proteína de mayor tamaño que la requerida para la síntesis de β -1,2 glucano. Las inserciones de Tn5 localizadas mas allá de la fracción necesaria para la síntesis del oligosacárido cíclico y la virulencia daban lugar a productos

proteicos truncados posiblemente por terminación traduccional; los mutantes en estos puntos eran virulentos y producían β -1,2 glucano.

Nuestros resultados obtenidos mediante transcripción y traducción in vitro con un sistema procariótico derivado de *E. coli* sugieren que el producto proteico del locus *ndvB* de *R. trifolii* RS800 estudiado tiene una masa molecular de aproximadamente 70 KDa. Este tamaño es considerablemente inferior al tamaño molecular de las proteínas NdvB en *R. meliloti* y ChvB en *A. tumefaciens*. Puede suceder que el locus *ndvB* clonado en pCC917 origine una proteína truncada o que la proteína NdvB sea de menor tamaño en *R. trifolii* RS800. Recientemente Iñon de Iannino y Ugalde (1990) han presentado una proteína de 90 KDa identificada como posible intermediario en la síntesis de β -1,3; β -1,6 glucano en *Bradyrhizobium japonicum*. Este oligosacárido se ha descrito en *B. japonicum* USDA110 en lugar de β -1,2 glucano, y de momento no se conoce su función en la invasión del nódulo (Miller *et al.*, 1990).

AGRADECIMIENTOS.

Quisiera agradecer a Luis Ielpi su colaboración en los experimentos de transcripción y traducción in vitro de proteínas, a Inmaculada Sánchez y Beatriz Sánchez la ayuda prestada para la realización de los estudios de microscopía, y a José Antonio Muñoz sus consejos sobre cromatografía en gel.

BIBLIOGRAFIA.

Bolivar, F., Rodríguez, R. L. Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L., Boyer, H. W., Crosa, J. y Falkow, S. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multi-purpose cloning system. *Gene* 2: 95-113.

Buikema, W. J., Long, S. R., Brown, S. E., van den Bos, R. C., Earl, C. y Ausubel, F. M. (1983). Physical and genetic characterization of *Rhizobium meliloti* symbiotic mutants. *J. Mol. Appl. Genet.* 2: 249-260.

Coronado, C., Megias, M., Ruíz-Berraquero, F. y Palomares, A. J. (1989). Interspecies homology of nodule development genes in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* 59: 289-296.

De Bruijn, F. J. y Lupski, J. R. (1984). The use of transposon Tn5 mutagenesis in the rapid generation of correlated physical and genetic maps of DNA segments cloned into multicopy plasmid - a review. *Gene* 27: 131-149.

Ditta, G. Tn5 mapping of *Rhizobium* nitrogen fixation genes. (1986). *Methods Enzymol.* 118: 519-528.

Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D. y Helinski, D. R. (1980). Broad host-range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 7347-7351.

Ditta, G., Schmidhauser, T., Yakobson, E., Lu, P., Liang, X. -W., Finlay, D. R., Guiney, D. y Helinski, D. R. (1985). Plasmids related to the broad-host-range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. *Plasmid* 13: 149-153.

Dylan, T., Ielpi, L., Stanfield, S., Kashyap, L., Douglas, C., Yanofsky, M., Nester, E., Helinski, D. R. and Ditta, G. (1986). *Rhizobium meliloti* genes required for nodule development are related to chromosomal virulence genes in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4403-4407.

Dylan, T., Helinski, D. R. y Ditta, G. S. (1990a). Hypoosmotic adaptation in *Rhizobium meliloti* requires β -(1->2)-glucan. J. Bacteriol. 172: 1400-1408.

Dylan, T., Nagpal, P., Helinski, D. R. y Ditta, G. S. (1990b). Symbiotic pseudorevertants of *Rhizobium meliloti ndv* mutants. J. Bacteriol. 172: 1409-1417.

Finan, T. M., Hirsch, A. M., Leigh, J. A., Johansen, E., Kuldau, G. A., Deegan, S., Walker, G. C. y Signer, E. R. (1985). Symbiotic mutants of *Rhizobium meliloti* that uncouple plant from bacterial differentiation. Cell 40: 869-877.

Geremia, R. A., Cavaignac, S., Zorreguieta, A., Toro, N., Olivares, J. y Ugalde, R. A. (1987). A *Rhizobium meliloti* mutant that forms ineffective pseudonodules in alfalfa produces exopolysaccharide but fails to form β (1,2) glucan. J. Bacteriol. 169: 880-884.

Györgypal, Z., Iyer, N. y Kondorosi, A. (1988). Three regulatory *nodD* alleles of diverged flavonoid-specificity are involved in host-dependent nodulation of *Rhizobium meliloti*. Mol. Gen. Genet. 212: 85-92.

Hirsch, P. R. y Beringer, J. E. (1984). A physical map of pPH1JI and pJB4JI. Plasmid 12: 139-141.

Hoying, J. B., Behm, S. M. y Lang-Unnasch, N. (1990). Cloning and characterization of *Rhizobium meliloti* loci required for symbiotic root nodule invasion. Mol. Plant-Microbe Interact. 3: 18-27.

Ielpi, L., Dylan, T., Ditta, G. S., Helinski, D. R. y Stanfield, S. W. (1990). The *ndvB* locus of *Rhizobium meliloti* encodes a 319 kDa protein involved in the production of β -(1->2)-glucan. J. Biol. Chem. 265: 2843-2851.

Iñon de Iannino, N. y Ugalde, R. A. (1990). Biosynthesis of cyclic β 1-3 glucan in *Bradyrhizobium japonicum*. 5th International Symposium on the Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. Interlaken, Suiza, 1990. p. 140.

Leigh, J. A., Signer, E. R. y Walker, G. C. (1985). Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6231-6235.

Leigh, J. A., Reed, J. W., Hanks, J. F., Hirsch, A. M. y Walker, C. G. (1987). *Rhizobium meliloti* mutants that fail to succinylate their calcofluor-binding exopolysaccharide are defective in nodule invasion. Cell 51: 579-587.

Megias, M., Caviedes, M. A., Andrés, M., Sousa, C., Ruíz-Berraquero, F. y Palomares, A. J. (1988). Localization of *his* genes on the *Rhizobium trifolii* RS800 linkage map. Mol. Gen. Genet. 211: 369-372.

Miller, K. J., Kennedy, E. P. y Reinhold, V. N. (1986). Osmotic adaptation by gram-negative bacteria: possible role for periplasmic oligosaccharides. Science 231: 48-51.

Miller, K. J., Gore, R. S., Johnson, R., Benesi, A. L. y Reinhold, V. N. (1990). Cell-associated oligosaccharides of *Bradyrhizobium* spp. J. Bacteriol. 172: 136-142.

Mokrasch, L. C. (1954). Analysis of hexose phosphate and sugar mixtures with the anthrone reagent. J. Biol. Chem. 208: 55-59.

Morett, E., Moreno, S. y Espin, G. (1988). Transcription analysis of three *nifH* genes of *Rhizobium phaseoli* with gene fusions. Mol. Gen. Genet. 213: 499-504.

Müller, P., Enenkel, B., Hilleman, A., Kapp, D., Keller, M., Quandt, J. y Pühler, A. (1988a). Genetic analysis of two DNA regions of the *Rhizobium meliloti* genome involved in the infection process of alfalfa nodules. En Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. Palacios, R. y Verma, D. P. S. (eds.). APS Press. St. Paul-Minnesota. pp. 26-32.

Müller, P., Hynes, M., Kapp, D., Niehaus, K. y Pühler, A. (1988b). Two classes of *Rhizobium meliloti* infection mutants differ in exopolysaccharide production and in coinoculation properties with nodulation mutants. Mol. Gen. Genet. 211: 17-26.

Quandt, J., Hillemann, A., Niehaus, K., Arnold, W. y Pühler, A. (1990). An osmotic pseudorevertant of a *Rhizobium meliloti ndvB* mutant invades alfalfa nodules and allows the formation of effective nodules following mixed inoculation with a *R. meliloti* nodulation mutant. 5th International Symposium on the Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. Interlaken, Suiza, 1990. p. 139.

Rodriguez-Quiñones, F., Fernandez-Burriel, M., Banfalvi, Z., Megias, M. y Kondorosi, A. (1989). Identification of a conserved, reiterated DNA region that influences the efficiency of nodulation in strain RS1051 of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Mol. Plant-Microbe Interact. 2: 75-83.

Ruvkun, G. B. y Ausubel, F. M. (1981). A general method for site-directed mutagenesis in prokaryotes. Nature 289: 75-78.

Simons, R. W. y Kleckner, N. (1988). Biological regulation by antisense RNA in prokaryotes. Annu. Rev. Genet. 22: 567-600.

Soto, M. J., López-Lara, M. I., Olivares, J. y Toro, N. (1990). Genetic characterization of GRT21s, a *Rhizobium meliloti* mutant which fails to form β -1,2 glucan. 5th International Symposium on the Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. Interlaken, Suiza, 1990. p. 141.

Stanfield, S. W., Ielpi, L., O'Brochta, D., Helinski, D. R. y Ditta, G. (1988). The *ndvA* gene product of *Rhizobium meliloti* is required for β -(1->2)-glucan production and has homology to the ATP-binding export protein HlyB. J. Bacteriol. 170: 3523-3530.

Toro, N. y Olivares, J. (1986). Analysis of *Rhizobium meliloti* sym mutants obtained by heat treatment. Appl. Environ. Microbiol. 51: 1148-1150.

van Veen, R. J. M., den Dulk-Ras, H., Schilperoort, R. A. y Hooykaas, P. J. J. (1987). Chromosomal nodulation genes: Symplasmid containing *Agrobacterium* strains need chromosomal virulence genes (*chvA* and *chvB*) for nodulation. Plant Mol. Biol. 8: 101-108.

Zorreguieta, A. y Ugalde, R. A. (1986). Formation in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. of a 235-kilodalton protein intermediate in β -D(1,2) glucan synthesis. *J. Bacteriol.* **167**: 947-951.

Zorreguieta, A., Geremia, R. A., Cavaignac, S., Cangelosi, G. A. y Nester, E. W. (1988). Identification of the product of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence gene. *Mol. Plant-Microbe Interactions.* **1**: 121-127.

CAPITULO 5.

Análisis de la región promotora del locus *ndvB*.

INTRODUCCION.

Dentro de los mecanismos desarrollados por los organismos vivos para regular la expresión de su información genética, es fundamental el nivel de síntesis de ARN. La síntesis de ARN, transcripción de la información genética, es controlada por una serie de señales específicas codificadas por el ADN. Se trata principalmente de promotores y terminadores que identifican el punto de inicio y final de la síntesis de ARN por la ARN polimerasa, determinando además la eficiencia con que funcionan estos sitios y los requerimientos para otros reguladores secundarios que modulan la expresión del gen o genes asociados.

Se han aislado y estudiado muchos promotores reconocidos por la ARN polimerasa de *Escherichia coli*. Se han determinado y comparado sus secuencias, y se han identificado las secuencias fundamentales para la función promotora. Sin embargo, existían algunos problemas para el estudio de estos reguladores transcripcionales como la dificultad de comparar la expresión de dos promotores asociados a dos genes distintos, monitorizar la actividad de algunos genes, o realizar estudios de expresión de genes necesarios para la viabilidad del organismo.

El desarrollo de las metodologías de ADN recombinante nos ha facilitado una serie de técnicas para el aislamiento y estudio de promotores en bacterias. Se han construido plásmidos vectores que permiten el aislamiento y la comparación de propiedades de los promotores transcripcionales. (Nierman, 1988). Aunque cada uno de estos vectores presenta características singulares, todos se basan en un principio común muy simple. La inserción de un fragmento de ADN que contiene un promotor, permite la activación de un gen codificado por el plásmido que es transcripcionalmente silencioso. Este gen silencioso se consigue deleccionando el propio promotor y situando delante un punto único para una enzima de restricción. Cuando se inserta en este punto y en la orientación correcta un fragmento de restricción que contiene un promotor, se inicia la transcripción y continúa a través del gen. El transcrito, que contiene

el punto de iniciación de la traducción y la secuencia codificante del gen silencioso, se traduce originando el producto funcional del gen.

Los vectores para clonar promotores no sólo nos facilitan el aislamiento y estudio del promotor, sino que además nos permiten realizar estudios comparativos situando delante del mismo gen distintos promotores o distintas versiones de un promotor, ya que el nivel de expresión en cada caso nos reflejaría la fuerza relativa de los promotores.

Algunos de los primeros vectores para clonar promotores ("promoter-probe vector") que se construyeron, derivaban de la fusión de pACYC177 y pACYC184 (Chang y Cohen, 1978), y en ellos se había eliminado el promotor del gen de resistencia a tetraciclina. Las células portadoras de estos plásmidos (pGA24, pGA39 y pGA46) eran sensibles a tetraciclina a menos que se insertase delante del gen un fragmento de ADN que contuviese un promotor. La utilidad de estos plásmidos se demostró en el estudio del promotor de la región *rpoB rpoC* del cromosoma de *E. coli* (An y Friesen, 1980).

Rodríguez y colaboradores desarrollaron vehículos para clonación de promotores a partir de pBR322 (Bolivar *et al.*, 1977) mediante la eliminación por digestión con exonucleasa del promotor del gen de resistencia a tetraciclina, así surgieron pPV33 y pPV33H (West y Rodríguez, 1982). Posteriormente se fueron mejorando por distintos procedimientos estos vectores derivados de pBR322: a.-) se utilizó como gen informador el de la cloranfenicol acetyl transferasa procedente de pBR328 cuya actividad se podía cuantificar, b.-) se colocaron terminadores de transcripción al final del gen informador para evitar que la clonación de un promotor fuerte alterara la estabilidad y la replicación del plásmido, así como al principio de la secuencia con lo que se impide que halla una lectura del gen desde alguna región promotora de pBR322, c.-) se utilizaron "polilinkers" para proporcionar los puntos únicos de restricción para distintas enzimas y d.-) se situaron terminadores traduccionales entre el "polilinker" y el codón de iniciación de la traducción del gen, con la finalidad de que la traducción no se inicie en algún punto de la secuencia clonada.

Además de los genes de resistencia a antibióticos se pueden utilizar otra serie de genes como gen informador. Casadaban *et al.* (1980) para construir una serie de vectores para clonación de promotores: pMC81, pMC306, pMC661, pMC489 etc. utilizaron el gen completo de la β -galactosidasa de *E. coli* (*lacZ*), o la secuencia codificante de la región amino terminal (*lacZ'* o *lacZ α*) que complementa la mutación *lacZ* Δ M15, (Casadaban y Cohen, 1980). Las células que presentan un fenotipo Lac⁺ se pueden detectar con facilidad en placas de lactosa-McConkey o en placas de X-gal; y la actividad β -galactosidasa se puede determinar cuantitativamente mediante un simple ensayo.

Rosenberg y colaboradores (McKeney *et al.*, 1981) usaron como gen informador el gen de la galactoquinasa de *E. coli* (*galK*). El vector pKO-1 y sus derivados llevan el gen *galK* desprovisto de promotor, y también el gen de la β lactamasa de pBR322 como un segundo marcador independiente. La actividad de la enzima es fácilmente detectable, y bajo condiciones apropiadas de hospedador y de medio la expresión del gen *galK* puede convertirse en esencial o letal para el crecimiento de la célula, lo que nos permite identificar fácilmente los plásmidos que contienen una secuencia promotora.

Otros genes estructurales empleados para construir vectores de clonación de promotores, han sido genes que codifican algunas enzimas de la ruta biosintética del triptófano (*trpA*) y el gen que codifica la dihidrofolato reductasa que confiere resistencia a trimetoprim (*folA*). Ambas actividades enzimáticas pueden cuantificarse, permitiendo así la comparación de la actividad de distintos promotores.

Mediante el uso de los vectores anteriormente citados se ha realizado el estudio acerca de la estructura y función de muchos promotores de *E. coli* y de bacteriófagos de *E. coli* (Rosenberg y Court, 1979; Rodriguez y Chamberlin, 1982). Sin embargo, se tenía poca información sobre la estructura y función de los promotores de otras bacterias Gram-negativas y no se habían realizado estudios de funcionamiento de un promotor de una bacteria Gram-negativa en otra. Para realizar estos estudios interespecíficos de función de

promotores, Bagdasarian *et al.* (1983) construyeron un vector de clonación de promotores de amplio rango de hospedador, pKT240, derivado de pHSG415 (Hashimoto-Gotoh *et al.*, 1981) y del plásmido RSF1010 perteneciente al grupo de incompatibilidad IncQ (Bagdasarian *et al.*, 1981; Bagdasarian y Timmis, 1982). El plásmido pKT240 posee un sitio único para *EcoRI* y *HpaI* delante del gen de la aminoglicósido fosfotransferasa (*aph*) que confiere a la célula hospedadora resistencia a la estreptomicina. Este plásmido se usó para demostrar que el promotor del gen *lacIQ* de *E. coli* y el promotor híbrido *trp-lac (tac)* (Amann *et al.*, 1983) eran activos en *Pseudomonas putida*.

Por inserción de la región *lacZY* del vector de *E. coli* pMC1403 (Casadaban *et al.*, 1980) en RSF1010 se han construido otra serie de vectores de amplio rango de hospedador para la búsqueda de promotores (Schmidhauser *et al.*, 1988).

Recientemente se han realizado estudios sobre un nuevo gen informador muy útil en monitorización de la expresión génica en gran variedad de bacterias Gram-negativas. Se trata del gen que codifica la luciferasa de la luciérnaga norteamericana *Photinus pyralis*. Esta enzima cataliza la descarboxilación oxidativa del sustrato luciferina, dando lugar a la producción de luz. La reacción es dependiente de ATP y su rendimiento energético (quantum 0.88) hace de ésta, la más eficaz de las reacciones bioluminiscentes descritas (McElroy y Seliger, 1962). La luciferasa de *Photinus pyralis* es un monómero de 62 KDa (Wood *et al.*, 1984; De Wet *et al.*, 1987) y el ensayo de su actividad enzimática es extremadamente sensible y rápido; se ha estimado que usando un luminómetro es posible detectar la actividad desarrollada por 2.4×10^5 moléculas de enzima (Subramani y DeLuca, 1988).

El gen que codifica la luciferasa (*luc*) fué aislado por De Wet *et al.* (1985) a partir de una genoteca de ADN complementario de linternas de *P. pyralis* y se ha expresado con éxito, usando promotores apropiados, en gran variedad de organismos incluyendo plantas y células de mamífero (Subramani y DeLuca, 1988). Palomares *et al.* (1989) insertaron el gen *luc* bajo el control del promotor λPR en el vector de amplio rango de hospedador

pRK293 (Ditta *et al.*, 1985); en este estudio la nueva construcción, pAP2, se estableció en *Rhizobium meliloti* y otras bacterias Gram-negativas demostrándose la utilidad potencial de la luciferasa como marcador altamente sensible tanto en células vegetativas como en bacteroides de *R. meliloti* y en otras bacterias Gram-negativas del suelo.

En este Capítulo mostramos el uso del plásmido vector para la clonación de promotores, pAL4000 (Alan Grinner), en la clonación de la región promotora del locus *ndvB* de *Rhizobium trifolii*. pAL4000 es un vector de amplio rango de hospedador derivado de RSF1010 y pBR322 que lleva como gen informador el gen *luc* de la luciferasa de luciérnaga desprovisto de promotor.

MATERIAL Y METODOS.

Bacterias y plásmidos.

Las bacterias y plásmidos utilizados en este trabajo se describen en la Tabla 5.1. El plásmido pAL4000, cuyo tamaño es de 12.94 Kb, es un vehículo para clonación de promotores, de amplio rango de hospedador que lleva como gen informador el gen que codifica la luciferasa de luciérnaga (*luc*).

En la Figura 5.1 se muestra un esquema del plásmido pAL4000 indicándose el origen de cada uno de los fragmentos de ADN que se utilizaron en su construcción. El vector pAL4000 es un derivado del plásmido de amplio rango de hospedador RSF1010, perteneciente al grupo de incompatibilidad Q (Barth, 1979; Bagdasarian y Timmis, 1982), en el que la resistencia a estreptomocina y sulfonamida se ha sustituido por el gen de resistencia a tetraciclina procedente de RK2 (Meyer *et al.*, 1977). Como gen informador tiene clonado el gen *luc* como un fragmento de 1.900 bp que lleva su propio codón de iniciación y está desprovisto de promotor, procedente del plásmido pKW102 (K. V. Wood, Tesis Doctoral). Situado delante de dicho gen, pAL4000 contiene el "polilinker" del plásmido pUC19 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) para la clonación de los fragmentos de ADN cuya actividad como promotor se desea estudiar. Delante del "polilinker" se ha colocado un terminador de transcripción de

TABLA 5.1. Bacterias y plásmidos.

A. Estirpes		Referencias
<i>Escherichia coli</i> HB101		G. Ditta
<i>Rhizobium trifolii</i> RS800		Megias <i>et al.</i> (1988)
<i>Rhizobium phaseoli</i> CIAT899		R. Palacios
<i>Rhizobium meliloti</i> 102F34		Ditta <i>et al.</i> (1980)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> M5a1		R. Dixon
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp245		J. Döbereiner
<i>Azotobacter vinelandii</i> UW		W. J. Brill

B. Plásmidos		
pRK2073	plásmido "helper"	Ditta <i>et al.</i> (1980)
pCC714	derivado de pBR322 que contiene el locus <i>ndvB</i> de <i>R. trifolii</i> RS800	Este trabajo
pAL4000	vector para clonación de promotores	Alan Grinner
pLUC19	derivado de pAL4000 que contiene la región promotora del locus <i>ndvB</i> de RS800	Este trabajo

Figura 5.1. Esquema del plásmido pAL4000. En el esquema se indica el origen de cada uno de los fragmentos de ADN que lo integran. T= terminador transcripcional. t= terminador traduccional. El sitio *Eco* RI del "polilinker" perteneciente a pUC19, que se encuentra situado delante del gen *luc*, se ha considerado como punto 0.00 del vector.

240 bp, y entre el "polilinker" y el gen *luc* un terminador traduccional de 12 bp.

Medios y condiciones de cultivo.

Las estirpes de *Escherichia coli*, *Azospirillum* y *Klebsiella* se cultivaron en medio LB (Kahn *et al.*, 1979) a 37°C; las estirpes de *Rhizobium* se cultivaron en medio TY (Beringer, 1974) a 30°C y *Azotobacter vinelandii* en medio C (0.8 mM MgSO₄ x 7H₂O, 1.7 mM NaCl, 0.25% extracto de levadura, 0.05% casaminoácidos y 1% manitol) a 37°C. Los medios se suplementaron con tetraciclina 10 µg/ml y ácido nalidíxico 10 µg/ml.

Enzimas y luciferina.

Las endonucleasas de restricción, la fosfatasa alcalina de intestino de ternera y la ADN T4 ligasa se adquirieron de Böehringer Mannheim y se utilizaron siguiendo las recomendaciones del fabricante. Así mismo Böehringer Mannheim nos suministró la luciferina purificada aislada de linternas de *Photinus pyralis*.

Defosforilación de fragmentos de ADN.

La defosforilación del vector pAL4000 se realizó tras digestión del ADN plasmídico con la enzima *Bam*HI y purificación mediante fenolización y precipitación con etanol. El precipitado se disolvió en 23 µl de Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; se añadieron 3 µl de tampón de fosfatasa alcalina 10X (0.5 M Tris-HCl, pH 9.0; 10 mM MgCl₂; 1 mM ZnCl₂; 10 mM espermidina) y 2 µl de enzima (1 unidad de enzima por µg de ADN). Se mantuvo la reacción 30 min a 37°C y se añadieron de nuevo 2 µl de enzima. Tras otros 30 min de incubación se mantuvo la reacción a 70°C durante 40 min para inactivar la enzima y se purificó el ADN por fenolización y precipitación con etanol.

Determinaciones de actividad luciferasa.

La determinación de la actividad luciferasa se realizó mediante la utilización de un luminómetro LKB equipado con un registrador para monitorizar la emisión de luz tanto en células intactas como extractos.

El sustrato luciferina se preparó de distinta forma según el tipo de ensayo, para células intactas la composición del reactivo fué:

luciferina 1mM, pH 6.8.700 μ l
DMSO.200 μ l
citrate sódico 1 M, pH 5.0.100 μ l

A 50 μ l de cultivo en fase exponencial de crecimiento se adicionaron 150 μ l de reactivo y se determinó la emisión de luz. Para los ensayos en extractos, la luciferina se preparó de la siguiente forma:

luciferina 1mM, pH 6.8.400 μ l
glicilglicina 250 mM, pH 7.4. . . .400 μ l
Cl₂Mg 1M.100 μ l
ATP 0.1 mM.100 μ l
Agua destilada csp.4 ml

Los extractos se prepararon por sonicación durante 30 segundos para todas las bacterias excepto para *A. vinelandii* que se trataron durante 2 min; las muestras se prepararon añadiendo 100 μ l de tampón de sonicación 10X (1 M K₂HPO₄, pH 8.0; 20 mM EDTA, 10 mg/ml BSA; 50% glicerol). A 50 μ l de extracto se añadieron 150 μ l de reactivo de luciferina para extracto y se determinó la emisión de luz en el luminómetro.

La expresión de actividad luciferasa in vivo se ensayó también impresionando por contacto una película Fujicolor NSP 160 ASA. Para ello se sembraron los cultivos sobre filtros de nitrocelulosa en placas de medio rico obteniéndose colonias aisladas, o bien estrias de crecimiento. Los filtros se impregnaron con la solución de luciferina empleada para células vivas y se colocaron en un acetato que se puso en contacto con la película. Se realizaron exposiciones de 20 min.

TABLA 5.2. Actividad luciferasa en unidades relativas de luz/D.O.600 de los plásmidos pAL4000 y pLUC19.

Estirpe	Extractos		Células intactas	
	pAL4000	pLUC19	pAL4000	pLUC19
<i>E. coli</i> HB101	4.930	55.555	685	2.770
<i>K. pneumoniae</i> M5a1	8.075	207.070	140	5.230
<i>R. trifolii</i> RS800	10.900	55.855	5.375	34.432
<i>R. phaseoli</i> CIAT899	1.960	45.600	230	2.720
<i>R. meliloti</i> 102F34	8.800	44.444	1.600	5.420
<i>A. brasilense</i> 245	135	290	60	102
<i>A. vinelandii</i> UW	530	680	69.7	69.8

Estos valores se determinaron en cultivos cuya D. O. a 600 nm estaba entre 0.5 y 0.7, y en extractos preparados por sonicación a partir de estos cultivos.

RESULTADOS.

Aislamiento de la región promotora del locus *ndvB* de *R. trifolii* RS800.

Para el aislamiento del promotor del gen *ndvB* de RS800 se realizó una digestión total con *Sau3A* del fragmento *EcoRV* de 8 Kb obtenido por electroelución a partir del plásmido pCC714 digerido con *EcoRV*. Los fragmentos de ADN obtenidos tras esta digestión se subclonaron en el plásmido pAL4000 en el sitio *BamHI* del "polilinker". El plásmido pAL4000 se digirió con *BamHI* y se trató con fosfatasa alcalina para evitar autoligaciones. Después de 12 h a 15°C en presencia de ADN T4 ligasa la mezcla de ligamiento se transformó en células competentes de HB101 y se determinó la emisión de luz en los clones transformantes.

Se obtuvieron 23 clones transformantes de entre los cuales cinco emitían aproximadamente once veces más luz que el clon correspondiente al plásmido pAL4000. Para el reaislamiento de los fragmentos clonados en estos cinco clones se realizaron extracciones de ADN plasmídico que se digirieron con las enzimas *PstI* y *KpnI* que se encuentran a ambos lados del punto *BamHI* del "polilinker" de pAL4000 donde se realizó la clonación. Mediante separación en gel de agarosa pudimos comprobar que los cinco clones contenían un fragmento idéntico de alrededor de 1.5 Kb. Esta construcción, pLUC19, se usó para realizar estudios de expresión en *R. trifolii* y otras bacterias fijadoras de nitrógeno.

Expresión del gen *luc* bajo el control del promotor *ndvB* en bacterias pertenecientes al género *Rhizobium*.

Los plásmidos pAL4000 y pLUC19 se transfirieron mediante conjugación triparental, usando pRK2073 como plásmido "helper", a *R. trifolii* RS800, *R. phaseoli* CIAT899 y *R. meliloti* 102F34. Se utilizaron resistentes espontáneos a ácido nalidíxico derivados de las estirpes silvestres. Los transconjugantes se seleccionaron en medio TY adicionado de tetraciclina y ácido nalidíxico.

Se realizaron medidas de emisión de luz tanto en células vivas como en extractos y se determinó la expresión de actividad luciferasa por exposición de película fotográfica (Figura 5.2). Los

Figura 5.2. Expresión del gen de la luciferasa de luciérnaga bajo el control de la región promotora *ndvB* de *Rhizobium trifolii*. Panel 1. A: Colonias de *E. coli* HB101 conteniendo el plásmido pLUC19. B: Detección fotográfica de la luz emitida por las colonias mostradas en el panel 1. A. Panel 2. A: Líneas de crecimiento de bacterias conteniendo el plásmido pLUC19, pertenecientes a las especies *Azospirillum brasilense*, *Escherichia coli*, *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium phaseoli*, *Rhizobium trifolii*, y *Klebsiella pneumoniae* (Desde arriba hacia abajo). B: Detección fotográfica de la luz emitida por las líneas de crecimiento mostradas en el panel 2. A. Panel 3. A: Líneas de crecimiento de bacterias conteniendo el plásmido pLUC19, pertenecientes a las especies *Azospirillum brasilense*, *Escherichia coli*, *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium phaseoli*, *Rhizobium trifolii*, y *Klebsiella pneumoniae* (Siguiendo el sentido de las agujas del reloj). B: Detección fotográfica de la luz emitida por las líneas de crecimiento mostradas en el panel 3. A.

TABLA 5.3. Actividad luciferasa, bajo el control del promotor *ndvB* de *Rhizobium trifolii* RS800.

Estirpe	Relación actividad luciferasa pLUC19/pAL4000	
	Células intactas	Extractos
<i>E. coli</i> HB101	4	11.2
<i>K. pneumoniae</i> M5a1	37.1	25.6
<i>R. trifolii</i> RS800	6	5.1
<i>R. phaseoli</i> CIAT899	11.8	23.1
<i>R. meliloti</i> 102F34	3.4	5.0
<i>A. brasilense</i> Sp245	1.7	2.1
<i>A. vinelandii</i> UW	1	1.3

Los datos que aparecen reflejados en esta Tabla se han obtenido dividiendo las unidades de luz emitida por los transconjugantes portadores del plásmido pLUC19, por las unidades de luz emitida por los transconjugantes portadores del plásmido pAL4000.

valores obtenidos en el luminómetro se expresan en unidades relativas de luz en la Tabla 5.2. Puede observarse que la cantidad de luz emitida por los extractos de las tres bacterias pertenecientes al género *Rhizobium* es muy similar. En cambio en células intactas la cantidad de luz emitida por *R. trifolii* RS800 es superior (Tabla 5.2). El plásmido pAL4000 mantiene en *Rhizobium* una actividad basal que es mucho más baja en *R. phaseoli* CIAT899, de ahí que el incremento de la actividad luciferasa que se detecta cuando la bacteria recibe la construcción portadora del promotor *ndvB* sea mucho mayor (Tabla 5.3).

Expresión del gen *luc* bajo el control del promotor *ndvB* en otras bacterias fijadoras de nitrógeno.

Los plásmidos pAL4000 y pLUC19 se establecieron en otras bacterias fijadoras de nitrógeno por conjugación triparental. Se utilizaron resistentes espontáneos a ácido nalidíxico derivados de las estirpes silvestres. Los transconjugantes de *Klebsiella pneumoniae* y *Azospirillum brasilense* se seleccionaron en medio LB con tetraciclina y ácido nalidíxico, y los transconjugantes de *Azotobacter vinelandii* en medio C suplementado con los mismos antibióticos.

Se realizaron en luminómetro medidas de actividad luciferasa a partir de extractos celulares preparados por sonicación y de células intactas (Tabla 5.2). El nivel de emisión de luz es considerablemente superior en *K. pneumoniae* que en el resto de las bacterias ensayadas. Como se observa en la Tabla 5.2, en los extractos de *K. pneumoniae* también las unidades de luz emitidas son superiores a las obtenidas en los extractos de bacterias pertenecientes al género *Rhizobium*, de *E. coli*, y de *Azospirillum* y *Azotobacter*. En estos dos últimos es donde la expresión es menor y donde además se aprecian sólo pequeñas diferencias en la expresión de las construcciones portadoras del gen con y sin promotor (Tabla 5.3). La impresión fotográfica obtenida por contacto con estas bacterias se muestra en la Figura 5.2.

DISCUSION.

La clonación de fragmentos de ADN que contienen secuencias con actividad promotora, facilita en gran medida la localización de promotores en mapas genéticos, así como la determinación de sus secuencias nucleotídicas. Los vectores para clonación de promotores ("promoter-probe vectors") permiten la búsqueda y selección de plásmidos recombinantes en los que se ha insertado una región promotora. Los primeros vectores de este tipo se describieron para *E. coli* (An y Friesen, 1979; Casadaban y Cohen, 1980; West y Rodriguez, 1982). El inconveniente más importante que presentaban estos vectores era el hecho de que las secuencias promotoras provenientes de otras especies bacterianas sólo podían ser reconocidas en estos vectores si los promotores eran funcionales en *E. coli*.

Por esta razón, las investigaciones se han dirigido a conseguir sistemas bifuncionales constituidos por un gen informador que se exprese y un vector que pueda mantenerse, tanto en *E. coli* como en otro microorganismo cuyos promotores se deseen analizar genéticamente. Un caso particular en el que el estudio de la regulación de la transcripción resulta muy interesante es *Streptomyces*. Estos microorganismos tienen un complejo ciclo de diferenciación morfológica y fisiológica, que conduce a la producción de metabolitos secundarios de gran interés industrial. Se han construido vectores para clonación de promotores en *Streptomyces* utilizando fundamentalmente como genes informadores: *luxAB* de *Vibrio harveyi* (Schauer *et al.*, 1988), *xylE* del plásmido TOL de *Pseudomonas* (Ingram *et al.*, 1989) y *lac* de *Streptomyces lividans* (Eckhardt *et al.*, 1987; Stein y Cohen, 1990).

En bacterias Gram-negativas, se han diseñado vehículos para clonación de promotores utilizando plásmidos de amplio rango de hospedador. Permiten el estudio de la función de un mismo promotor en distintas especies bacterianas. El primer vector de estas características que se construyó es el plásmido pKT240, derivado de RSF1010 que contiene el gen que codifica la

aminoglicósido fosfotransferasa (*aph*) carente de promotor (Bagdasarian *et al.*, 1983).

En este trabajo para el aislamiento de la región promotora *ndvB* de *R. trifolii* RS800 se ha utilizado el plásmido pAL4000 (Alan Grinner). Este plásmido, es también un plásmido derivado de RSF1010 y por tanto se trata de un vector de amplio rango de hospedador para bacterias Gram-negativas. Como gen informador el plásmido pAL4000 contiene el gen que codifica la luciferasa de luciérnaga, un gen cuyo uso en estudios de expresión génica se extiende desde procariotas hasta plantas y mamíferos. Como ventajas principales de este gen como gen informador cabe destacar su sensibilidad, la rapidez y bajo coste del ensayo, así como su uso sin destrucción del organismo en estudio. Palomares *et al.* (1989) han demostrado la funcionalidad de la luciferasa y la sensibilidad del ensayo en una amplia gama de bacterias Gram-negativas. Este trabajo se realizó utilizando el plásmido pAP2 en el que el gen *luc* se encuentra bajo el control del promotor derecho del fago lambda. Se observó que este promotor es funcional en todas las bacterias ensayadas siendo los niveles de actividad luciferasa expresados particularmente elevados en las bacterias pertenecientes al género *Rhizobium*.

Por clonación en pAL4000 de los fragmentos obtenidos por digestión con la endonucleasa *Sau3A* de la región *ndvB* de *R. trifolii* RS800, y posterior selección mediante medidas de actividad luciferasa de los distintos clones; se ha aislado una secuencia de ADN de aproximadamente 1.5 Kb que funciona como secuencia promotora. Esta secuencia contenida en el plásmido pLUC19 presenta una actividad promotora funcional tanto en *E. coli* como en *R. trifolii*, *R. meliloti*, *R. phaseoli* y otras bacterias fijadoras de nitrógeno en vida libre como *Klebsiella* y *Azospirillum*.

Los niveles relativos de actividad luciferasa, expresados como número de veces que se incrementa la actividad del gen *luc*, bajo el control del promotor *ndv*, en *Klebsiella* y *R. phaseoli* CIAT899, son superiores a los obtenidos en el resto de la especies estudiadas. En los transconjugantes portadores de pLUC19 de *R. trifolii*, *R. meliloti* y *E. coli* se detecta entre cinco y once veces la actividad medida en

los transconjugantes portadores de pAL4000. En el caso de *Azospirillum* la región promotora *ndv* multiplica por dos los valores basales de actividad luciferasa que presenta el plásmido sin promotor en esta especie. En cambio, en *Azotobacter*, no se detecta ningún incremento de la actividad luciferasa como consecuencia de la inserción de la región promotora *ndv* delante del gen *luc* (Tabla 5.3). Aunque estas diferencias en los niveles de actividad luciferasa pueden ser el reflejo de diferentes niveles de actividad del promotor *ndv* en los distintos hospedadores, la actividad luciferasa final se puede ver afectada por otros factores como el número de copias del plásmido, la estabilidad y funcionalidad del ARN mensajero y la estabilidad de la proteína luciferasa en cada microorganismo.

Otra ventaja que posee el sistema luciferasa es la posibilidad de realizar estimaciones cuantitativas en células intactas, debido a la capacidad de las bacterias para captar el sustrato luciferina y a la presencia de niveles intracelulares de ATP suficientes para la reacción. Aunque los resultados no sean estrictamente proporcionales, en cuanto a la funcionalidad de la región promotora clonada, se pueden deducir prácticamente los mismos resultados tanto de los datos obtenidos a partir de células intactas como de los datos obtenidos a partir de extractos (Tabla 5.3).

Considerando estos datos como punto de partida, parece interesante realizar una caracterización más profunda de la región promotora *ndvB* clonada en pLUC19. Sería conveniente conocer la secuencia nucleotídica de esta región así como realizar estudios de regulación de este promotor que es funcional en distintas especies bacterianas y que en principio puede parecer constitutivo.

AGRADECIMIENTOS.

Me gustaría hacer constar mi agradecimiento a Alan Grinner por haberme cedido el plásmido pAL4000 para la realización de este trabajo. Así mismo quiero dar las gracias a Miguel Angel Caviedes y Angel Cebolla por su colaboración en los estudios de expresión de actividad luciferasa y por haberme proporcionado las estirpes utilizadas.

BIBLIOGRAFIA.

Amann, E., Brosius, J. y Ptashne, M. (1983). Vectors bearing a hybrid *trp-lac* promoter useful for regulated expression of cloned genes in *E. coli*. *Gene* 25: 167-178.

An, G. y Friesen, J. D. (1979). Plasmid vehicles for direct cloning of *E. coli* promoters. *J. Bacteriol.* 140: 400-410.

An, G. y Friesen, J. D. (1980). Characterization of promoter-cloning plasmids: analysis of operon structure in the *rif* region of *Escherichia coli* and isolation of an enhanced internal promoter mutant. *J. Bacteriol.* 144: 904-916.

Bagdasarian, M., Lurz, R., Rückert, B., Franklin, F. C. H., Bagdasarian, M. M., Frey, J. y Timmis, K. N. (1981). Specific-purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene* 16: 237-247.

Bagdasarian, M. y Timmis, K. N. (1982). Host vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 96: 46-67.

Bagdasarian, M. M., Amann, E., Lurz, R., Rückert, B. y Bagdasarian M. (1983). Activity of the hybrid *trp-lac* (*tac*) promoter of *Escherichia coli* in *Pseudomonas putida*. Construction of broad-host-range, controlled-expression vectors. *Gene* 26: 273-282.

Barth P. T. (1979). En Plasmids of Medical, Environmental, and Commercial Importance. K. N. Timmis y A. Pühler (eds.). Elsevier. North Holand. Biomedical Press. pp. 399-410.

Beringer, J. E. (1974). R-factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 84: 188-198.

Bolivar, F., Rodriguez, R. L. Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L., Boyer, H. W., Crosa, J. y Falkow, S. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multi-purpose cloning system. *Gene* 2: 95-113.

Casadaban, M. J., Chou, J. y Cohen, S. N. (1980). In vitro gene fusion that join an enzymatically active β galactosidase segment to amino-terminal fragments of exogenous proteins: *Escherichia coli* plasmid vectors for the detection and cloning of translational initiation signals. *J. Bacteriol.* **143**: 971-980.

Casadaban, M. J. y Cohen, S. N. (1980). Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **138**: 179-207.

Chang, A. C. Y. y Cohen, S. N. (1978). Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* **134**: 1141-1156.

De Wet, J. R., Wood, K. V., Helinski, D. R. y DeLuca, M. (1985). Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 7870-7873.

De Wet, J. R., Wood, K. V., DeLuca, M., Helinski, D. R. y Subramani, S. (1987). Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* **7**: 725-737.

Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D. y Helinski, D. R. (1980). Broad host-range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 7347-7351.

Ditta, G., Schmidhauser, T., Yakobson, E., Lu, P., Liang, X. -W., Finlay, D. R., Guiney, D. y Helinski, D. R. (1985). Plasmids related to the broad-host-range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. *Plasmid* **13**: 149-153.

Eckhardt, T., Strickler, J., Gorniak, L., Burnett, N. V. y Fare, L. R. (1987). Characterization of the promoter, signal peptide and amino terminus of a secreted β -galactosidase from *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* **169**: 4249-4256.

Hashimoto-Gotoh, T., Franklin, F. C. H., Nordheim, A. y Timmis, K. N. (1981). Specific-purpose plasmid cloning vectors. I. Low copy number, temperature-sensitive, mobilization-defective pSC101-derived containment vectors. *Gene* 16: 227-235.

Ingram, C., Brawner, M., Youngman, P. y Whestpheling, J. (1989). *xylE* functions as an efficient reporter gene in *Streptomyces* spp.: use for the study of gal P1, a metabolite-controlled promoter. *J. Bacteriol.* 171: 6617-6624.

Kahn, M., Kolter, R., Thomas, C., Figursky, D., Meyer, R., Remaut, D. y Helinski, D. R. (1979). Plasmid cloning vehicles derived from plasmid Col E1, F, R6K, RK2. *Methods Enzymol.* 68: 268-280.

McElroy, W. D. y Seliger, H. H. (1962). Biological luminiscence. *Sci. Am.* 207: 76-89.

McKenney, K., Shimatake, H., Court, D., Schmeissner, U., Brady, C. y Rosenberg, M. (1981). En *Gene Amplification and Analysis: Structural Analysis of Nucleic Acids*. J. G. Chirikjian y T. S. Papas (eds.). Vol. 2, pp. 383-415.

Megias, M., Caviedes, M. A., Andrés, M., Sousa, C., Ruíz-Berraquero, F. y Palomares, A. J. (1988). Localization of *his* genes on the *Rhizobium trifolii* RS800 linkage map. *Mol. Gen. Genet.* 211: 369-372.

Meyer, R., Figurski, D. y Helinski, D. R. (1977). Physical and genetic studies with restriction endonucleases on the broad host range plasmid RK2. *Mol. Gen. Genet.* 152: 129-135.

Nierman, W. C. (1988). Vectors for cloning promoters and terminators. En *Vectors. A survey of molecular cloning vectors and their uses*. Rodriguez, R. L. y Denhardt, D. T. (eds.). Butterworth Publishers. Boston. pp. 153-177.

Palomares, A. J., DeLuca, M. A. y Helinski, D. R. (1989). Firefly luciferase as a reporter enzyme for measuring gene expression in vegetative and symbiotic *Rhizobium meliloti* and other Gram-negative bacteria. *Gene* 81: 55-64.

Rodríguez, R. L. y Chamberlin, M. J. (eds.). (1982). Promoters: Structure and function. Praeger. New York.

Rosenberg, M. y Court, D. (1979). Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Ann. Rev. Genet.* 13: 319-353.

Schauer, A., Ranes, M., Santamaría, R., Guijarro, J., Lawlor, E., Méndez, C., Chater, K. y Losick, R. (1988). Visualizing gene expression in time and space in the filamentous bacteria *Streptomyces coelicolor*. *Science* 240: 768-772.

Schmidhauser, T. J., Ditta, G. y Helinski, D. R. (1988). Broad-host-range plasmid cloning vectors for Gram-negative bacteria. En *Vectors. A survey of molecular cloning vectors and their uses*. Rodríguez, R. L. y Denhardt, D. T. (eds.). Butterworth Publishers. Boston. pp. 287-332.

Stein, D. S. y Cohen, S. N. (1990). Mutational and functional analysis of the *korA* and *korB* gene products of *Streptomyces* plasmid pIJ101. *Mol. Gen. Genet.* 222: 337-344.

Subramani, S. y DeLuca, M. (1988). Applications of the firefly luciferase as a reporter gene. En *Genetic Engineering: Principles and Methods*. Setlow, J. K. (ed.). Plenum Press. New York. Vol. 10, pp. 75-89.

West, R. y Rodríguez, R. L. (1982). Construction and characterization of *E. coli* promoter-probe plasmid vectors, III. pBR322 derivatives with deletions in the tetracycline resistance promoter regions. *Gene* 20: 291-304.

Wood, K. V., de Wet, J. R., Dewji, N. y DeLuca, M. (1984). Synthesis of active firefly luciferase by in vitro translation of RNA obtained from adults lanterns. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 124: 592-596.

Wood, K. V. (1989). Luciferases of luminous beetles: Evolution, color variation, and applications. Universidad de California, San Diego. Tesis Doctoral.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. y Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 33: 103-119.

CAPITULO 6.

Discusión General.

PERSPECTIVA GENERAL DE NUESTRO CONOCIMIENTO SOBRE EL DESARROLLO DEL NODULO.

Las bacterias pertenecientes al género *Rhizobium* cooperan con las plantas leguminosas para fijar nitrógeno atmosférico. La fijación de nitrógeno se realiza en los nódulos que son órganos específicamente desarrollados por la planta para este proceso. Las células vegetales del nódulo contienen unos orgánulos celulares únicos, los bacteroides, que son rizobios especializados que adquieren la capacidad de reducir dinitrógeno a amonio. La diferenciación y el funcionamiento de los nódulos requieren la expresión altamente coordinada de genes específicos tanto bacterianos como de la planta, así como una comunicación entre los dos componentes de esta asociación mutualista.

El proceso de comunicación planta-microorganismo parece consistir en un intercambio de señales durante la formación del nódulo. Descubrimientos recientes han aportado información a este complicado proceso (Lerouge *et al.*, 1990). Se ha demostrado que *Rhizobium meliloti* sintetiza una molécula, Nod Rm-1 que podría ser la señal que pone en marcha el mecanismo de la planta que desencadena la nodulación. La estructura de Nod Rm-1 es un β -1,4 tetrasacárido de D-glucosamina en el cual tres grupos amino están acetilados y otro acilado con un ácido graso bis-insaturado de dieciséis átomos de carbono. Además, la molécula posee en su extremo reductor un grupo sulfato en el carbono seis. La producción de esta señal extracelular, específica para alfalfa, depende de los genes bacterianos que determinan su síntesis y posterior modificación (*nodDABC*, *nodH*, *nodPQ*, *nodFE* y *nodL*). Para la expresión de estos genes, se requiere la inducción por flavonoides, luteolina en este caso, exudados por la planta (Roche *et al.*, 1990).

Dado el papel que se ha asignado a las lectinas, proteínas vegetales que unen carbohidratos, en el reconocimiento específico durante la simbiosis (Díaz *et al.*, 1989). El hecho de que Nod Rm-1 sea un oligosacárido modificado es muy interesante, ya que posee las características estructurales de los ligandos de las lectinas.

Los genes *nod* parecen estar implicados también en una segunda señal de comunicación; la que da lugar a la división meristemática de la raíz y que culmina con la formación del nódulo (Kondorosi y Kondorosi, 1986). Govers *et al.* (1986) han publicado que en este paso se induce la síntesis de una nodulina temprana, proteína específica del tejido del nódulo; y concluyen que parecen ser necesarias al menos dos señales de *Rhizobium* para la expresión de genes simbióticos específicos de plantas. Sin embargo no se conoce nada hasta el momento sobre esta segunda señal. Los genes *nod* parecen intervenir además en la especificidad de hospedador de *Rhizobium* aunque no son los únicos loci bacterianos que median en el proceso de iniciación del nódulo.

El estado intermedio del desarrollo del nódulo, invasión del nódulo, es el menos conocido actualmente. Los estudios microscópicos han dado una idea general de las distintas etapas implicadas: invaginación local de la pared del pelo radical en la iniciación del cordón de infección, invasión y multiplicación de los rizobios en la matriz de estos cordones, crecimiento del cordón de infección en las células internas del córtex donde se ramifica, y liberación de las bacterias en células vegetales individualizadas (Callaham y Torrey, 1981; Newcomb, 1981; Turgeon y Bauer, 1985; Dudley *et al.*, 1987).

Se sabe que varias clases de mutantes de *Rhizobium* están afectados en el estado intermedio del desarrollo del nódulo: los mutantes *exo* que han perdido o tienen alterado su exopolisacárido ácido (EPS) (Finan *et al.*, 1985; Kim *et al.*, 1989); los mutantes de lipopolisacárido (LPS) identificados en *Rhizobium phaseoli* (Noel *et al.*, 1986; Carlson *et al.*, 1987a), en *Rhizobium leguminosarum* (De Maagd *et al.*, 1989; Priefer, 1989) y en *R. meliloti* (Clover *et al.*, 1989; Putnoky *et al.*, 1990); y los mutantes *ndv* descritos en *R. meliloti* (Dylan *et al.*, 1986; Stanfield *et al.*, 1988) y que nosotros discutimos para *Rhizobium trifolii* en el presente estudio.

Estos tres grupos de mutantes tienen alterados los polisacáridos localizados en la superficie celular de los rizobios. Además todos estos mutantes inducen la formación de estructuras parecidas a nódulos con muy poca o ninguna invasión. La observación de que la

estimulación de la división celular tiene lugar en capas internas del córtex sin producirse invasión del tejido parece representar una "acción a distancia" y se ha tomado como evidencia del papel de determinadas señales en el desarrollo del nódulo. Los pseudonódulos inducidos por los mutantes *exo* y *ndv*, junto a la ausencia de bacteroides, carecen de la mayoría de la nodulinas. La abundancia de las nodulinas denominadas N-30 y N-74 en pseudonódulos, indica posiblemente una función estructural de estas nodulinas en el desarrollo del nódulo (Dickstein *et al.*, 1988).

El exopolisacárido ácido (EPS) producido por distintas especies de *Rhizobium* presenta la particularidad de unir calcoflúor, un colorante fluorescente típico de uniones β . El exopolisacárido ácido o succinoglucano secretado por *Rhizobium meliloti* es un polímero cuya subunidad octosacarídica está constituida por siete unidades de glucosa y una de galactosa, y presenta sustituciones con grupos piruvato, succinilo y acetilo (Aman *et al.*, 1981). Los genes implicados en la síntesis del EPS están implicados en el proceso de infección (Leigh *et al.*, 1985; Leigh *et al.*, 1987) y algunos autores piensan que también intervienen en la especificidad de hospedador (Philip-Hollingsworth *et al.*, 1989).

Los mutantes *eps* de *R. meliloti* afectados en la producción de un EPS normal, forman en alfalfa nódulos inefectivos en la fijación de nitrógeno. Estos nódulos son nódulos vacíos carentes de bacteroides intracelulares. Finan *et al.* (1985) observaron que un mutante *exoB* no inducía la formación de cordones de infección, mientras que Leigh *et al.* (1985) demostraron que un mutante *exoH* originaba cordones de infección abortados. La estirpe silvestre de *R. meliloti* secreta el EPS en dos formas, una de alto peso molecular y otra de bajo peso molecular (Zevenhuizen y van Neerven, 1983; Leigh y Lee, 1988). Los mutantes *exoA*, *exoB*, *exoC* y *exoF* no secretan succinoglucano, mientras que los mutantes *exoH* secretan el exopolisacárido de alto peso molecular carente de succínico, y solo trazas del componente de bajo peso molecular (Leigh *et al.*, 1987; Leigh y Lee, 1988). La composición del exopolisacárido secretado por los mutantes *exoD* depende del medio de cultivo empleado (Leigh y Lee, 1988). Los genes implicados en la biosíntesis del EPS tienen una localización irregular en el genomio de *Rhizobium*, así los

genes *exoA*, *exoB*, *exoF* y *exoH* se encuentran en el segundo megaplásmido simbiótico mientras que *exoC* y *exoD* son cromosómicos (Finan *et al.*, 1986; De Vos *et al.*, 1986).

El estudio de la relación existente entre las deficiencias en la biosíntesis del exopolisacárido en otras especies de *Rhizobium* y su posible defecto simbiótico, ha complicado de momento algo más el entendimiento del papel que desempeña el EPS en la simbiosis. Si bien los mutantes *exo* de *Rhizobium* sp. NGR234 (Chen *et al.*, 1985) y *Rhizobium leguminosarum* (Borthakur *et al.*, 1986) inducen nódulos no fijadores de nitrógeno como en el caso de *R. meliloti*, los mutantes *exo* de *Rhizobium phaseoli* (Borthakur *et al.*, 1986; Diebold y Noel, 1989) y *Rhizobium fredii* (Kim *et al.*, 1989) no se ven afectados en el establecimiento de una simbiosis efectiva.

La función simbiótica de los lipopolisacáridos de *Rhizobium* no está totalmente resuelta, sobre todo porque se presentan resultados contradictorios. No cabe duda de que los componentes superficiales, entre los que se encuentran los LPS, deben desempeñar un papel importante en la interacción específica con la planta. Algunos estudios han implicado a los LPS como ligandos específicos de las bacterias al pelo radical de hospedadores compatibles mediados por su unión a las lectinas (Halverson y Stacey, 1986). Mientras que trabajos muy recientes (Díaz *et al.*, 1989) confirman la función esencial de las lectinas en la especificidad de la planta hospedadora; el papel de los lipopolisacáridos en la especificidad de nodulación no está todavía claro y mucho menos tras conocerse que la cantidad y composición del lipopolisacárido puede ser diferente entre los bacteroides y las formas vegetativas de vida libre (Van Brussel *et al.*, 1977; Stacey *et al.*, 1982; Tremblay y Miller, 1984).

El lipopolisacárido de *Rhizobium*, lo mismo que sucede con el de las enterobacterias, posee un antígeno O y un núcleo polisacárido unido a través del ácido 2-ceto, 3-desoxioctulónico (KDO) al lípido A (Carlson *et al.*, 1978). Al igual que en enterobacterias, la mayor variabilidad del LPS de *Rhizobium* reside en la porción polisacáridica que puede variar enormemente entre especies y razas de la misma especie (Zajac y Lorkiewicz, 1983). Así mismo se han descrito diferencias cualitativas y cuantitativas en el

lipopolisacárido de razas nodulantes y no nodulantes de *R. trifolii* (Russa *et al.*, 1981; Russa *et al.*, 1982; Carlson *et al.*, 1987b) y *Rhizobium fredii* (Carlson y Yadav, 1985). No obstante estas alteraciones se produjeron como consecuencia de la eliminación del plásmido simbiótico, lo cual no implica necesariamente al LPS en la capacidad de nodular. Trabajos recientes ya han correlacionado mutaciones simples con cambios en la síntesis del LPS en *R. phaseoli* (Noel *et al.*, 1986; Cava *et al.*, 1989) y *R. leguminosarum* (De Maagd *et al.*, 1989; Priefer, 1989).

La correlación entre mutaciones en los genes *lps* de las distintas especies del género *Rhizobium* y su expresión fenotípica ha complicado aún más el entendimiento de la función que los mismos desempeñan en la simbiosis. Así mientras que los mutantes *lps* de *R. leguminosarum* y *R. trifolii* están afectados en la capacidad simbiótica (Russa *et al.*, 1981; Noel *et al.*, 1986; Cava *et al.*, 1989; De Maagd *et al.*, 1989; Priefer, 1989), los mutantes en lipopolisacárido de *R. meliloti* no son defectuosos en simbiosis (Clover *et al.*, 1989).

Los fenotipos que se han relacionado con mutaciones en el lipopolisacárido incluyen: cambios en la composición del LPS, superficie rugosa de las colonias, alteraciones en la sensibilidad a fagos, capacidad de autoaglutinar en medio líquido de los mutantes, pérdida de movilidad y deficiencias en la capacidad para fijar nitrógeno. La capacidad de autoaglutinar en medio líquido se ha descrito tanto para *R. meliloti* (Putnoky *et al.*, 1990) como para *R. leguminosarum* (Priefer, 1989). En *Azospirillum brasilense* y *Azospirillum lipoferum* también se ha descrito un fenotipo parecido que se ha denominado floculación, en el que parecen ser las condiciones del cultivo las que condicionan la agregación bacteriana (Sadasivan y Neyra, 1985).

Las deficiencias simbióticas que se han descrito en los mutantes *lps* se caracterizan por nódulos pequeños, blanquecinos y sin actividad nitrogenasa. Los estudios microscópicos realizados con *Vicia hirsuta* han demostrado que el defecto se produce en una etapa relativamente tardía del desarrollo simbiótico (Priefer, 1989). Los nódulos contienen cordones de infección de los que se liberan las bacterias que se encierran en membranas peribacteroidales. No

obstante los nódulos permanecen pequeños y su senescencia ocurre de manera prematura. Este mismo fenotipo se ha descrito para otra estirpe de *R. leguminosarum* (De Maagd *et al.*, 1989) y para *R. phaseoli* (Noel *et al.*, 1986) aunque en este último caso no se producía liberación de las bacterias.

Recientemente Putnoky *et al.* (1990) han demostrado que una región cromosómica (fix-23) de *R. meliloti* 41 implicada en la síntesis de LPS provee también una función alternativa para los genes *exo* en el proceso del desarrollo del nódulo. La ultraestructura de los nódulos inducidos por mutantes en la región fix-23 sugiere que las propiedades superficiales de los distintos mutantes no son exactamente las mismas, de acuerdo con la distinta capacidad de adsorber fagos. Así hay mutantes que producen nódulos vacíos y otros que permiten la invasión de algunas células del hospedador aunque la simbiosis cesa en el último estadio. La incapacidad para fijar nitrógeno por parte de las bacterias que han invadido sugiere que los genes *lps* pueden estar implicados en al menos dos estadios del desarrollo simbiótico del nódulo (Putnoky *et al.*, 1988).

La tercera clase de mutantes afectados en la etapa intermedia del desarrollo del nódulo son los mutantes *ndv*, descritos para *R. meliloti* por el grupo de Helinski (Dylan *et al.*, 1986; Stanfield *et al.*, 1988; Ielpi *et al.*, 1990) y los que presentamos en este estudio para *R. trifolii*.

En *R. meliloti* se han descrito dos loci *ndv*. El locus *ndvA* según los datos de secuencia posee un único ORF que codifica una proteína de 67 KDa. Esta proteína presenta elevada homología con una serie de proteínas transportadoras que unen ATP; y por los datos obtenidos con los mutantes correspondientes, su función es exportar el oligosacárido β -1,2 glucano al exterior de la célula (Stanfield *et al.*, 1988). El locus *ndvB* codifica una proteína de 319 KDa que está directamente implicada en la síntesis del β -1,2 glucano (Ielpi *et al.*, 1990).

En el Capítulo 2 describimos el hecho general de la presencia de los genes *ndv* en los géneros de la familia Rhizobiaceae estudiados. Aunque Dylan *et al.* (1986) habían demostrado la presencia de regiones homólogas a *chv* en distintas especies de *Rhizobium*,

nosotros hemos demostrado, usando en este caso sondas *ndv*, que estos genes están presentes en todas las especies del género *Rhizobium* y en el género *Bradyrhizobium*, y que además son de localización cromosómica (Coronado *et al.*, 1989). Hasta el momento, la mayoría de los genes implicados de alguna manera en el desarrollo e invasión del nódulo eran de localización plasmídica (*nod*, *exo*). Los genes *ndv* junto con otros loci recientemente descritos (*lps* y algunos loci *exo*) demuestran que el proceso de la nodulación requiere la intervención de todo el genomio bacteriano (Long, S. R., 1989a; 1989b; Martinez *et al.*, 1990).

Por otro lado y en este mismo Capítulo se demuestra que aunque en *R. trifolii* se describe una única copia del gen *ndvA*, el locus *ndvB* está repetido. Las tres reiteraciones de *ndvB*, puestas de manifiesto por digestión con distintas endonucleasas de restricción, van a condicionar el trabajo sucesivo. En el género *Rhizobium*, quizás porque sea uno de los mejor estudiados, se describe con frecuencia la presencia de zonas reiteradas, zonas localizadas en la mayoría de los casos en el plásmido simbiótico (Martinez *et al.*, 1985; Quinto *et al.*, 1985; David *et al.*, 1987; Honma y Ausubel, 1987; Renalier *et al.*, 1987; Mulligan y Long, 1989). *ndvB* no es el único gen reiterado descrito en *R. trifolii* RS800, ya que también se ha demostrado que el gen *nodD* presenta más de una copia en esta misma estirpe de *Rhizobium* (Rodríguez-Quñones *et al.*, 1989).

La caracterización fenotípica de los mutantes *ndvA* y *ndvB* de *R. meliloti* ha puesto de manifiesto que en su interacción con la alfalfa dan lugar a la formación de numerosos nódulos pequeños, blancos y que no fijan nitrógeno (Dylan *et al.*, 1986). Estos nódulos son parecidos a los producidos por los mutantes de *R. meliloti* defectuosos en la síntesis de exopolisacárido ácido (Finan *et al.*, 1985; Leigh *et al.*, 1985; Leigh *et al.*, 1987). Sin embargo, a diferencia de los mutantes *exo*, los mutantes *ndv* producen iniciaciones del cordón de infección en los pelos radicales, aunque en pequeño número. En los pseudonódulos maduros no se desarrollan estos cordones de infección, ni tampoco se observan bacterias (Dylan *et al.*, 1990b). El fenotipo simbiótico que presentan los mutantes *ndv* de *R. meliloti* y la selección positiva que ejerce la planta sobre una población mixta de rizobios, nos han permitido

aislar dos loci de *R. trifolii* que son homólogos estructural y funcionalmente a *ndvA* y *ndvB* de *R. meliloti* (Capítulo 3). El cósmido pCC11 es portador de la región homóloga a *ndvA* y el cósmido pCC71 lleva la región homóloga correspondiente a *ndvB*. Además de la complementación funcional en planta, la hibridación de estos cósmidos con sondas *ndv* de *R. meliloti* marcadas radiactivamente, ha demostrado la existencia de homología estructural de estos genes entre las especies *R. meliloti* y *R. trifolii*. De forma indirecta y por medio de este estudio se sabe también que los genes *ndv* no intervienen en la especificidad de hospedador, ya que los loci *ndvA* y *ndvB* de *R. trifolii* han complementado a los mutantes *ndvA* y *ndvB* de *R. meliloti*. La caracterización posterior ha permitido localizar el locus *ndvA* de *R. trifolii* en un fragmento *EcoRI* de 7 Kb y el locus *ndvB* en un fragmento *EcoRV* de 8 Kb. Así mismo la elaboración del mapa físico de restricción de ambos loci nos ha permitido abordar estudios posteriores con los mismos.

Como se indica en el Capítulo de Introducción General, clásicamente en la familia Rhizobiaceae se han incluido las agrobacterias y los rizobios. Las bacterias pertenecientes al género *Agrobacterium* son patógenos de plantas dicotiledóneas donde producen tumores o agallas. Las bacterias pertenecientes al género *Rhizobium* son beneficiosas desde un punto de vista agrícola por formar nódulos fijadores de nitrógeno en las raíces de las leguminosas. En el Capítulo 3 se muestran datos, por otro lado coincidentes con los publicados por Dylan *et al.* (1986), de los que se deduce que un grupo de genes necesarios para la simbiosis en el género *Rhizobium* muestran una relación funcional y estructural con genes de *Agrobacterium* requeridos para la patogenicidad.

La mayoría de los genes necesarios para la virulencia (*vir*) de *Agrobacterium tumefaciens* se encuentran localizados en un plásmido denominado Ti (Klee *et al.*, 1983). Las mutaciones en estos genes *vir* impiden la transformación oncogénica, posiblemente por impedir la transferencia a la planta de la región T-DNA que codifica enzimas implicados en la producción de fitohormonas (Akiyoshi *et al.*, 1984; Inze *et al.*, 1984; Schroeder *et al.*, 1984). Además de los genes *vir* codificados por el plásmido Ti se han encontrado otros dos loci intimamente ligados a la virulencia (Douglas *et al.*, 1985). Los

loci *chvA* y *chvB* manifiestan un interesante comportamiento ya que las mutaciones en cualquiera de ellos interfieren con la capacidad de *Agrobacterium* para unirse a las células de la planta.

La complementación de mutantes *chvB* de *Agrobacterium* por el cósmido pCC71 es indicativa de que en esta copia de *ndvB* de *R. trifolii* va toda la información necesaria para la síntesis de β -1,2 glucano que parece ser un componente fundamental en el proceso de adhesión de las agrobacterias a las células vegetales (Puvanesarajah *et al.*, 1985; Cangelosi *et al.*, 1989). Así mismo se demuestra también la funcionalidad de esta copia *ndvB* del genomio de *R. trifolii* RS800 en *A. tumefaciens*.

Desde que se caracterizaron los loci *chvAB* en *A. tumefaciens* y *ndvAB* en *R. meliloti*, parecía estar clara la correlación entre las mutaciones en los mismos y la incapacidad para producir β -1,2 glucano cíclico. La biosíntesis de este oligosacárido por *A. tumefaciens* se realiza a través de una proteína de membrana de 235 KDa (Zorreguieta *et al.*, 1985; Zorreguieta y Ugalde, 1986). El operón que codifica esta proteína posee un tamaño aproximado de 8.5 Kb, cinco de las cuales están fenotípicamente definidas y las mutaciones en ellas determinan la ausencia de síntesis de β -1,2 glucano. Sin embargo, las mutaciones que mapean en las restantes 3.5 Kb dan lugar a proteínas truncadas que sintetizan un β -1,2 glucano activo. Resulta sorprendente que polipeptidos truncados con aparentemente menos de las dos terceras partes del tamaño del péptido silvestre sean funcionales en la síntesis de β -1,2 glucano y en la virulencia (Zorreguieta *et al.*, 1988).

En *R. meliloti* el gen *ndvB* codifica la síntesis de una proteína de 319 KDa que está también implicada en la producción de β -1,2 glucano. De forma similar a lo descrito para *A. tumefaciens*, se ha demostrado que es necesario para la simbiosis un fragmento de 5.3 Kb y que no se requieren para una simbiosis efectiva 3.3 Kb situadas a continuación de las anteriores, aunque las mutaciones en esta región se traducen en algunas diferencias con respecto al fenotipo silvestre (Ielpi *et al.*, 1990).

En el Capítulo 4 se muestra el análisis de traducción *in vitro* del fragmento de 8 Kb identificado como el locus *ndvB* de *R. trifolii*

RS800. La proteína codificada por este fragmento es de aproximadamente 70 KDa, habiéndose determinado su tamaño por electroforesis en gel SDS-poliacrilamida. No obstante está descrito que fragmentos de 95 KDa en *A. tumefaciens* permiten la síntesis de un β -1,2 glucano en cantidad y calidad similar al obtenido por la proteína de 235 KDa (Zorreguieta *et al.*, 1988). Así mismo en *R. meliloti* para establecer una simbiosis efectiva parece no ser necesaria la proteína NdvB completa (Ielpi *et al.*, 1990).

La caracterización de la región *ndvB* en *R. trifolii* RS800 se ha presentado bastante dificultosa debido, en primer lugar, a la existencia de más de una copia en el genomio. Incluso y dada la dificultad encontrada en esta especie para realizar un marcador de cambio efectivo no se ha podido delimitar en la copia investigada la porción que está implicada en la biosíntesis de β -1,2 glucano. El conocimiento por la bibliografía de que la proteína que interviene en la síntesis de β -1,2 glucano era de un elevado tamaño molecular, nos hizo pensar que una mutación en la porción central del locus nos permitiría obtener un fenotipo claramente defectuoso. Sin embargo, la estirpe *R. trifolii* CAR1 produce β -1,2 glucano en cantidades similares a las que produce la cepa silvestre. El comportamiento fenotípico de *R. trifolii* CAR1 es bastante específico, presentando similitudes y diferencias respecto a los mutantes *chvB* y *ndvB* descritos previamente. La primera diferencia clara es la producción del oligosacárido cíclico en contra a lo descrito para *chvB* de *A. tumefaciens* y *ndvB* de *R. meliloti*, si bien esto cabía esperarlo dada la triple repetición del locus *ndvB*.

Al igual que sucede en *R. meliloti*, en *R. trifolii* CAR1 se observan características vegetativas claramente distintas a la cepa silvestre. Así CAR1 crece muy lentamente como sucede con los mutantes *ndv* de *R. meliloti* (Dylan *et al.*, 1990a), con algunos mutantes de lipopolisacárido (Clover *et al.*, 1989; De Maagd *et al.*, 1989) y otros mutantes afectados en loci de expresión superficial. El comportamiento en floculación o autoaglutinación de la estirpe CAR1 nos podría hacer pensar que se trata de un mutante afectado en el lipopolisacárido (Cava *et al.*, 1989; Priefer, 1989; Putnoky *et al.*, 1990); sin embargo, no está descrito que las mutaciones en las regiones *ndvB* y *chvB* tengan este comportamiento. Por otro lado en

todos los casos descritos hasta el momento, los mutantes de lipopolisacárido están afectados en la movilidad (Noel *et al.*, 1986; Cava *et al.*, 1989; Priefer, 1989; Putnoky *et al.*, 1990), mientras que el mutante CAR1 de *R. trifolii* no se afecta en su motilidad ni presenta tampoco alteraciones en el aspecto de la colonia como por ejemplo, la superficie rugosa típica de los mutantes *lps*. Aunque no se han realizado estudios de electroforésis en gel SDS-poliacrilamida para saber si el LPS de la estirpe CAR1 está alterado; el comportamiento fenotípico es indicativo de un tipo de mutación diferente a las descritas por el momento. Por otro lado CAR1 tampoco parece ser un mutante de EPS porque no presenta diferencias aparentes, por el aspecto de la colonia, con respecto a la cepa silvestre RS800.

El comportamiento simbiótico del mutante CAR1 de *R. trifolii* también se diferencia bastante del comportamiento simbiótico de los mutantes *ndv* de *R. meliloti*. Estos mutantes inducen en alfalfa la formación de numerosos nódulos de color blanco. Su estudio microscópico revela la presencia de una región meristemática distal y una región proximal cuyas células contienen gránulos de reserva de gran tamaño. No presentan cordones de infección ni bacteroides, pero si existen haces vasculares periféricos. Todo ello confiere a estas estructuras características de nódulos genuinos (Dylan *et al.*, 1986). La estirpe *R. trifolii* CAR1 tal como se describe en el Capítulo 4 induce en trébol la formación de dos tipos de estructuras diferentes tanto macroscópica como microscópicamente. Aproximadamente las dos terceras partes de estas estructuras son pequeñas, de color blanco y se sitúan en las raíces secundarias y en los lugares donde éstas emergen. En el estudio microscópico se muestran muy similares a los pseudonódulos inducidos por los mutantes *ndv* de *R. meliloti*; presentan características típicas de nódulos y carecen de bacteroides. El resto de los nódulos son macroscópicamente parecidos a los inducidos por la cepa silvestre, aunque de menor tamaño, y los cortes semifinos examinados al microscopio óptico permiten observar la presencia de células vegetales invadidas de manera desigual, cuyos bacteroides no presentan grandes diferencias con los derivados de la cepa silvestre.

Estos resultados sugieren que la estirpe *R. trifolii* CAR1 presenta un fenotipo rezumante y que la cantidad de nódulos que son invadidos correctamente por la bacteria son capaces de realizar la fijación simbiótica de nitrógeno. El hecho de que al menos parte del locus *ndvB* de *R. trifolii* esté triplicado en el genomio de la bacteria puede explicar que ésta invada con éxito al menos la tercera parte de los nódulos inducidos.

En un principio parecía clara la relación entre el defecto simbiótico de los mutantes *ndv* y la incapacidad de éstos para sintetizar β -1,2 glucano periplásmico (Geremia *et al.*, 1987; Stanfield *et al.*, 1988). Recientemente, el aislamiento por Dylan *et al.* (1990b) de mutantes pseudorevertientes que recuperan la capacidad simbiótica sin restaurar la producción del oligosacárido cíclico parece sugerir que esta molécula no se requiere directamente para el desarrollo del nódulo aunque pueda desempeñar un papel osmoprotector de las características de la superficie celular (Dylan *et al.*, 1990a). Así mismo estos datos permiten separar la deficiencia simbiótica del resto del fenotipo de los mutantes *ndv*.

Ielpi *et al.* (1990) proponen también que la proteína NdvB podría estar compuesta por distintos dominios polipeptídicos que podrían intervenir en funciones diferentes a la síntesis de β -1,2 glucano, dado el enorme tamaño de la proteína NdvB y el hecho de que no se necesite la proteína completa para la síntesis del oligosacárido.

Los datos que aporta el comportamiento simbiótico de la estirpe CAR1, mutante en el locus *ndvB* de *R. trifolii*, parecen apoyar la separación señalada entre la síntesis de β -1,2 glucano y la deficiencia simbiótica. No existen diferencias en cuanto a la producción del oligosacárido periplásmico entre las estirpes RS800 y CAR1; y sin embargo, se puede observar un comportamiento en planta bastante diferente por parte de ambas estirpes.

El estudio de las mutaciones que bloquean la diferenciación de nódulos completamente efectivos ha permitido determinar una serie de características fundamentales en el desarrollo de la simbiosis. El fenotipo de las estirpes portadoras de estas mutaciones se ha denominado Nod⁺ Fix⁻, ya que estas estirpes inducen en la

planta hospedadora la formación de nódulos que no fijan nitrógeno. El conjunto de los mutantes Fix^- se puede subdividir en dos grupos; el primero de ellos incluye mutantes afectados en etapas tempranas del desarrollo del nódulo. Por el contrario, el segundo grupo reúne mutantes bloqueados en etapas tardías del desarrollo y mantenimiento del nódulo.

Entre los mutantes Fix^- afectados en etapas tempranas de la nodulación se encuentran los mutantes *ndv* de *R. meliloti* cuyo comportamiento simbiótico ya hemos discutido. Los mutantes *exo* de *R. meliloti* y *Rhizobium* sp. NGR234 (Chen *et al.*, 1985; Finan *et al.*, 1985; Leigh *et al.*, 1985) inducen en la planta hospedadora la formación de estructuras nodulares atípicas, carecen de cordón de infección y solo presentan algunas bacterias en los espacios intercelulares superficiales. También pertenecen a este grupo los mutantes *lps* de *R. leguminosarum* (De Maagd *et al.*, 1989; Prierfer, 1989) que parecen estar bloqueados en una etapa ligeramente posterior a la que tienen bloqueada los mutantes *exo* ya que los nódulos presentan cordón de infección del que se liberan bacterias, que se rodean de una membrana peribacteroidal, en algunas células vegetales. Sin embargo, los nódulos permanecen pequeños y senescen prematuramente. En el caso de los mutantes *lps* de *R. phaseoli* (Noel *et al.*, 1986; Cava *et al.*, 1989) los nódulos no contienen bacterias en ningún caso. En *R. meliloti* 41, Putnoky *et al.* (1990) han descrito un fenotipo $\text{Nod}^+ \text{Fix}^-$ en un doble mutante *exo* y *lps* (región *fix-23*); los nódulos son vacíos, careciendo de cordón de infección y bacteroides, o bien presentan muy pocas células invadidas por bacteroides, de menor tamaño que los de la cepa silvestre, que envejecen rápidamente.

Los mutantes Fix^- bloqueados en etapas posteriores del desarrollo del nódulo se caracterizan por inducir la formación de nódulos que contienen cordones de infección y bacteroides, aunque frecuentemente estos bacteroides envejecen prematuramente y no fijan nitrógeno. Algunos nódulos pese a contener niveles de leghemoglobina cercanos a la cepa silvestre siguen siendo inefectivos (Aguilar *et al.*, 1985). Hirsch y Smith (1987) realizaron un estudio sobre la estructura de los nódulos inducidos por una

serie de mutantes Fix⁻ de *R. meliloti* que podríamos incluir en este grupo; se trataba de mutantes en *nifA*, *nifB*, *fixA* y *fixB*.

Los nódulos inducidos por estos mutantes son numerosos, pequeños, de color blanco o rosado y situados frecuentemente en las raíces laterales. Los estudios de microscopía revelaban la existencia de zonas claramente diferenciadas con estadios simbióticos distintos. La ultraestructura de los bacteroides era similar a la de los derivados de la cepa silvestre. Sin embargo, los bacteroides mutantes rápidamente perdían su integridad morfológica, desaparecía la membrana peribacteroidal y degeneraban. Las células vegetales envejecían igualmente con rapidez, de aquí que los nódulos permanecían pequeños y la zona degenerada del nódulo conformaba una porción claramente limitada en el nódulo maduro.

Putnoky *et al.* (1988) realizaron también un interesante estudio de la morfología y ultraestructura de los nódulos inducidos por 64 mutantes Fix⁻ de *R. meliloti*. La mayoría de estos mutantes inducían dos tipos de nódulos; mientras que en algunos nódulos no se detectaban cordones de infección ni bacteroides, otros contenían cordones de infección y un número variable de células vegetales invadidas. Los nódulos inefectivos presentaban más gránulos de reserva que los nódulos inducidos por la cepa silvestre.

Estos 64 mutantes Fix⁻ se clasificaron en tres grupos. En el primero de ellos (Grupo I) se incluyeron mutantes afectados en etapas tempranas de la nodulación; como por ejemplo, los mutantes en la región *fix-23* que posteriormente se han identificado como mutantes *lps* (Putnoky *et al.*, 1990).

En el Grupo II el porcentaje de nódulos vacíos inducidos por los distintos mutantes era variable. Los nódulos invadidos presentaban cordones de infección, y bacteroides de menor tamaño aunque de forma elongada similar a los bacteroides de la cepa silvestre. La zona senescente de los nódulos inducidos por estos mutantes era mayor que en los nódulos inducidos por la estirpe silvestre. Aunque no parece ser que las mutaciones mapeen en la región *nif* donde se encuentra *nifA* (Dusha *et al.*, 1987), no se detectó expresión de los genes *nif* en los nódulos inducidos por los mutantes. Sin embargo si

se detectó la expresión de dos genes de nodulinas (leghemoglobina y nodulina-25).

En el Grupo III, el grupo más numeroso, se detectó expresión de los genes de las nodulinas investigadas y de los genes *nif*. En cambio no existían grandes diferencias con el Grupo II con respecto al número de células invadidas y al número de bacteroides, aunque éstos eran alargados como en la cepa silvestre si bien extremadamente pequeños.

La estirpe mutante en el locus *ndvB* de *R. trifolii* RS800 que se describe en este trabajo, se caracteriza también por inducir en trébol dos tipos de nódulos. El 70% de estos nódulos son vacíos y poseen gránulos de reserva de gran tamaño. El resto de los nódulos son de menor tamaño que los inducidos por la cepa silvestre, de color rosado y al contrario que los nódulos inducidos por mutantes *Fix⁻* realizan la fijación simbiótica de nitrógeno. En cuanto a la morfología de los bacteroides de la estirpe CAR1, aunque no se han realizado estudios de microscopía electrónica, no parecen existir diferencias de forma y tamaño al microscopio óptico con respecto a los bacteroides de la estirpe RS800. Por todo ello pensamos que el defecto simbiótico de la estirpe CAR1 radica a nivel de la invasión y posiblemente de la multiplicación de los rizobios durante la infección del tejido del nódulo. Una vez que el nódulo resulta invadido, aunque el número de bacteroides es inferior al de los nódulos inducidos por la cepa silvestre, éstos son capaces de realizar de forma efectiva la fijación de nitrógeno.

En el Capítulo 5 se describe el aislamiento, mediante el uso del plásmido para búsqueda de promotores pAL4000, de la región promotora del locus *ndvB* de *R. trifolii* RS800. La característica más importante a destacar de esta región promotora clonada es su funcionalidad en un amplio rango de bacterias Gram-negativas que incluye los géneros *Escherichia*, *Rhizobium*, *Klebsiella* y *Azospirillum*.

Los promotores de cada gen actúan dirigiendo, con distinta eficiencia, la síntesis del ARNm correspondiente. Así los promotores fuertes inician la síntesis del mensajero con una frecuencia elevada, mientras que los promotores débiles originan la síntesis de un

pequeño número de transcritos. La secuencia de un elevado número de promotores ha revelado la existencia de dos zonas altamente conservadas localizadas 10 bp (región -10 o "Pribnow box") y 35 bp (región -35) por delante del punto de iniciación de la transcripción. Estas dos regiones del promotor y la distancia en nucleótidos entre ellas están implicadas en la determinación de la fuerza del promotor.

La eficiencia de un promotor se determina de manera exacta midiendo la frecuencia con que se inicia la síntesis del ARNm del gen. Sin embargo, esta medida es difícil de obtener *in vivo*, por lo que la eficiencia del promotor de un gen se deduce indirectamente del nivel al que se expresa su producto protéico.

El uso del vector de amplio rango de hospedador para búsqueda de promotores, pAL4000, nos ha permitido aislar en este estudio una región de 1.5 Kb del locus *ndvB* que posee actividad promotora. Así mismo la utilización del gen de la luciferasa de luciérnaga como gen informador nos ha permitido detectar la actividad del promotor clonado incluso visualmente y por impresión de películas fotográficas sin rotura de las células.

Palomares *et al.* (1989) insertaron este mismo gen informador en un plásmido de amplio rango de hospedador, situado bajo el control del promotor derecho del fago lambda (λ_{PR}). El plásmido resultante, pAP2, se ha establecido en una serie de bacterias Gram-negativas y se ha detectado en todas ellas actividad luciferasa. De este estudio se deduce que λ_{PR} funciona en todas las bacterias ensayadas, siendo particularmente elevados los niveles de actividad luciferasa en *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium phaseoli*, *Rhizobium fredii* y *Pseudomonas aeruginosa*. Por el contrario, la expresión de luciferasa es más baja en *E. coli*, *Agrobacterium* y *Azotobacter*. Palomares *et al.* (1990) han estudiado el funcionamiento de pAP2 en otras bacterias fijadoras de nitrógeno no asociadas a leguminosas entre las que se encuentran estirpes bien caracterizadas de *Klebsiella* y *Azospirillum*. En *Klebsiella* se midieron actividades luciferasa superiores a las obtenidas en *Rhizobium*, y en *Azospirillum* los valores fueron inferiores a los determinados en *Azotobacter*.

El plásmido pLUC19, derivado de pAL4000 portador del promotor *ndvB* de *R. trifolii*, se ha establecido en siete estirpes pertenecientes a los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Rhizobium*, *Azospirillum* y *Azotobacter*. Se ha determinado que el promotor funciona en todas estas bacterias con la excepción de *Azotobacter* donde no se detecta ningún incremento de actividad con respecto a la actividad basal del plásmido en el que el gen que codifica la luciferasa carece de promotor (pAL4000).

La fuerza relativa del promotor *ndvB* con respecto a λ PR es un punto interesante para analizar las posibilidades de uso futuras de la región promotora aislada. Si bien parece ser que el promotor *ndvB* es más débil en *Azospirillum* que el promotor derecho del fago lambda (Palomares *et al.*, 1990); en las estirpes estudiadas de *Rhizobium*, *Klebsiella* y *E. coli* se observan medidas de actividad comparables a las obtenidas en nuestro laboratorio con el plásmido pAP2 y superiores a la de los promotores simbióticos *nifH*, *nifA* y *fixA* (Cebolla *et al.* sometido a publicación). Nos parece por tanto muy interesante seguir profundizando en el estudio de este nuevo promotor, ya que sería muy útil conocer tanto su secuencia como sus mecanismos de regulación para usarlo en la construcción de vehículos de expresión que podrían funcionar de manera efectiva en un amplio rango de bacterias Gram-negativas.

CONCLUSIONES.

PRIMERA.- Se ha demostrado que los genes que intervienen en el desarrollo del nódulo, *ndv*, están presentes en todas las especies estudiadas de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*; y que además, en todos los casos tienen localización cromosómica.

SEGUNDA.- En *Rhizobium trifolii* RS800 el gen *ndvA* está representado por una sola copia mientras que el gen *ndvB* está reiterado.

TERCERA.- Como en el caso de los genes *ndv* de *Rhizobium meliloti*, los genes *ndvA* y *ndvB* de *Rhizobium trifolii* RS800 complementan funcionalmente mutantes *chvA* y *chvB* de *Agrobacterium tumefaciens* haciéndoles recuperar la capacidad tumorigena.

CUARTA.- El comportamiento vegetativo y simbiótico del mutante CAR1 de *Rhizobium trifolii* RS800 es claramente distinto al de los mutantes *ndvB* de *Rhizobium meliloti*. Así, produce β -1,2 glucano, flocula en medio líquido, es móvil y cuando se inoculan plantas de trébol induce dos tipos de nódulos.

QUINTA.- Se ha aislado la región promotora del locus *ndvB* de *Rhizobium trifolii* RS800, utilizando como gen informador el gen de la luciferasa de luciérnaga y se ha demostrado su funcionalidad en un grupo de bacterias Gram-negativas. La fuerza del promotor es parecida a la del promotor derecho del fago lambda, lo que posibilita la utilización del mismo para la construcción de vehículos de expresión.

BIBLIOGRAFIA.

Aguilar, O. M., Kapp, D. y Pühler, A. (1985). Characterization of a *Rhizobium meliloti* fixation gene (*fixF*) located near the common nodulation region. *J. Bacteriol.* **164**: 245-254.

Akiyoshi, D. E., Klee, H., Amasino, R. M., Nester, E. W. y Gordon, M. P. (1984). T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 5994-5998.

Aman, P., Mc Neil, H., Fronzen, L., Darvill, A. G. y Albersheim, P. (1981). Structural elucidation using HPLC-MS and GLC-MS of the acidic polysaccharide secreted by *Rhizobium meliloti* strain 1021. *Carbohydr. Res.* **95**: 263-282.

Borthakur, D., Barber, C. E., Lamb, J. W., Daniels, M. J., Downie, J. A. y Johnston, A. W. B. (1986). A mutation that blocks exopolysaccharide synthesis prevents nodulation of peas by *Rhizobium leguminosarum* but not of beans by *Rhizobium phaseoli* and is corrected by cloned genes from *Rhizobium* or the phytopathogen *Xanthomonas*. *Mol. Gen. Genet.* **203**: 320-323.

Callaham, D. A. y Torrey, J. G. (1981). The structural basis for infection of root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium*. *Can. J. Bot.* **59**: 1647-1664.

Cangelosi, G. A., Martinetti, G., Leigh, J. A., Lee, C. C., Theines, C. y Nester, E. W. (1989). Role of *Agrobacterium tumefaciens* ChvA protein in export of β -1,2 glucan. *J. Bacteriol.* **171**: 1609-1615.

Carlson, R. W., Sanders, R. E., Napoli, C. y Albersheim, P. (1978). Purification and characterization of *Rhizobium* lipopolysaccharide. *Plant Physiol.* **62**: 192-197.

Carlson, R. W. y Yadav, M. (1985). Isolation and partial characterization of extracellular polysaccharides and lipopolysaccharides from fast-growing *Rhizobium japonicum* USDA205 and its Nod⁻ mutant, HC205, which lacks the symbiotic plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 1219-1224.

Carlson, R. W., Kalembasa, S., Turowski, D., Pachori, P. y Noel, K. D. (1987a). Characterization of the lipopolysaccharide from a *Rhizobium phaseoli* mutant that is defective in infection thread development. *J. Bacteriol.* **169**: 4923-4928.

Carlson, R. W., Shatters, R., Duh, J. -L., Turnbull, E., Hanley, B., Rolfe, B. G. y Djordjevic M. A. (1987b). The isolation and partial characterization of the lipopolysaccharides from several *Rhizobium trifolii* mutants affected in root hair infection. *Plant Physiol.* **84**: 421-427.

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

Cebolla, A., Ruíz-Berraquero, F. y Palomares, A. J. (sometido a publicación). Expression and quantification of firefly luciferase under *Rhizobium meliloti* symbiotic promoters. *J. Bioluminescence and Chemiluminescence*.

Chen, H., Batley, M., Redmond, J. y Rolfe, B. G. (1985). Alteration of the effective nodulation properties of a fast growing broad host range *Rhizobium* due to changes in exopolysaccharide synthesis. *J. Plant Physiol.* **120**: 331-349.

Clover, R. H., Kieber, J. y Signer, E. T. (1989). Lipopolysaccharide mutants of *Rhizobium meliloti* are not defective in symbiosis. *J. Bacteriol.* **171**: 3961-3967.

Coronado, C., Megias, M., Ruíz-Berraquero, F. y Palomares, A. J. (1989). Interspecies homology of nodule development genes in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* **59**: 289-296.

David, M., Domergue, O., Pognonec, P. y Kahn, D. (1987). Transcription patterns of *Rhizobium meliloti* symbiotic plasmid pSym: identification of *nifA*-independent *fix* genes. *J. Bacteriol.* **169**: 2239-2244.

De Maag, R. A., Rao, A. S., Mulders, I. H. M., Goosen de Roo, L., van Loosdrecht, M. C. M., Wijffelman, C. A. y Lugtenberg, B. J. J. (1989). Isolation and characterization of mutants of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 248 with altered lipopolysaccharides: possible role of surface charge or hydrophobicity in bacterial release from the infection thread. *J. Bacteriol.* **171**: 1143-1150.

De Vos, G. F., Walker, G. C. y Signer, E. R. (1986). Genetic manipulations in *Rhizobium meliloti* utilizing two new transposon Tn5 derivatives. *Mol. Gen. Genet.* **204**: 484-491.

Díaz, C. L., Melchers, L. S., Hooykaas, P. J. J., Lugtenberg, B. J. J. y Kijne, J. W. (1989). Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium* legume symbiosis. *Nature* **338**: 579-581.

Dickstein, R., Bisseling, T., Reinhold, U. N. y Ausubel, F. M. (1988). Expression of nodule-specific genes in alfalfa root nodules blocked at an early stage of development. *Genes Dev.* **2**: 677-687.

Diebold, R., y Noel, K. D. (1989). *Rhizobium leguminosarum* exopolysaccharide mutants: biochemical and genetic analysis and symbiotic behavior on the three hosts. *J. Bacteriol.* **171**: 4821-4830.

Douglas, C. J., Staneloni, R. J., Rubin, R. A. y Nester, E. W. (1985). Identification and genetic analysis of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence region. *J. Bacteriol.* **161**: 850-860.

Dudley, M. E., Jacobs, T. W. y Long, S. R. (1987). Microscopic studies of cell divisions induced in alfalfa roots by *Rhizobium meliloti*. *Planta* **171**: 289-301.

Dusha, I., Kovalenko, S., Banfalvi, Z. y Kondorosi, A. (1987). *Rhizobium meliloti* insertion element ISRM2 and its use for identification of the *fixX* gene. *J. Bacteriol.* **169**: 1403-1409.

Dylan, T., Ielpi, L., Stanfield, S., Kashyap, L., Douglas, C., Yanofsky, M., Nester, E., Helinski, D. R. y Ditta, G. (1986). *Rhizobium meliloti*

genes required for nodule development are related to chromosomal virulence genes in *Agrobacterium tumefaciens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4403-4407.

Dylan, T., Helinski, D. R. y Ditta, G. S. (1990a). Hypoosmotic adaptation in *Rhizobium meliloti* requires β -(1->2)-glucan. J. Bacteriol. 172: 1400-1408.

Dylan, T., Nagpal, P., Helinski, D. R. y Ditta, G. S. (1990b). Symbiotic pseudorevertants of *Rhizobium meliloti ndv* mutants. J. Bacteriol. 172: 1409-1417.

Finan, T. M., Hirsch, A. M., Leigh, J. A., Johansen, E., Kuldau, G. A., Deegan, S., Walker, G. C. y Signer, E. R. (1985). Symbiotic mutants of *Rhizobium meliloti* that uncouple plant from bacterial differentiation. Cell 40: 869-877.

Finan, T. M., Kunkel, B., De Vos, G. F. y Signer, E. R. (1986). Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. J. Bacteriol. 167: 66-72.

Geremia, R. A., Cavaignac, S., Zorreguieta, A., Toro, N., Olivares, J. y Ugalde, R. A. (1987). A *Rhizobium meliloti* mutant that forms ineffective pseudonodules in alfalfa produces exopolysaccharide but fails to form β (1,2) glucan. J. Bacteriol. 169: 880-884.

Govers F., Moerman M., Downie, J. A., Hooykaas, P., Franssen, H. J., Louwense, J., Van Kammen, A. y Bisseling, T. (1986). *Rhizobium nod* genes are involved in inducing an early nodulin gene. Nature 323: 564-566.

Halverson, L. y Stacey, G. (1986). Signal exchange in plant-microbe interactions. Microbiol. Rev. 50: 193-211.

Hirsch, A. M. y Smith, C. A. (1987). Effects of *Rhizobium meliloti nif* and *fix* mutants on alfalfa root nodule development. J. Bacteriol. 169: 1137-1146.

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

Ielpi, L., Dylan, T., Ditta, G. S., Helinski, D. R. y Stanfield, S. W. (1990). The *ndvB* locus of *Rhizobium meliloti* encodes a 319 kDa protein involved in the production of β -(1 \rightarrow 2)-glucan. J. Biol. Chem. 265: 2843-2851.

Inze, D., Follin, A., Van Lijsebethens, M., Simoens, C., Genetello, C., Van Montagu, M. y Schell, J. (1984). Genetic analysis of the individual T-DNA genes of *Agrobacterium tumefaciens*; further evidence that two genes are involved in indole-3-acetic acid synthesis. Mol. Gen. Genet. 194: 265-274.

Kim, C. -H., Tully, R. E. y Keister, D. L. (1989). Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium fredii* HH303 which are symbiotically effective. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1852-1854.

Klee, H.J., White, F. F., Iyer, V. N., Gordon, M. P. y Nester, E. W. (1983). Mutational analysis of the virulence region of an *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. J. Bacteriol. 153: 878-883.

Kondorosi, E. y Kondorosi, A. (1986). Nodule induction on plant roots by *Rhizobium*. Trends Biochem. Sci. 11: 296-299.

Leigh, J. A., Signer, E. R. y Walker, G. C. (1985). Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6231-6235.

Leigh, J. A., Reed, J. W., Hanks, J. F., Hirsch, A. M. y Walker, C. G. (1987). *Rhizobium meliloti* mutants that fail to succinylate their calcofluor-binding exopolysaccharide are defective in nodule invasion. Cell 51: 579-587.

Leigh, J. A. y Lee, Ch. Ch. (1988). Characterization of polysaccharides of *Rhizobium meliloti* *exo* mutants that form ineffective nodules. J. Bacteriol. 170: 3327-3332.

Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J. C. y Dénarié, J. (1990). Symbiotic host-specificity of *Rhizobium*

meliloti is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* **344**: 781-784.

Long, S. R. (1989a). *Rhizobium*-legume nodulation: Life together in the underground. *Cell* **56**: 203-214.

Long, S. R. (1989b). *Rhizobium* genetics. *Annu. Rev. Genet.* **23**: 483-506.

Martinez, E., Pardo, M. A., Palacios, R. y Cevallos, M. A. (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., Romero, D. y Palacios, R. (1990). The *Rhizobium* genome. *Plant Sciences* **9**: 59-93.

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

Newcomb, W. (1981). Nodule morphogenesis. *International Review of Cytology. Supplement 13*. Bourne, G. H. y Danielli, J. F. (eds.). Academic Press. New York. pp. 246-298.

Noel, K. D., Vandenbosch, K. A. y Kulpaca, B. (1986). Mutations in *Rhizobium phaseoli* that lead to arrested development of infection threads. *J. Bacteriol.* **169**: 1392-1401.

Palomares, A. J., DeLuca, M. A. y Helinski, D. R. (1989). Firefly luciferase as a reporter enzyme for measuring gene expression in vegetative and symbiotic *Rhizobium meliloti* and other Gram-negative bacteria. *Gene* **81**: 55-64.

Palomares, A. J., Cebolla, A., Caviedes, M. A., Sánchez, B., Rodríguez, D. N., Muñoz, J. A., Coronado, C. y Ruíz-Berraquero, F. (1990). Firefly luciferase expression on nitrogen fixation with non-legumes. *Proceeding Fifth International Symposium on Nitrogen Fixation with Non-Legumes*. Florencia, Italia.

Philip-Hollingsworth, S., Hollingsworth, R. I., Dazzo, F. B., Djordjevic, M. A. y Rolfe, B. G. (1989). The effect of interspecies

transfer of *Rhizobium* host-specific nodulation genes on acidic exopolysaccharide structure and *in situ* binding by host lectin. J. Biol. Chem. 264: 5710-1714.

Priefer, U. B. (1989). Genes involved in lipopolysaccharide production and symbiosis are clustered on the chromosome of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39. J. Bacteriol. 171: 6161-6168.

Putnoky, P., Grosskopf, E., Cam Ha, D. T., Kiss, G. B. y Kondorosi, A. (1988). *Rhizobium fix* genes mediate at least two communication steps in symbiotic nodule development. J. Cell Biol. 106: 597-607.

Putnoky, P., Petrovics, G., Kereszt, A., Grosskopf, E., Cam Ha, D., Banfalvi, Z. y Kondorosi, A. (1990). *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharide and exopolysaccharide can have the same function in the plant-bacterium interaction. J. Bacteriol. 172: 5450-5458.

Puvanesarajah, V., Schell, F. M., Stacey, G., Douglas, C. J. y Nester, E. W. (1985). A role for 2-linked- β -D-glucan in the virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. 164: 102-106.

Quinto, C., de la Vega, H., Flores, M., Leemans, J., Cevallos, M. A., Pardo, M. A., Azpiroz, R., de Lourdes Girard, M., Calva, E. y Palacios, R. (1985). Nitrogenase reductase: a functional multigene family in *Rhizobium phaseoli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 1170-1174.

Renalier, M. H., Batut, J., Ghai, J., Terzaghi, B., Gherardi, M., David, M., Garnerone, A. M., Vasse, J., Truchet, G., Huguet, T. y Boistard, P. (1987). A new symbiotic cluster on the pSym megaplasmid of *Rhizobium meliloti* 2011 carries a functional *fix* gene repeat and a *nod* locus. J. Bacteriol. 169: 2231-2238.

Roche, P., Lerouge, P., Faucher, C., Vasse, J., Promé, J. C., Dénarié, J. y Truchet, G. (1990). *Rhizobium meliloti* extracellular Nod signals. 5th International Symposium on the Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. Interlaken, Suiza, 1990. L-12.

Rodríguez-Quiñones, F., Fernández-Burriel, M., Banfalvi, Z., Megias, M. y Kondorosi, A. (1989). Identification of a conserved,

reiterated DNA region that influences the efficiency of nodulation in strain RS1051 of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Mol. Plant-Microbe Interact. 2: 75-83.

Russa, R., Urbanik, T., Zurkowski, W. y Lorkiewicz, Z. (1981). Neutral sugars in lipopolysaccharides of *Rhizobium trifolii* and its non-nodulating mutant. Plant and Soil 61: 81-85.

Russa, R., Urbanik, T., Kowalezuk, E. y Lorkiewicz, Z. (1982). Correlation between the occurrence of plasmid pUCS202 and lipopolysaccharide alterations in *Rhizobium*. FEMS Microbiol. Lett. 13: 161-165.

Sadasivan, L. y Neyra, C. A. (1985). Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: exopolysaccharides and cyst formation. J. Bacteriol. 163: 716-723.

Schroeder, G., Waffenschmidt, S., Weiler, E. W. y Schroeder, J. (1984). The T-region of Ti plasmids codes for an enzyme synthesizing indole-3-acetic acid. Eur. J. Biochem. 138: 387-391.

Stacey, G., Paau, A. S., Noel, K. D., Maier, R. J., Silver, L. y Brill, W. J. (1982). Mutants of *Rhizobium japonicum* defective in nodulation. Arch. Microbiol. 132: 219-224.

Stanfield, S. W., Ielpi, L., O'Brochta, D., Helinski, D. R. y Ditta, G. (1988). The *ndvA* gene product of *Rhizobium meliloti* is required for β -(1- \rightarrow 2)-glucan production and has homology to the ATP-binding export protein HlyB. J. Bacteriol. 170: 3523-3530.

Tremblay, P. A. y Miller, R. W. (1984). Cytoplasmic membrane of *Rhizobium meliloti* bacteroids. II. Functional differentiation and generation of membrane potentials. Can. J. Biochem. Cell Biol. 62: 592-601.

Turgeon, B. G. y Bauer, W. D. (1985). Ultrastructure of infection thread development during the infection of soybean by *Rhizobium japonicum*. Planta 163: 328-349.

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

Zajac, E. y Lorkiewicz, Z. (1983). Role of O-acetyl groups in the lipopolysaccharide receptor for *Rhizobium* phage 1P. J. Gen. Microbiol. 129: 3171-3176.

Zevenhuizen, L. P. T. M. y van Neerven. (1983). (1-2)- β -D-glucan and acidic oligosaccharides produced by *Rhizobium meliloti*. Carbohydr. Res. 118: 127-134.

Zorreguieta, A., Ugalde, R. A. y Leloir, L. F. (1985). An intermediate in cyclic 1-2 β glucan biosynthesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 126: 352-357.

Zorreguieta, A. y Ugalde, R. A. (1986). Formation in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. of a 235-kilodalton protein intermediate in β -D(1,2) glucan synthesis. J. Bacteriol. 167: 947-951.

Zorreguieta, A., Geremia, R. A., Cavaignac, S., Cangelosi, G. A., Nester, E. W. y Ugalde, R. A. (1988). Identification of the product of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence gene. Mol. Plant-Microbe Interactions. 1: 121-127.

Stein, D. S. y Cohen, S. N. (1990). Mutational and functional analysis of the *korA* and *korB* gene products of *Streptomyces* plasmid pIJ101. *Mol. Gen. Genet.* **222**: 337-344.

Subramani, S. y DeLuca, M. (1988). Applications of the firefly luciferase as a reporter gene. En *Genetic Engineering: Principles and Methods*. J. K. Setlow (ed.). Plenum Press. New York. Vol. 10, pp. 75-89.

West, R. y Rodriguez, R. L. (1982). Construction and characterization of *E. coli* promoter-probe plasmid vectors, III. pBR322 derivatives with deletions in the tetracycline resistance promoter regions. *Gene* **20**: 291-304.

Wood, K. V., de Wet, J. R., Dewji, N. y DeLuca, M. (1984). Synthesis of active firefly luciferase by in vitro translation of RNA obtained from adults lanterns. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **124**: 592-596.

Wood, K. V. (1989). Luciferases of luminous beetles: Evolution, color variation, and applications. Universidad de California, San Diego. Tesis Doctoral.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. y Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D. CARMEN CORONADO CARVAJAL titulada "GENES TEMPRANOS DE RHIZOBIUM TRIFOLII IMPLICADOS EN PROCESO DE NODULACION"

acordó otorgarle la calificación de APTO "CUM LAUDE"

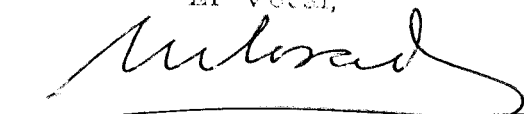
Sevilla, 14 de Diciembre 1990

El Vocal,

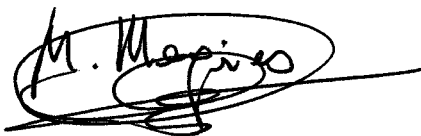


El Presidente

El Vocal,



El Secretario,



El Vocal,



El Doctorado,

